

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-20334  
(P2016-20334A)

(43) 公開日 平成28年2月4日(2016.2.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	Z N A S 4 B O 2 4
<b>C O 7 K 16/10 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/10	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 6 5
<b>C O 7 K 14/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/18	4 C O 8 4
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5

審査請求 有 請求項の数 38 O L 外国語出願 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-112584 (P2015-112584)	(71) 出願人	511017287 インスティテュート・フォー・リサーチ・ イン・バイオメディシン INSTITUTE FOR RESEA RCH IN BIOMEDICINE スイス、ツェーハー—6500ペリンツォ ーナ、ヴィア・ヴェーラ6番
(22) 出願日	平成27年6月2日(2015.6.2)		
(62) 分割の表示	特願2011-530592 (P2011-530592) の分割	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
原出願日	平成21年10月13日(2009.10.13)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	61/104,911	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(32) 優先日	平成20年10月13日(2008.10.13)	(74) 代理人	100157956 弁理士 稲井 史生
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デングウイルス中和抗体およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 デングウイルス感染の抗体依存性増強の一因となることなく、デングウイルス感染を中和する、抗体及びその抗原結合断片、並びに抗体及び抗原結合断片のカクテルの提供。

【解決手段】 2種以上のヒト抗体又はその抗原結合断片を含む薬学的組成物であって、前記抗体又はその抗原結合断片は、各デングウイルス血清型上の少なくとも2つの明確に異なるエピトープに結合することによって、デングウイルス血清型 DENV - 1、DENV - 2、DENV - 3、及び DENV - 4 を中和し、前記抗体は、デングウイルス感染の抗体依存性増強の一因とはならない、薬学的組成物。更に、抗体及び抗原結合断片を産生する不死化 B 細胞、並びに抗体及び抗原結合断片に結合するエピトープ。前記抗体又はその抗原結合断片は、各々前記抗体の Fc 受容体への結合を減少させる Fc 領域内の CH2 の L4A 変異、CH2 の L5A 変異又は両方を含む組成物。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

デングウイルスを中和するヒト抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、デングウイルス感染の抗体依存性増強の一因とはならない、ヒト抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 2】

デングウイルスを中和するヒト抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、Fc領域に変異を含み、前記変異は、前記抗体のFc受容体への結合を減少させる、ヒト抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 3】

前記抗体の前記Fc領域は、CH2のL4A変異、CH2のL5A変異、または両方を含む、請求項1または2に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

## 【請求項 4】

前記抗体は、モノクローナル抗体または組換え抗体である、請求項1または2に記載の抗体。

## 【請求項 5】

前記抗体は、2種、3種、または4種の異なるデングウイルス血清型のうちの1種以上のデングウイルスを中和する、請求項1または2に記載の抗体。

## 【請求項 6】

2種以上のヒト抗体またはその抗原結合断片を含む薬学的組成物であって、前記抗体またはその抗原結合断片は、各デングウイルス血清型上の少なくとも2つの明確に異なるエピトープに結合することによって、デングウイルス血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4を中和し、前記抗体は、デングウイルス感染の抗体依存性増強の一因とはならない、薬学的組成物。

## 【請求項 7】

デングウイルス血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4を中和する3種以上のヒト抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項6に記載の組成物。

## 【請求項 8】

前記抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ、前記抗体のFc受容体への結合を減少させるFc領域内の変異を含む、請求項6に記載の組成物。

## 【請求項 9】

前記抗体またはその抗原結合断片のそれぞれの前記Fc領域は、CH2のL4A変異、CH2のL5A変異、または両方を含む、請求項6に記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体または組換え抗体である、請求項6に記載の組成物。

## 【請求項 11】

配列番号1~6、17~22、33~38、49~54、67~72、83~88、99、100、105~110、121~123、124、125、135~139、149、153~158、169~174、185~188、または189のうちのいずれか1つの配列を有する少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)配列を含む、抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、デングウイルス感染を中和する、抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 12】

配列番号1、17、33、49、67、83、105、121、135、149、153、169、および185からなる群から選択される重鎖CDR1と、配列番号2、18、34、50、68、84、106、122、136、154、170、および186からなる群から選択される重鎖CDR2と、配列番号3、19、35、51、69、85、107、123、137、155、171、および187からなる群から選択される重鎖

10

20

30

40

50

CDR3と、を含み、前記抗体は、デングウイルス感染を中和する、請求項1、2、または11に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項13】

配列番号4、20、36、52、70、86、99、108、138、156、172、および188からなる群から選択される軽鎖CDR1と、配列番号5、21、37、53、71、87、109、124、157、および173からなる群から選択される軽鎖CDR2と、配列番号6、22、38、54、72、88、100、110、125、139、158、174、および189からなる群から選択される軽鎖CDR3と、を含み、前記抗体は、デングウイルス感染を中和する、請求項1、2、または11に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

10

【請求項14】

CDRH1に配列番号1、CDRH2に配列番号2、CDRH3に配列番号3、CDRH1に配列番号17、CDRH2に配列番号18、およびCDRH3に配列番号19、CDRH1に配列番号33、CDRH2に配列番号34、およびCDRH3に配列番号35、CDRH1に配列番号49、CDRH2に配列番号50、およびCDRH3に配列番号51、CDRH1に配列番号67、CDRH2に配列番号68、およびCDRH3に配列番号69、CDRH1に配列番号83、CDRH2に配列番号84、およびCDRH3に配列番号85、CDRH1に配列番号105、CDRH2に配列番号106、およびCDRH3に配列番号107、CDRH1に配列番号121、CDRH2に配列番号122、およびCDRH3に配列番号123、CDRH1に配列番号135、CDRH2に配列番号136、およびCDRH3に配列番号137、CDRH1に配列番号149、CDRH2に配列番号136、およびCDRH3に配列番号137、CDRH1に配列番号153、CDRH2に配列番号154、およびCDRH3に配列番号155、CDRH1に配列番号169、CDRH2に配列番号170、およびCDRH3に配列番号171、ならびにCDRH1に配列番号185、CDRH2に配列番号186、およびCDRH3に配列番号187を含む重鎖を含む、請求項12に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

20

【請求項15】

CDRL1に配列番号4、CDRL2に配列番号5、CDRL3に配列番号6、CDRL1に配列番号20、CDRL2に配列番号21、CDRL3に配列番号22、CDRL1に配列番号36、CDRL2に配列番号37、CDRL3に配列番号38、CDRL1に配列番号52、CDRL2に配列番号53、CDRL3に配列番号54、CDRL1に配列番号70、CDRL2に配列番号71、CDRL3に配列番号72、CDRL1に配列番号86、CDRL2に配列番号87、CDRL3に配列番号88、CDRL1に配列番号99、CDRL2に配列番号53、CDRL3に配列番号100、CDRL1に配列番号108、CDRL2に配列番号109、CDRL3に配列番号110、CDRL1に配列番号70、CDRL2に配列番号124、CDRL3に配列番号125、CDRL1に配列番号138、CDRL2に配列番号109、CDRL3に配列番号139、CDRL1に配列番号156、CDRL2に配列番号157、CDRL3に配列番号158、CDRL1に配列番号172、CDRL2に配列番号173、CDRL3に配列番号174、ならびにCDRL1に配列番号188、CDRL2に配列番号37、CDRL3に配列番号189を含む軽鎖を含む、請求項13に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

30

40

【請求項16】

CDRL1に配列番号4、CDRL2に配列番号5、CDRL3に配列番号6、CDRL1に配列番号20、CDRL2に配列番号21、CDRL3に配列番号22、CDRL1に配列番号36、CDRL2に配列番号37、CDRL3に配列番号38、CDRL1に配列番号52、CDRL2に配列番号53、CDRL3に配列番号54、CDRL1に配列番号70、CDRL2に配列番号71、CDRL3に配列番号72、CDRL1に配列番号86、CDRL2に配列番号87、CDRL3に配列番号88、CDRL1に配列番号99、CDRL2に配列番号53、CDRL3に配列番号100、CDRL1に配列番号108、CDRL2に配列番号109、CDRL3に配列番号110、CDRL1に

50

配列番号70、CDRL2に配列番号124、CDRL3に配列番号125、CDRL1に配列番号138、CDRL2に配列番号109、CDRL3に配列番号139、CDRL1に配列番号156、CDRL2に配列番号157、CDRL3に配列番号158、CDRL1に配列番号172、CDRL2に配列番号173、CDRL3に配列番号174、ならびにCDRL1に配列番号188、CDRL2に配列番号37、CDRL3に配列番号189を含む軽鎖を含む、請求項14に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項17】

配列番号13、29、45、61、65、79、95、117、131、145、151、165、181、または195のうちのいずれか1つと少なくとも70%の配列同一性を有する重鎖可変領域を含む、請求項1、2、または11に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

10

【請求項18】

配列番号14、30、46、62、80、96、103、118、132、146、166、182、または196のうちのいずれか1つと少なくとも70%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む、請求項1、2、または11に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項19】

前記抗体は、配列番号13、29、45、61、65、79、95、117、131、145、151、165、181、または195のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、前記抗体は、配列番号14、30、46、62、80、96、103、118、132、146、166、182、または196のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1、2、または11に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

20

【請求項20】

抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、配列番号13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号29のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号45のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号46のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号61のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号62のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号65のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号62のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号79のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号80のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号95のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号96のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号95のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号103のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号117のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号118のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号131のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号132のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号145のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号146のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号151のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号146のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号165のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号166のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号181のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号182のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号195のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号196のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、前記抗体は、デングウイルス感染を中和する、抗体またはその抗原結合断片。

30

40

【請求項21】

前記1つもしくは複数の抗体は、HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13、およびHMB-DV14からなる群から選択される、請求項1、2、6、または

50

11に記載の抗体。

【請求項22】

前記抗体は、モノクローナル抗体、単鎖抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、またはscFvである、前述の請求項のいずれか1項に記載の抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項23】

前述の請求項のいずれか1項に記載の抗体と同じエピトープに結合する抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体またはその抗原結合断片は、デングウイルス感染を中和する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項24】

前述の請求項のいずれか1項に記載の抗体と交差競合する抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体またはその抗原結合断片は、デングウイルス感染を中和する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項25】

上記請求項のいずれか1項に記載の1つもしくは複数の抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子。

【請求項26】

前記ポリヌクレオチドの配列が、配列番号7~12、15、16、23~28、31、32、39~44、47、48、55~60、63、64、66、73~78、81、82、89~94、97、98、101、102、104、111~116、119、120、126~128、129、130、133、134、140~143、144、147、148、150、152、159~164、167、168、175~180、183、184、190~193、194、197、および198の核酸配列と少なくとも70%相同である、請求項25に記載の核酸分子。

【請求項27】

請求項1~24のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合断片を発現する、細胞。

【請求項28】

請求項1~24のいずれか1項に記載の抗体を発現する、不死化B細胞クローン。

【請求項29】

請求項1~24のいずれか1項に記載の抗体に結合するエピトープを含む、単離または精製された免疫原性ポリペプチド。

【請求項30】

請求項29に記載のエピトープを含む、免疫原性ポリペプチド。

【請求項31】

請求項1~5もしくは11~24のいずれか1項に記載の少なくとも1つの抗体、もしくはその抗原結合断片、請求項25もしくは請求項26に記載の核酸、または請求項30に記載の免疫原性ポリペプチドと、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体と、任意で、前記抗体またはその抗原結合断片の半減期を延長させるために有用な薬剤と、を含む、薬学的組成物。

【請求項32】

薬学的に許容される希釈剤もしくは担体と、任意で、抗体またはその抗原結合断片の半減期を延長させるために有用な薬剤と、をさらに含む、請求項6~10のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項33】

第1のエピトープに特異的な第1の抗体またはその抗原結合断片と、第2のエピトープに特異的な第2の抗体またはその抗原結合断片と、を含む、請求項31に記載の薬学的組成物。

【請求項34】

デングウイルス感染またはデングウイルス関連疾患を阻害する方法であって、それを必

10

20

30

40

50

要とする対象に、治療有効量の、請求項 1 ~ 5 もしくは 1 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの抗体もしくはその抗原結合断片、または請求項 6 ~ 1 0 もしくは 3 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 3 5】

第 2 の治療薬の投与をさらに含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記第 2 の治療薬は、抗ウイルス剤である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

デングウイルス感染またはデングウイルス関連疾患を阻害する方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の、第 1 のエピトープに特異的な、請求項 1 ~ 5 または 1 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の第 1 の抗体またはその抗原結合断片と、第 2 の異なるエピトープに特異的な、第 2 の抗体またはその抗原結合断片とを投与するステップを含む、方法。

10

【請求項 3 8】

デングウイルス感染またはデングウイルス関連疾患の治療方法であって、かかる治療を必要とする患者を識別するステップと、前記患者に、治療有効量の、請求項 1 ~ 5 もしくは 1 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の精製された中和ヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、または請求項 6 ~ 1 0 もしくは 3 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を投与するステップと、を含む、方法。

【請求項 3 9】

前記治療は、前記抗体またはその抗原結合断片のうちの 2 種以上の投与を含む、請求項 3 8 に記載の方法。

20

【請求項 4 0】

前記治療は、前記抗体またはその抗原結合断片のうちの 3 種以上の投与を含む、請求項 3 8 に記載の方法

【請求項 4 1】

デングウイルスに対抗する免疫学的応答を誘発することができるポリペプチドをスクリーニングする方法であって、請求項 1 ~ 5 または 1 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片を使用して、ポリペプチドライブラリーをスクリーニングするステップを含む、方法。

30

【請求項 4 2】

抗デングウイルスワクチンの品質を監視する方法であって、前記ワクチンの抗原が、正しい構造の特異的エピトープを含有することを確認するための、請求項 1 ~ 5 または 1 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片の使用を含む、方法。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 5 または 1 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片に特異的に結合するエピトープを含む、ワクチン。

【請求項 4 4】

( i ) デングウイルス感染の治療のための薬物の製造における、( i i ) ワクチンにおける、または( i i i ) デングウイルス感染の診断における、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗体、もしくはその抗原結合断片、請求項 2 5 もしくは請求項 2 6 に記載の核酸、請求項 3 0 に記載の免疫原性ポリペプチド、または請求項 6 ~ 1 0 もしくは 3 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物の使用。

40

【請求項 4 5】

前記ワクチンの前記抗原が、正しい構造の特異的エピトープを含有することによって、抗デングウイルスワクチンの品質を監視するための、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗体、またはその抗原結合断片の使用。

【請求項 4 6】

( i ) 治療における、( i i ) デングウイルス感染を治療するための薬物の製造における、( i i i ) ワクチンとして、または( i v ) デングウイルス感染を中和することがで

50

きるリガンドのスクリーニングにおける使用のための、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体、またはその抗原結合断片に特異的に結合する、エピトープ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2008年10月13日に提出された米国仮出願第61/104,911号、表題「Dengue Virus Neutralizing Antibodies and Use Thereof」に対する優先権を主張し、当該出願は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

10

【0002】

背景

デングウイルス(DENV)は、世界規模で健康を大きく脅かすヒト病原体である。このウイルスは、年間数十万のデング熱、デング出血熱、およびデングショック症候群の症例を引き起こすと推定される。フラビウイルス属のデングウイルスには、4種の密接に関連する血清型、DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4がある。これらの4種のウイルスは、撲滅および制御のあらゆる試みに首尾よく抵抗している高度に都市化した蚊の種である、ネッタイシマカの咬傷を介してヒトからヒトへと伝播する。ワクチン接種がデング熱を制御する唯一の効率的な方法であると見なされている。この目的を達成するために、いくつかの四価のデング熱候補ワクチンが、開発段階の後期にある。

20

【0003】

1つのデングウイルス血清型による一次感染が、同種血清型に対する生涯にわたる防御免疫を誘発する。しかしながら、異なる血清型による感染に対抗する交差防御はない。実際、1つの血清型に対抗する既存の免疫が、感染の抗体依存性増強(ADE)のために、異なる血清型によって引き起こされるデング熱感染およびデング出血熱のリスクの増加に関与する。ADEでは、前のデング熱感染によって産生された、または母親から受動的に伝達された抗体が、単核食細胞系でFc受容体担持細胞に結合する感染性免疫複合体を形成し、高効率の感染を招く。

【0004】

30

したがって、感染の抗体依存性増強のリスクを高めることなく、デングウイルス感染を予防するための物質および方法が必要とされる。

【発明の概要】

【0005】

要約

本発明は、デングウイルス感染の抗体依存性増強の一因となることなく、デングウイルス感染を中和する、抗体および抗体カクテルの発見に一部基づく。したがって、本発明の一態様において、本発明は、デングウイルスを中和するヒト抗体、抗体変異体、またはその抗原結合断片を含み、本抗体、本抗体変異体、または本抗原結合断片は、デングウイルス感染の抗体依存性増強の一因とはならない。一実施形態において、本発明は、デングウイルスを中和するヒト抗体、抗体変異体、またはその抗原結合断片を含み、本抗体、本抗体変異体、または本抗原結合断片は、Fc領域に変異を含み、この変異が抗体のFc受容体への結合を減少させる。

40

【0006】

本発明の別の実施形態において、本発明は、2種以上のヒト抗体、またはその抗原結合断片を含む薬学的組成物を含む。これらの抗体または抗原結合断片は、各デングウイルス血清型上の少なくとも2つの明確に異なるエピトープに結合することによって、デングウイルス血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4を中和する。本薬学的組成物の抗体は、デングウイルス感染の抗体依存性増強の一因とはならない。

50

## 【0007】

さらに別の実施形態において、本発明は、配列番号1～6、17～22、33～38、49～54、67～72、83～88、99、100、105～110、121～123、124、125、135～139、149、153～158、169～174、185～188、または189のうちのいずれか1つの配列を有する少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)配列を含む、抗体またはその抗原結合断片を含み、本抗体は、デングウイルス感染を中和する。

## 【0008】

さらに別の実施形態において、本発明は、抗体またはその抗原結合断片を含み、本抗体は、配列番号13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号29のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号45のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号46のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号61のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号62のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号65のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号62のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号79のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号80のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号95のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号96のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号95のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号103のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号117のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号118のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号131のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号132のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号145のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号146のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号151のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号146のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号165のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号166のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号181のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号182のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号195のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号196のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、本抗体は、デングウイルス感染を中和する。

## 【0009】

さらなる実施形態において、本発明は、デングウイルスを中和し得る組換え抗体、抗体変異体、またはその抗原結合断片を含む。組換え抗体、抗体変異体、または抗原結合断片は、デングウイルス感染の抗体依存性増強の一因とはならない。

## 【0010】

別の態様において、本発明は、デングウイルス感染を中和する本発明の抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子を含む。さらに別の態様において、本発明は、本発明の抗体を発現する細胞を含む。また別の態様において、本発明は、本発明の抗体に結合するエピトープを含む、単離または精製された免疫原性ポリペプチドを含む。

## 【0011】

本発明はまた、本発明の抗体、抗体変異体、もしくは抗原結合断片、本発明の核酸、または本発明の免疫原性ポリペプチドと、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体と、任意で、抗体またはその抗原結合断片の半減期を延長させるために有用な薬剤と、を含む、薬学的組成物を含む。

## 【0012】

本発明の別の態様において、本発明は、デングウイルス感染もしくはデングウイルス関連疾患を阻害もしくは予防する方法、またはデングウイルス感染もしくはデングウイルス関連疾患を治療する方法を提供する。本方法は、治療のために投与を必要とする患者に、治療有効量の本発明の少なくとも1つの抗体、抗体変異体、抗原結合断片、または薬学的

10

20

30

40

50

組成物を投与することを含む。

【0013】

本発明のさらに別の態様において、本発明は、デングウイルスに対する免疫学的応答を誘発し得るか、または示すことができるポリペプチドをスクリーニングする方法を含み、本方法は、本発明の抗体、抗体断片、または変異体を使用して、ポリペプチドライブラリーをスクリーニングすることを含む。

【0014】

本発明のさらに別の態様において、本発明は、抗デングウイルスワクチンの品質を監視する方法を含む。本方法は、ワクチンの抗原が、正しい構造にある特異的エピトープを含有することを確認するための、本発明の抗体、抗体変異体、またはその抗原結合断片の使用を含む。

10

【0015】

本発明のさらなる態様において、本発明は、本発明の抗体、抗体断片、または変異体に特異的に結合するエピトープを含むワクチンを含む。

【0016】

(i) デングウイルス感染の治療のための薬物の製造における、(ii) ワクチンにおける、または(iii) デングウイルス感染の診断における、本発明の抗体もしくはその抗原結合断片、本発明の核酸、本発明の免疫原性ポリペプチド、または本発明の薬学的組成物の使用もまた、本発明の範囲内であることが企図される。さらに、該ワクチンの抗原が、正しい構造にある特異的エピトープを含有することを確認することによって、抗DENVワクチンの品質を監視するための、本発明の抗体またはその抗原結合断片の使用もまた、本発明の範囲内であることが企図される。

20

【0017】

さらなる態様において、本発明は、(i) 治療における、(ii) デングウイルス感染の治療のための薬物の製造における、(iii) ワクチンとしての、または(iv) デングウイルス感染を中和することが可能なリガンドのスクリーニングにおける、使用のための、本発明のいずれか1つの抗体またはその抗原結合断片に特異的に結合するエピトープを含む。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】野生型抗デングウイルス抗体を使用したデングウイルスの各血清型を用いたウイルス中和および増強アッセイにおいて、VERO細胞およびK562細胞が使用された。デングウイルスに対する抗体は、用量依存的にVERO細胞の標的ウイルスの感染を阻害する。K562細胞では、この抗体は、用量依存的な抗体依存性感染増強(ADE)に至る。

30

【図2】重鎖にCH2のL4AおよびL5A置換を有する抗デングウイルス抗体(LALA変異体)は、非修飾抗体と同様、VERO細胞の標的ウイルス感染を中和する。しかし、LALA変異体は、K562細胞の標的ウイルスによる抗体依存性感染増強を完全に消失した。

【発明を実施するための形態】

40

【0019】

発明の詳細な説明

本発明は、デングウイルス感染の抗体依存性感増強(ADE)の一因となることなく、デングウイルス(DENV)感染を中和する抗体および抗体カクテルの発見に基づく。本発明の一態様において、本発明は、デングウイルス感染の抗体依存性感増強の一因となることなくデングウイルスを中和する、ヒト抗体、変異体抗体、またはその抗原結合断片を含む。本抗体または抗体断片は、1種以上のデングウイルス血清型、例えば、2種、3種、または4種のすべてのデングウイルス血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4を中和することができる。

【0020】

50

本発明はまた、例えば、2種以上のヒト抗体、抗体変異体、またはその抗原結合断片を含む抗体カクテルを含む、薬学的組成物を含む。ヒト抗体、抗体断片、または変異体のカクテルを含む本発明の薬学的組成物は、4種すべてのデングウイルス血清型、すなわち、DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4を中和する。一実施形態において、抗体、抗体断片、または変異体のカクテルは、各デングウイルス血清型上の少なくとも2つの明確に異なるエピトープに結合することによって、デングウイルスを中和する。本薬学的組成物の抗体、変異体、および断片は、デングウイルス感染の抗体依存性増強の一因とはならないことに留意されたい。一実施形態において、本カクテルは、2種の抗体またはその断片もしくは変異体を含む。別の実施形態において、本カクテルは、3種の抗体またはその断片もしくは変異体を含む。さらに別の実施形態において、本カク

10

#### 【0021】

本明細書で使用される、「断片」、「抗体断片」、および「抗原結合断片」という用語は、交換可能に使用され、抗体の抗原結合活性を保持する本発明の抗体の任意の断片を意味する。例示的な抗体断片には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、およびscFv断片が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0022】

「変異」および「置換」という用語は、交換可能に使用され、1つもしくは複数の核酸またはアミノ酸残基の変化を意味する。

#### 【0023】

本明細書で使用される、「変異体」および「抗体変異体」という用語は、交換可能に使用され、抗体の抗原結合活性を保持する本発明の抗体の任意の変異体を意味する。変異体という用語には、変異および/または置換を含む抗体が含まれる。例示的な抗体変異体には、CH2の4、5、または両方の位置にLからAへの置換を有するものが含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0024】

本発明の抗体

本発明は、デングウイルスを中和するが、デングウイルス感染のADEの一因とはならない抗体を提供する。「中和抗体」は、病原体が宿主において感染を開始/および持続させる能力を中和し得るものである。本発明の抗体は、1種もしくは複数種のデングウイルス血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4を中和することができる。一実施形態において、本発明の抗体は、1種以上の、例えば、2種、3種、または4種のすべてのデングウイルス血清型を中和する。別の実施形態において、2種以上の抗体、抗体断片、または変異体を含む薬学的組成物は、4種すべてのデングウイルス血清型を中和することができる。さらに別の実施形態において、2種以上の抗体、抗体断片、または変異体を含む薬学的組成物は、各デングウイルス血清型上の2つの明確に異なるエピトープを標的とすることによって、デングウイルス感染を中和する。これらの抗体、抗原結合断片、および変異体は、適切な製剤化後に予防薬もしくは治療薬として、または本明細書に記載されるような診断ツールとして使用することができる。

30

#### 【0025】

本発明の抗体は、モノクローナル、例えば、ヒトモノクローナル抗体、または組換え抗体であり得る。本発明はまた、本発明の抗体の断片、特に、抗体の抗原結合活性を保持する断片を提供する。特許請求の範囲を含む本明細書は、いくつかの箇所において、抗体断片(複数可)、抗体の変異体(複数可)、および/または抗体の誘導体(複数可)について明示的に言及し得るが、「抗体」または「本発明の抗体」という用語は、すべての分類の抗体、すなわち、抗体断片(複数可)、抗体の変異体(複数可)、および抗体の誘導体(複数可)を含むことを理解されたい。

40

#### 【0026】

いずれの理論にも拘束されるものではないが、デングウイルス感染の抗体依存性増強は、抗体のFc領域、具体的にはIgG分子の重鎖のFc領域の、宿主細胞上のFc受容体

50

、例えば、Fc 受容体への結合により引き起こされると考えられる。本発明は、一方で、Fc 受容体 (FcR) への結合を減少させた、IgG 分子を含む抗体を提供する。一実施形態において、本発明の抗体は、Fc 領域内に1つもしくは複数の変異を含む。変異 (複数可) は、本抗体のFc 受容体への結合を減少させる、いずれの変異であってもよい。一実施形態において、本発明の抗体のFc 領域は、CH2 の4、5、または両方の位置に置換を含む。概して、野生型 IgG 1 および IgG 3 の CH2 の4 位および5 位のアミノ酸は、ロイシン (「L」) である。一実施形態において、本発明の抗体は、CH2 の4、5、または両方の位置に、L ではないアミノ酸を含む。別の実施形態において、本発明の抗体は、CH2 の4、または5、あるいは両方の位置にアラニン (「A」) を含む。CH2 の L4 A および L5 A 置換を含む抗体は、本明細書で「LALA」変異体と称される。

10

## 【0027】

代替として、本発明は、Fc 領域を含まず、したがってFcR に結合しない抗体断片を提供する。例示的な抗体断片には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、および scFv が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0028】

それぞれが重鎖に3つのCDR および軽鎖に3つのCDR を含む、本発明のいくつかの例示的な抗体の重鎖および軽鎖の配列が決定されている。CDR のアミノ酸の位置は、IMGT 付番システムに従って定義される [1、2、3]。本発明の多くの例示的な抗体の CDR、重鎖、軽鎖の配列、ならびにこの CDR、重鎖、軽鎖をコードする核酸分子の配列を、配列表に開示する。表1は、本発明の例示的な抗体の6つのCDR、重鎖および軽鎖のそれぞれの可変領域のアミノ酸配列についての、配列番号を提供する。表2は、本発明の例示的な抗体の CDR、重鎖、および軽鎖をコードする核酸分子の配列についての、配列番号を提供する。

20

表1 . 抗体の CDR、重鎖、および軽鎖のアミノ酸配列番号

## 【表1】

抗体	CDR	重鎖可変領域	軽鎖可変領域
HMB-DV-1	1-6	13	14
HMB-DV-2	17-22	29	30
HMB-DV-3	33-38	45	46
HMB-DV-4	49-54	61, 65	62
HMB-DV-5	67-72	79	80
HMB-DV-6	83-88	95	96
HMB-DV-7	83-85, 99, 53, 100	95	103
HMB-DV-8	105-110	117	118
HMB-DV-9	121-123, 70 124, 125	131	132
HMB-DV-10	135-139, 109	145	146
HMB-DV-11	149, 136-139, 109	151	146
HMB-DV-12	153-158	165	166
HMB-DV-13	169-174	181	182
HMB-DV-14	185-188, 37, 189	195	196

30

40

表2 . 抗体の CDR、重鎖、および軽鎖の核酸配列番号

【表 2】

抗体	CDR	重鎖可変領域	軽鎖可変領域
HMB-DV-1	7-12	15	16
HMB-DV-2	23-28	31	32
HMB-DV-3	39-44	47	48
HMB-DV-4	55-60	63, 66	64
HMB-DV-5	73-78	81	82
HMB-DV-6	89-94	97	98
HMB-DV-7	89-91, 101, 59, 102	97	104
HMB-DV-8	111-116	119	120
HMB-DV-9	126-128, 76, 129, 130	133	134
HMB-DV-10	140-143, 115, 144	147	148
HMB-DV-11	150, 141-143, 115, 144	152	148
HMB-DV-12	159-164	167	168
HMB-DV-13	175-180	183	184
HMB-DV-14	190-193, 43, 194	197	198

10

## 【0029】

一実施形態において、本発明の抗体または抗原結合断片は、本発明の例示的な抗体の1つもしくは複数の重鎖または軽鎖CDRを含む。例示的な実施形態において、本発明の抗体または抗原結合断片は、デングウイルス感染を中和し、配列番号1~6、17~22、33~38、49~54、67~72、83~88、99、100、105~110、121~123、124、125、135~139、149、153~158、169~174、185~188、または189のうちのいずれか1つの配列を有する少なくとも1つのCDR配列を含む。

20

## 【0030】

別の実施形態において、本発明の抗体、抗体変異体、または抗原結合断片は、配列番号1~3、17~19、33~35、49~51、67~69、83~85、105~107、121~123、135~137、149、153~155、169~171、または185~187のうちの1つもしくは複数のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。さらに別の実施形態において、本発明の抗体、抗体変異体、または抗原結合断片は、配列番号1、17、33、49、67、83、105、121、135、149、153、169、および185からなる群から選択される重鎖CDR1と、配列番号2、18、34、50、68、84、106、122、136、154、170、および186からなる群から選択される重鎖CDR2と、配列番号3、19、35、51、69、85、107、123、137、155、171、および187からなる群から選択される重鎖CDR3と、を含む。

30

## 【0031】

例えば、本発明の抗体は、CDRH1に配列番号1、CDRH2に配列番号2、CDRH3に配列番号3；CDRH1に配列番号17、CDRH2に配列番号18、およびCDRH3に配列番号19；CDRH1に配列番号33、CDRH2に配列番号34、およびCDRH3に配列番号35；CDRH1に配列番号49、CDRH2に配列番号50、およびCDRH3に配列番号51；CDRH1に配列番号67、CDRH2に配列番号68、およびCDRH3に配列番号69；CDRH1に配列番号83、CDRH2に配列番号84、およびCDRH3に配列番号85；CDRH1に配列番号105、CDRH2に配列番号106、およびCDRH3に配列番号107；CDRH1に配列番号121、CDRH2に配列番号122、およびCDRH3に配列番号123；CDRH1に配列番号135、CDRH2に配列番号136、およびCDRH3に配列番号137；CDRH1に配列番号149、CDRH2に配列番号136、およびCDRH3に配列番号137；C

40

50

CDRH1に配列番号153、CDRH2に配列番号154、およびCDRH3に配列番号155；CDRH1に配列番号169、CDRH2に配列番号170、およびCDRH3に配列番号171；ならびにCDRH1に配列番号185、CDRH2に配列番号186、およびCDRH3に配列番号187を含む、重鎖を含む。

【0032】

さらに別の実施形態において、本発明の抗体、抗体変異体、または抗体断片は、配列番号4～6、20～22、36～38、52～54、70～72、86～88、99、100、108～110、124、125、138、139、156～158、172～174、188、または189のうちの一つもしくは複数のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。さらなる実施形態において、本発明の抗体、抗体変異体、または抗体断片は、配列番号4、20、36、52、70、86、99、108、138、156、172、および188からなる群から選択される軽鎖CDR1と、配列番号5、21、37、53、71、87、109、124、157、および173からなる群から選択される軽鎖CDR2と、配列番号6、22、38、54、72、88、100、110、125、139、158、174、および189からなる群から選択される軽鎖CDR3と、を含む。

10

【0033】

例えば、本発明の抗体は、CDRL1に配列番号4、CDRL2に配列番号5、CDRL3に配列番号6；CDRL1に配列番号20、CDRL2に配列番号21、CDRL3に配列番号22；CDRL1に配列番号36、CDRL2に配列番号37、CDRL3に配列番号38；CDRL1に配列番号52、CDRL2に配列番号53、CDRL3に配列番号54；CDRL1に配列番号70、CDRL2に配列番号71、CDRL3に配列番号72；CDRL1に配列番号86、CDRL2に配列番号87、CDRL3に配列番号88；CDRL1に配列番号99、CDRL2に配列番号53、CDRL3に配列番号100；CDRL1に配列番号108、CDRL2に配列番号109、CDRL3に配列番号110；CDRL1に配列番号70、CDRL2に配列番号124、CDRL3に配列番号125；CDRL1に配列番号138、CDRL2に配列番号109、CDRL3に配列番号139；CDRL1に配列番号156、CDRL2に配列番号157、CDRL3に配列番号158；CDRL1に配列番号172、CDRL2に配列番号173、CDRL3に配列番号174；ならびにCDRL1に配列番号188、CDRL2に配列番号37、CDRL3に配列番号189を含む、軽鎖を含む。

20

30

【0034】

一実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表1に列記される抗体HMB-DV-1のすべてのCDRを含み、ヒト宿主においてデングウイルス感染を中和する。別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表1に列記される抗体HMB-DV-2のすべてのCDRを含み、ヒト宿主においてデングウイルス感染を中和する。別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表1に列記される抗体HMB-DV-3のすべてのCDRを含み、ヒト宿主においてデングウイルス感染を中和する。さらに別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表1に列記される抗体HMB-DV-4のすべてのCDRを含み、ヒト宿主においてデングウイルス感染を中和する。さらに別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表1に列記される抗体HMB-DV-5のすべてのCDRを含み、ヒト宿主においてデングウイルス感染を中和する。さらに別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表1に列記される抗体HMB-DV-6のすべてのCDRを含み、ヒト宿主においてデングウイルス感染を中和する。さらに別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表1に列記される抗体HMB-DV-7のすべてのCDRを含み、ヒト宿主においてデングウイルス感染を中和する。

40

【0035】

さらなる実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表1に列記される抗体HMB-DV-8のすべてのCDRを含み、ヒト宿主においてデングウイルス感染を中和する。別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表1

50

に列記される抗体 H M B - D V - 9 のすべての C D R を含み、ヒト宿主において Dengue ウイルス感染を中和する。また別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表 1 に列記される抗体 H M B - D V - 10 のすべての C D R を含み、ヒト宿主において Dengue ウイルス感染を中和する。さらに別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表 1 に列記される抗体 H M B - D V - 11 のすべての C D R を含み、ヒト宿主において Dengue ウイルス感染を中和する。さらに別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表 1 に列記される抗体 H M B - D V - 12 のすべての C D R を含み、ヒト宿主において Dengue ウイルス感染を中和する。さらに別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表 1 に列記される抗体 H M B - D V - 13 のすべての C D R を含み、ヒト宿主において Dengue ウイルス感染を中和する。さらに別の実施形態において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、表 1 に列記される抗体 H M B - D V - 14 のすべての C D R を含み、ヒト宿主において Dengue ウイルス感染を中和する。

10

20

30

40

50

**【 0 0 3 6 】**

また別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 13、29、45、61、65、79、95、117、131、145、151、165、181、または 195 の配列と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 相同である アミノ酸配列を有する重鎖を含む。さらに別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 14、30、46、62、80、96、103、118、132、146、166、182、または 196 の配列と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 相同である アミノ酸配列を有する軽鎖を含む。

**【 0 0 3 7 】**

さらなる実施形態において、本発明の抗体、抗体変異体、または抗体断片は、配列番号 13、29、45、61、65、79、95、117、131、145、151、165、181、または 195 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 14、30、46、62、80、96、103、118、132、146、166、182、または 196 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

**【 0 0 3 8 】**

さらに別の実施形態において、本発明の抗体、抗体変異体、または抗体断片は、Dengue ウイルス感染を中和し、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 14 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 29 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 30 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 45 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 46 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 61 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 62 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 65 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 62 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 79 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 80 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 95 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 96 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 95 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 103 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 117 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 118 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 131 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 132 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 145 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 146 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 151 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 146 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 165 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 166 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号 181 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 182 のア

ミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号195のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号196のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0039】

鎖置換およびCDR移植のための方法は、当該技術分野においてよく知られている。元々これらの方法は、非ヒト抗体（概してマウス抗体）をヒト化するため、または非ヒト抗体と同等の生物活性を有するヒト抗体対応物を選択するために開発された。これらの方法は、非ヒト抗体のCDR、例えば、CDR3のうちの一つのみが保持され、フレームワークおよび他の2つのCDR、例えば、CDR1および2を含む、残りのV領域が順次行われるステップで個々に置換される、置換技術を含む（例えば、米国特許出願第20030166871号、Rader, et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-15, 1998、Steinberg, et al., J Biol Chem 275:36073-78, 2000、Rader, et al., J Biol Chem 275:13668-76, 2000）。

10

【0040】

また、標的抗原に対する参照抗体の結合特異性を有する抗体を作製する方法は、特許出願国際公開第WO05/069,970号に記載されている。これらの方法は、参照抗体からレシピエント抗体または抗体断片へ、参照抗体の最小必須結合特異性を移行することを含む。移行され得る領域の例には、重鎖および/もしくは軽鎖からの単一CDRセグメント、例えばCDR3セグメント、またはDセグメント、またはCDR3-FR4セグメント、または最小必須結合特異性決定因子を含む任意のCDR3-FR4セグメントの移行が含まれるが、これらに限定されない。これらの方法を使用して作製される抗体は、参照抗体の結合特異性と、しばしば親和性とを保持する。

20

【0041】

本発明の抗体、抗体変異体、または抗体断片は、特に、本発明の例示的な抗体の一つもしくは複数のCDR、重鎖、または軽鎖を含む抗体を含み、それらの特異性およびデングウイルス感染中和能を保持する。

【0042】

本発明の例示的な抗体には、HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13、およびHMB-DV14が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0043】

HMB-DV4の変異体は、配列番号61および配列番号65に記されるアミノ酸配列を有する重鎖変異体と、配列番号62に記されるアミノ酸配列を有する軽鎖変異体とからなる。重鎖変異体をコードする核酸配列は、配列番号63および配列番号66に記される。軽鎖をコードする核酸は、配列番号64に記される。したがって、HMB-DV4変異体の重鎖（配列番号61、65）および軽鎖（配列番号62）を含む抗体は、本発明の範囲に含まれる。

【0044】

本明細書で使用される、「HMB-DV4」という用語は、HMB-DV4の任意のおよび/またはすべての変異体、例えば、配列番号61および65に相当する重鎖と、配列番号62に相当する軽鎖とを有するものを意味するために使用される。

40

【0045】

一実施形態において、本発明の抗体カクテルは、HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13、およびHMB-DV14からなる群から選択される2つ以上の抗体を含む。別の実施形態において、本発明のカクテルは、HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-

50

D V 1 2、H M B - D V 1 3、および H M B - D V 1 4 からなる群から選択される 3 つの抗体を含む。さらに別の実施形態において、本発明の抗体カクテルは、H M B - D V 1、H M B - D V 2、H M B - D V 3、H M B - D V 4、H M B - D V 5、H M B - D V 6、H M B - D V 7、H M B - D V 8、H M B - D V 9、H M B - D V 1 0、H M B - D V 1 1、H M B - D V 1 2、H M B - D V 1 3、および H M B - D V 1 4 からなる群から選択される、3 つを超える、例えば、4、5、6、7、または 8 つの抗体を含む。例示的な実施形態において、本発明のカクテルは、H M B - D V 5、H M B - D V 6、および H M B - D V 8 を含む。

【 0 0 4 6 】

本発明は、本発明の抗体に結合可能なエピトープに結合する、抗体、またはその断片をさらに含む。本発明はまた、本発明の抗体と競合する抗体または抗体断片を含む。

10

【 0 0 4 7 】

別の態様において、本発明はまた、軽鎖および重鎖の一部またはすべてならびに本発明の抗体の C D R をコードする核酸配列も含む。一実施形態において、本発明による核酸配列は、本発明の抗体の重鎖または軽鎖をコードする核酸と少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % の相同性を有する核酸配列を含む。別の実施形態において、本発明の核酸配列は、本発明の抗体の重鎖 C D R または軽鎖 C D R をコードする核酸の配列を有する。例えば、本発明による核酸配列は、配列番号 7 ~ 1 2、2 3 ~ 2 8、3 9 ~ 4 4、5 5 ~ 6 0、7 3 ~ 7 8、8 9 ~ 9 4、1 0 1、1 0 2、1 1 1 ~ 1 1 6、1 2 6 ~ 1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 4 0 ~ 1 4 4、1 5 0、1 5 9 ~ 1 6 4、1 7 5 ~ 1 8 0、および 1 9 0 ~ 1 9 4 の核酸配列と少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 相同である配列を含む。

20

【 0 0 4 8 】

遺伝暗号の冗長性に起因して、同じアミノ酸配列をコードするこれらの配列の変異体が存在するであろう。これらの変異体は本発明の範囲内に含まれる。

【 0 0 4 9 】

変異抗体は本発明の範囲内に含まれる。したがって、本出願に列挙する配列の変異体もまた本発明の範囲内に含まれる。かかる変異体は、免疫応答の最中に生体内で、または不活化 B 細胞クローンを生体外で培養することで、体細胞変異が起こることにより生成される天然の変異体を含む。代替として、変異体は、上述したように遺伝暗号の縮重によって生じ得るか、または転写もしくは翻訳におけるエラーによって産生され得る。また、例えば F c 領域の抗体のエフェクター機能を修飾して、抗体の F c 受容体への結合を減少させるために、変異体が導入されてもよい。

30

【 0 0 5 0 】

向上した親和性および/または力価を有する抗体配列のさらなる変異体は、当該技術分野において知られる方法を使用して得ることができ、本発明の範囲内に含まれる。例えば、アミノ酸置換が、さらに向上した親和性を持つ抗体を得るために使用され得る。代替として、ヌクレオチド配列のコドン最適化は、抗体を産生するための発現系において翻訳の効率を向上させるために使用され得る。さらに、本発明の核酸配列のうちのいずれかに定向進化法を適用することにより、抗体特異性または中和活性のために最適化された配列を含むポリヌクレオチドも、本発明の範囲内である。

40

【 0 0 5 1 】

一実施形態において、変異体抗体の配列は、本出願において列挙される配列と 7 0 % 以上 (すなわち、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 以上) のアミノ酸配列相同性を共有し得る。いくつかの実施形態において、かかる配列相同性は、参照配列 (つまり、本出願に列挙した配列) の全長に関して算出される。いくつかのさらなる実施形態において、本明細書で言及される同一性の割合 (%) は、N C B I ( N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a

50

tion、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)によって指定される初期パラメータ [ Bl o s u m 62マトリックス、ギャップオープンペナルティ = 11およびギャップ伸長ペナルティ = 1 ] を使用する、BLASTバージョン2.1.3を用いて決定される。

#### 【0052】

ベクター、例えば、本発明による核酸配列を含む発現ベクターが、本発明の範囲内にさらに含まれる。かかるベクターで形質転換された細胞も、本発明の範囲内に含まれる。かかる細胞の例には、真核細胞、例えば、酵母細胞、動物細胞、または植物細胞が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、これらの細胞は、例えばヒト、CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髓腫細胞、またはハイブリドーマ細胞等の哺乳類細胞である。

10

#### 【0053】

本発明はまた、本発明の抗体と結合可能なエピトープに結合する、モノクローナル抗体にも関する。一実施形態において、本発明は、HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13、およびHMB-DV14からなる群から選択されるモノクローナル抗体と結合可能なエピトープに結合する、モノクローナル抗体を含む。

#### 【0054】

モノクローナルおよび組換え抗体は、個々のポリペプチドまたは抗体が対象とする他の抗原の識別および精製に特に有用である。本発明の抗体は、それらが、免疫測定法、放射免疫測定法 (RIA) または酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) において試薬として用いられ得るという点で、付加的な有用性を有する。これらの用途において、抗体は、放射性同位元素、蛍光分子、または酵素等の分析的に検出可能な試薬で標識することができる。また、これらの抗体は、抗原の分子的識別および特徴付け (エピトープマッピング) のためにも使用され得る。

20

#### 【0055】

本発明の抗体は、典型的にはグリコシル化される。例えば重鎖のC<sub>H</sub>2ドメインに結合したN結合グリカンは、C1qおよびFcRの結合に影響を及ぼすことができ、アグリコシル化抗体はこれらの受容体に対してより低い親和性を有する。このグリカンの構造は、活性にも影響を及ぼし得、例えば、グリカンの二分岐鎖の末端のガラクトース糖の数 (0、1、または2) に依存して、補体媒介細胞死に差異が見られ得る。抗体のグリカンは、好ましくは、投与後にヒトの免疫原性応答に至らない。

30

#### 【0056】

本発明の抗体は、治療部位への送達のために薬物に連結することができるか、または Dengueウイルスに感染した細胞等の目的の細胞を含む部位の画像化を容易にさせるように、検出可能な標識に連結することができる。薬物および検出可能な標識に抗体を連結するための方法は、検出可能な標識を使用して画像化するための方法のように、当該技術分野において知られている。標識された抗体は、様々な標識を用いる様々なアッセイで用いることができる。本発明の抗体と目的のエピトープ (DENVエピトープ) との抗体-抗原複合体の形成の検出は、抗体に検出可能な物質を結合させることによって容易にすることができる。適切な検出手段には、放射性核種、酵素、補酵素、蛍光体、化学発光物質、色素原、酵素基質または補助因子、酵素阻害薬、補欠分子族複合体、フリーラジカル、粒子、色素等の標識の使用が含まれる。適切な酵素の例には、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ、適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれ、適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが含まれ、発光物質の例は、ルミノールであり、生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含ま

40

50

れ、適切な放射性物質の例には、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、または $^3\text{H}$ が含まれる。かかる標識された試薬は、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、例えば、ELISA、蛍光免疫測定法等のよく知られる様々な測定法で使用され得る。

【0057】

本発明による抗体は、細胞毒、治療薬、または放射性金属イオンもしくは放射性同位元素等の治療部分に結合され得る。放射性同位元素の例としては、I - 131、I - 123、I - 125、Y - 90、Re - 188、Re - 186、At - 211、Cu - 67、Bi - 212、Bi - 213、Pd - 109、Tc - 99、In - 111等が挙げられるが、これらに限定されない。かかる抗体結合体は、所与の生物学的応答を改変するために使用することができ、薬物部分は、古典的な化学治療薬に制限されると解釈されるものではない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を持つタンパク質またはポリペプチドであり得る。かかるタンパク質は、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素、カリチアマイシン細菌毒素、またはジフテリア毒素等の毒素を含み得る。

10

【0058】

かかる治療部分を抗体に結合させる技術はよく知られている。例えば、Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243 - 256、ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery, ed. Robinson et al. (2nd ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623 - 653、Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al. pp. 475 - 506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985)、"Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp. 303 - 316、およびThorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62: 119 - 158。

20

30

【0059】

代替として、抗体は、参考文献4に記載されるように、第2の抗体に結合させて、抗体のヘテロ結合体を形成することができる。また、標識と本発明の抗体との間にリンカーを使用することもできる[5]。抗体、またはその抗原結合断片は、当該技術分野において知られる放射性ヨード、インジウム、イットリウム、または他の放射性粒子で直接標識され得る[6]。治療は、同時に投与またはその後投与される抱合抗体と非抱合抗体の治療の組み合わせからなり得る[7、8]。

40

【0060】

本発明の抗体はまた、固体支持体にも結合され得る。

【0061】

さらに、本発明の抗体またはその機能的抗体断片は、ポリマーへの共有結合により化学修飾することで、例えば、循環半減期を増大させることができる。ポリマーの例、およびそれらをペプチドに結合させる方法は、参考文献9~12に示される。いくつかの実施形態において、ポリマーは、ポリオキシエチル化されたポリオールおよびポリエチレングリコール(PEG)から選択され得る。PEGは、室温で水溶性であり、一般式： $\text{R}(\text{O}-$

50

-CH<sub>2</sub>- -CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-Rを有し、式中、Rは、水素、またはアルキル基もしくはアルカノール基等の保護基であり得る。一実施形態において、保護基は、1から8個の炭素を有し得る。さらなる実施形態において、保護基はメチル基である。記号nは、正の整数である。一実施形態において、nは1~1,000である。別の実施形態において、nは2~500である。一実施形態において、PEGは、1,000~40,000の平均分子量を有する。さらなる実施形態において、PEGは、2,000~20,000の分子量を有する。またさらなる実施形態において、PEGは、3,000~12,000の分子量を有する。一実施形態において、PEGは、少なくとも1つのヒドロキシ基を有する。別の実施形態において、PEGは、末端ヒドロキシ基を有する。さらに別の実施形態において、このヒドロキシ基は、阻害剤の遊離アミノ基と反応するように活性化された末端ヒドロキシ基である。しかしながら、反応基の型および量は、本発明の共有結合されたPEG/抗体を達成するために変化し得ることが理解される。

#### 【0062】

本発明の抗体は、非修飾抗体と比較して、FcRnに対する抗体の結合親和性および/または血中半減期を変化させるために、重鎖のCH<sub>2</sub>もしくはCH<sub>3</sub>ドメインの特定の領域にランダムアミノ酸変異を導入することによって修飾され得る。かかる修飾の例には、アミノ酸残基250、314、および428からなる群から選択される重鎖定常領域からの少なくとも1つのアミノ酸の置換が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0063】

また、水溶性ポリオキシエチル化ポリオールも本発明において有用である。それらは、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、ポリオキシエチル化グリセロール(POG)等を含む。一実施形態において、POGが用いられる。いずれの理論にも拘束されるものではないが、ポリオキシエチル化グリセロールのグリセロール骨格は、例えば、動物およびヒトにおいて、モノ-、ジ-、トリグリセリド中に自然に発生する骨格と同じであるため、この分岐は、必ずしも体内において異質の物質であるとは見なされない。いくつかの実施形態において、POGは、PEGと同程度の分子量を有する。POGの構造は、参考文献13に示され、POG/IL-2抱合体の説明は、参考文献9に見出される。

#### 【0064】

循環半減期を増大させるために使用され得る別の薬物送達系は、リポソームである。リポソーム送達系を調製する方法は、参考文献14、15、および16に説明されている。他の薬物送達系は、当該技術分野において知られており、例えば、参考文献17および18に記載される。

#### 【0065】

本発明の抗体は、精製された形態で提供される。典型的には、本抗体は、他のポリペプチドを実質的に含まない組成物中に存在し、例えば本組成物の90重量%未満、通常60重量%未満、さらに通常は50重量%未満が他のポリペプチドで構成される。

#### 【0066】

本発明の抗体は、非ヒト(または異種)宿主、例えばマウスにおいて免疫原性であり得る。具体的には、これらの抗体は、非ヒト宿主において免疫原性であるが、ヒト宿主においては免疫原性でないイディオトープを有し得る。ヒト用の本発明の抗体は、マウス、ヤギ、ウサギ、ラット、非霊長類哺乳動物等の宿主から容易に単離することができない抗体、およびヒト化によって、または異種マウスから概して得ることができない抗体を含む。

#### 【0067】

本発明の抗体は、任意のアイソタイプ(例えばIgA、IgG、IgM、すなわち、 $\mu$ 重鎖)であり得るが、概してIgGである。IgGアイソタイプ内で、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブクラスであり得る。一実施形態において、本抗体はIgG1である。本発明の抗体は、 $\mu$ または $\kappa$ 軽鎖を有し得る。

#### 【0068】

DENV-中和組換えつまり改変された二重特異抗体分子またはその抗原結合断片が、

10

20

30

40

50

本発明の範囲に含まれる。かかる抗体および断片は、第1の Dengue ウイルス血清型上のエピトープに対する第1の結合部位と、同じ Dengue ウイルス血清型または異なる、例えば、第2、第3、もしくは第4の Dengue ウイルス血清型上の第2のエピトープに対する第2の結合部位と、を含み得る。それぞれの結合部位の変動ドメインは、本発明の免疫グロブリンアイソタイプとして、あるいはヘテロ二量体性の Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、ScFv、または1つもしくは複数のペプチドリンカーを介してともに連結され得る二重特異性抗体として形成され得る。

#### 【0069】

抗体の産生

本発明によるモノクローナル抗体は、当該技術分野において知られるどんな方法によっても作製可能である。ハイブリドーマ技術を用いてモノクローナル抗体を作製するための、一般的な方法論がよく知られている [19、20]。好ましくは、参考文献21に記載される代替的なEBV不活化方法が使用される。

#### 【0070】

参考文献21に記載される方法を使用して、本発明の抗体を産生する不活化B細胞は、多クローン性B細胞活性化因子の存在下においてEBVで形質転換することができる。EBVでの形質転換は標準的な技術であり、多クローン性B細胞活性化因子を含むように容易に適合することができる。

#### 【0071】

細胞増殖および分化の付加的な刺激薬を、任意で、効率をさらに増強させるために形質転換ステップ時に添加することができる。これらの刺激薬は、IL-2およびIL-15等のサイトカインであり得る。一態様において、不活化効率をさらに向上させるために、不活化ステップの最中にIL-2が添加されるが、その使用は必須ではない。

#### 【0072】

次いで、これらの方法を使用して産生した不活化B細胞を、当該技術分野において知られている方法を使用して培養し、抗体をそこから単離することができる。

#### 【0073】

また本発明の抗体は、英国特許出願第0819376.5号に記載される方法を使用して、マイクロウェル培養プレートにおいて単一形質細胞を培養することによっても作製することができる。さらに、単一形質細胞の培養物から、RNAを抽出することができ、当該技術分野において知られる方法を使用して、単細胞PCRを行うことができる。この抗体のVHおよびVL領域をRT-PCRにより増幅し、配列決定を行い、発現ベクター中にクローン化し、次いで、HEK293T細胞または他の宿主細胞にトランスフェクトすることができる。発現ベクターにおける核酸のクローン化、宿主細胞のトランスフェクション、トランスフェクトした宿主細胞の培養、および産生された抗体の単離は、当業者に知られている任意の方法を使用して行うことができる。

#### 【0074】

モノクローナル抗体は、所望される場合、濾過、遠心分離、およびHPLCまたは親和性クロマトグラフィ等の種々のクロマトグラフ法を使用してさらに精製され得る。製薬等級抗体を産生するための技術を含む、モノクローナル抗体を精製する技術は、当該技術分野において知られている。

#### 【0075】

本発明のモノクローナル抗体の断片は、ペプシンもしくはパイン等の酵素による消化を含む方法によって、および/または化学的還元によるジスルフィド結合の切断によって、モノクローナル抗体から得ることができる。代替として、モノクローナル抗体の断片は、重鎖または軽鎖の配列の一部のクローニングおよび発現によって得ることができる。抗体「断片」は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFv断片を含み得る。本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖に由来する単鎖Fv断片(scfv)も包含し、例えば、本発明は、本発明の抗体のCDRを含むscfvを含む。重鎖または軽鎖単量体および二量体、ならびに単鎖抗体、例えば、重鎖および軽鎖可変ドメイン

10

20

30

40

50

がペプチドリンカーによって連結される単鎖 Fv も含まれる。

【0076】

分子生物学の標準的な技術を使用して、本発明の抗体またはこの抗体の断片もしくは変異体をコードする DNA 配列を調製することができる。所望の DNA 配列を、オリゴヌクレオチド合成技術を使用して、完全にまたは部分的に合成することができる。部位特異的変異誘発およびポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術を必要に応じて使用することができる。

【0077】

任意の適切な宿主細胞 / ベクター系を、本発明の抗体分子またはその断片をコードする DNA 配列の発現のために使用することができる。Fab および F(ab')<sub>2</sub> 断片、特に Fv 断片および単鎖抗体断片、例えば、単鎖 Fv 等の抗体断片の発現のために、細菌、例えば大腸菌の系、および他の微生物系が部分的に使用され得る。真核生物、例えば哺乳類の宿主細胞発現系は、完全な抗体分子を含む、より大きな抗体分子の産生のために使用され得る。適切な哺乳類宿主細胞には、CHO、HEK293T、PER.C6、NS0、骨髄腫細胞、またはハイブリドーマ細胞が含まれる。

10

【0078】

本発明はまた、本発明の抗体を産生するための工程も提供し、該工程は、本発明の抗体をコードする DNA からタンパク質の発現をもたらすのに適した条件下で、本発明のベクターを含む宿主細胞を培養するステップと、抗体分子を単離するステップと、を含む。

【0079】

抗体分子は、重鎖または軽鎖ポリペプチドのみを含み得、その場合においては、重鎖または軽鎖ポリペプチドコード配列のみを、宿主細胞をトランスフェクトするために使用する必要がある。重鎖および軽鎖の両方を含む産物を産生するために、細胞系は、軽鎖ポリペプチドをコードする第1のベクターおよび重鎖ポリペプチドをコードする第2のベクターの2つのベクターをトランスフェクトされ得る。代替として、単一ベクターが使用され得、該ベクターは、軽鎖および重鎖ポリペプチドをコードする配列を含む。

20

【0080】

代替として、本発明による抗体は、i) 細胞内で本発明による核酸配列を発現するステップ、および ii) その発現された抗体産物を単離するステップによって産生され得る。加えて、この方法は、iii) 抗体を精製するステップを含み得る。

30

【0081】

B細胞のスクリーニングおよび単離

形質転換されたB細胞を、所望の抗原特異性の抗体を産生するものに対してスクリーニングすることができ、次いで、個々のB細胞クローンは、陽性細胞から産生することができる。

【0082】

スクリーニングステップは、ELISA、組織もしくは細胞（感染細胞またはトランスフェクト細胞を含む）の染色、中和アッセイ、または所望の抗原特異性を識別するための当該技術分野において知られる多くの他の方法のうちの一つによって行われ得る。本アッセイは、単純抗原認識に基づいて選択し得るか、または、例えば、抗原結合抗体だけではなく中和抗体を選択し、標的細胞の特徴、たとえば、それらのシグナリングカスケード、それらの形、それらの増殖速度、他の細胞に影響するそれらの能力、他の細胞もしくは他の試薬または条件の変化による影響に対するそれらの応答、それらの分化状態等を変化させることができる抗体を選択する等のような、所望の機能にさらに基づいて選択され得る。

40

【0083】

陽性細胞の混合物から個々のクローンを分離するクローニングステップは、限界希釈法、顕微操作、細胞分類による単細胞沈着、または当該技術分野において知られる別の方法を使用して行うことができる。

【0084】

50

本発明の不死化B細胞クローンは、例えば、モノクローナル抗体源として、研究のための目的のモノクローナル抗体をコードする核酸(DNAまたはmRNA)源等として、種々の方法で使用することができる。

【0085】

本発明は、不死化Bメモリー細胞を含む組成物を提供し、該細胞は、1つもしくは複数の Dengue ウイルス血清型を中和する抗体を産生し、該抗体は、1日当たり細胞につき5 pg以上産生される。本発明はまた、不死化Bメモリー細胞のクローンを含む組成物を提供し、該クローンは、1つもしくは複数の Dengue ウイルス血清型を中和するモノクローナル抗体を産生し、該抗体は、1日当たり細胞につき5 pg以上産生される。

【0086】

本発明による例示的な不死化B細胞クローンには、HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13、およびHMB-DV14が含まれるが、これらに限定されない。

【0087】

エピトープ

上記のように、本発明の抗体は、それらが結合するエピトープをマッピングするために使用することができる。本発明の抗体によって認識されるエピトープには、いくつかの用途があり得る。精製された形態または合成形態でのエピトープおよびそのミモトープは、免疫学的応答を惹起するため(すなわち、ワクチンとして、または他の用途のために抗体を産生するため)、またはエピトープもしくはそのミモトープと免疫反応する抗体を求めて患者の血清をスクリーニングするために使用することができる。一実施形態において、かかるエピトープもしくはミモトープ、またはかかるエピトープもしくはミモトープを含む抗原は、免疫反応を向上させるためのワクチンとして使用され得る。本発明の抗体および抗原結合断片はまた、ワクチンの品質を監視する方法においても使用することができる。具体的には、本抗体を使用して、ワクチン中の抗原が正しい構造にある特異的エピトープを含有していることを確認することができる。

【0088】

また、エピトープは、該エピトープに結合するリガンドのスクリーニングにおいても有用であり得る。かかるリガンドには、ラクダ、サメおよび他の種由来のものを含む抗体、抗体の断片、ペプチド、ファージディスプレイ技術の産物、アプタマー、アドネクチン、合成化合物、またはエピトープをブロックして、感染を予防することができる他のウイルスもしくは細胞タンパク質の断片が含まれるが、これらに限定されない。このようなリガンドは、本発明の範囲内に包含される。

【0089】

組換え発現

また、本発明の不死化Bメモリー細胞は、その後の組換え発現に対する抗体遺伝子のクローニングのために核酸源としても使用し得る。組換え源からの発現は、例えば、安定性、再現性、培養の容易さ等の理由で、不死化B細胞またはハイブリドーマからの発現よりも、医薬目的上より一般的である。

【0090】

したがって、本発明は、組換え細胞を調製するための方法を提供し、(i)目的の抗体をコードするB細胞クローンから1つもしくは複数の核酸(例えば、重鎖および/または軽鎖遺伝子)を得るステップと、(ii)発現宿主内において目的の抗体の発現を可能にするように、その宿主に該核酸を挿入するステップとを含む。

【0091】

同様に、本発明は、組換え細胞を調製するための方法を提供し、(i)目的の抗体をコードするB細胞クローンから核酸を配列決定するステップと、(ii)ステップ(i)からの配列情報を使用して、発現宿主内における目的の抗体の発現を可能にするように、そ

10

20

30

40

50

の宿主内に挿入するために核酸を調製するステップとを含む。制限酵素部位を導入するため、コドン使用頻度を変更するため、転写および/もしくは翻訳制御配列を最適化するため、ならびに/またはエフェクター機能を改変するために、ステップ(i)と(ii)との間で核酸を操作することができるが、それは必要ではない。

【0092】

また、本発明は、組換え細胞を調製する方法を提供し、目的のモノクローナル抗体をコードする1つもしくは複数の核酸で宿主細胞を形質転換するステップを含み、該核酸は、本発明の不死化B細胞クローンに由来する核酸である。したがって、まず核酸を調製し、次いでそれを使用して宿主細胞を形質転換するための手順は、異なる場所(例えば、異なる国)で異なる人々によって異なる時間に行うことができる。

10

【0093】

次いで、本発明のこれらの組換え細胞を、発現および培養目的で 사용할 ことができる。それらは、大規模な薬剤生産のための抗体の発現に特に有用である。また、それらは、薬学的組成物の活性成分としても使用することができる。任意の適切な培養技術を使用することができるが、その技術には、静置培養、ローラーボトル培養、腹水、中空系型バイオリアクターカートリッジ、モジュラーミニファーマンター、攪拌槽、マイクロキャリア培養、セラミック中子灌流等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0094】

B細胞から免疫グロブリン遺伝子を得る、および配列決定するための方法は、当該技術分野においてよく知られている(例えば、参考文献22を参照)。

20

【0095】

発現宿主は、好ましくは酵母および動物細胞を含む真核細胞、特に哺乳類細胞(例えば、CHO細胞、NS0細胞、PER.C6[Cruce11、参考文献23]またはHK2-11[Bayer、参考文献24および25]細胞等のヒト細胞、骨髄腫細胞[26および27]等)、ならびに植物細胞である。好適な発現宿主は、特に、それ自体ではヒトにおいて免疫原性ではない糖鎖構造を用いて、本発明の抗体をグリコシル化することができる。一実施形態において、発現宿主は、無血清培地で増殖することができる。さらなる実施形態において、発現宿主は、動物由来産物が存在しない培養物中で増殖することができる。

【0096】

発現宿主は、細胞系を得るために培養され得る。

30

【0097】

本発明は、目的の抗体をコードする1つもしくは複数の核酸分子(例えば重鎖および軽鎖遺伝子)を調製するための方法を提供し、該方法は、(i)本発明による不死化B細胞クローンを調製するステップと、(ii)不死化B細胞クローンから目的の抗体をコードする核酸を得るステップと、を含む。本発明はまた、目的の抗体をコードする核酸配列を得るための方法を提供し、該方法は、(i)本発明による不死化B細胞クローンを調製するステップと、(ii)目的の抗体をコードする不死化B細胞クローンからの核酸を配列決定するステップと、を含む。

【0098】

また、本発明は、目的の抗体をコードする核酸分子を調製する方法も提供し、該方法は、本発明の形質転換されたB細胞から得られたB細胞クローンから核酸を得るステップを含む。したがって、最初に、B細胞クローンを得、次いで、それから核酸を調製する手順は、異なる場所(例えば、異なる国)で異なる人々によって異なる時間に行うことができる。

40

【0099】

本発明は、(例えば医薬用途のために)抗体を調製するための方法を提供し、該方法は、(i)1つもしくは複数の核酸(例えば重鎖および軽鎖遺伝子)を得る、および/または配列決定するステップと、(ii)ステップ(i)からの配列情報を使用して、発現宿主内での目的の抗体の発現を可能にするために、発現宿主に挿入するための核酸を調製す

50

るステップと、( i i i ) 目的の抗体が発現される条件下で、発現宿主を培養または継代培養するステップと、任意に、( i v ) 目的の抗体を精製するステップと、を含む。この核酸は、目的の抗体を発現する不死化 B 細胞クローンから得る、および/または配列決定することができるが、そうである必要はない。一実施形態において、ステップ ( i ) からの核酸は、任意で、抗体のアミノ酸配列に所望の置換を導入するように修飾されてもよい。

【 0 1 0 0 】

本発明はまた、抗体を調製する方法も提供し、該方法は、目的の抗体が発現される条件下で、発現宿主細胞集団を培養または継代培養するステップと、任意で、目的の抗体を生成するステップと、を含み、該発現宿主細胞集団は、( i ) 目的の抗体をコードする核酸を提供することと、( i i ) 目的の抗体を発現することができる発現宿主に核酸を挿入することと、( i i i ) 該挿入された核酸を含む発現宿主を培養または継代培養して、該発現宿主細胞集団を産生することと、により、調製された。

10

【 0 1 0 1 】

薬学的組成物

本発明は、本発明の抗体および/もしくは抗体断片、ならびに/またはかかる抗体をコードする核酸、ならびに/またはかかる抗体を発現する不死化 B 細胞、ならびに/または本発明の抗体により認識されるエピトープを含有する薬学的組成物を提供する。また、薬学的組成物は、投与を可能にするように、薬学的に許容される担体も含有し得る。この担体は、それ自体が、該組成物を受け取る個人に有害である抗体の産生を誘導すべきではなく、毒性であるべきではない。適切な担体は、タンパク質、ポリペプチド、リボソーム、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、および不活性ウイルス粒子等の大型かつ代謝速度が遅い巨大分子であり得る。

20

【 0 1 0 2 】

薬学的に許容される塩には、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、および硫酸塩等の鉱酸塩、または酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩および安息香酸塩等の有機酸の塩を使用することができる。

【 0 1 0 3 】

治療用組成物中の薬学的に許容される担体は、水、生理食塩水、グリセロール、およびエタノール等の液体をさらに含有し得る。加えて、湿潤剤もしくは乳化剤または pH 緩衝物質等の補助物質がかかる組成物中に存在し得る。かかる担体によって、患者による経口摂取のために、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、および懸濁液として、薬学的組成物を製剤化することが可能になる。

30

【 0 1 0 4 】

本発明の範囲内で、投与形態は、例えば、注射または注入による、例えば、ポラス投与または持続注入による非経口投与に適した形態を含み得る。製品が注射または注入のためのものである場合、それは、油性または水性ビヒクル中で懸濁液、溶液または乳濁液の形態を取り得、そしてそれは、懸濁剤、防腐剤、安定剤および/または分散剤等の製剤化剤を含有し得る。代替として、抗体分子は、適切な滅菌液で使用前に再構成される、乾燥状態であり得る。

40

【 0 1 0 5 】

製剤化され次第、本発明の組成物は、対象に直接投与することができる。一実施形態において、本発明の組成物は、ヒト対象への投与に適合されることが好ましい。

【 0 1 0 6 】

本発明の薬学的組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、腹腔内、くも膜下腔内、脳室内、経皮 (transdermal)、経皮 (transcutaneous)、局所、皮下、鼻腔内、腸内、舌下、腔内、または直腸経路を含むが、これらに限定されないあらゆる経路によって投与され得る。また、本発明の薬学的組成物を投与するためにハイポスプレーも使用され得る。典型的には、本治療用組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとしての注入物質として調製され得る。また、注入前に、液体ビヒクル中の溶液または懸濁液に適した固形も

50

調製され得る。

【0107】

これらの組成物の直接的な送達は、概して、注射、皮下、腹腔内、静脈内、もしくは筋肉内送達によって達成されるか、または組織の間質腔に送達される。投薬治療は、単回投与スケジュールまたは複数回投与スケジュールであってもよい。既知の抗体ベースの医薬品は、例えば、医薬品を毎日、毎週、毎月等送達すべきかどうか等の投与頻度に関する手引きを提供する。また、頻度および用量は、症状の重症度にも依存し得る。

【0108】

本発明の組成物は種々の形態で調製され得る。例えば、これらの組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとしての注入物質として調製され得る。また、注入前に、液体ビヒクル中の溶液または懸濁液に適した固形も調製することができる（例えば、防腐剤を含有する滅菌水と再構成される、シナジス（Synagis（登録商標））およびハーセプチン（Herceptin（登録商標））等の凍結乾燥された組成物）。本組成物は、局所投与のために、例えば、軟膏、クリームまたは粉末として調製され得る。本組成物は、経口投与のために、例えば、錠剤もしくはカプセルとして、スプレーとして、またはシロップ（任意に、香味づけたもの）として調製され得る。本組成物は、微粉末またはスプレーを使用して、肺内投与のために例えば吸入剤として調製され得る。本組成物は、坐薬または腔坐薬として調製され得る。本組成物は、経鼻、経耳、または経眼投与のために、例えば、ドロップとして調製され得る。本組成物は、組み合わせられた組成物が、患者への投与直前に再構成できるように設計されたキット形態であり得る。例えば、凍結乾燥された抗体は、滅菌水または滅菌緩衝液を有するキット形態で提供することができる。

10

20

【0109】

本組成物中の有効成分が、抗体分子、抗体断片、またはその変異体および誘導体であることが理解されよう。したがって、それは、胃腸管における分解に影響されやすい。したがって、本組成物が胃腸管を用いた経路によって投与されるのであれば、本組成物は、分解から抗体を保護するが、それが胃腸管から吸収され次第、抗体を放出する薬物を含有する必要がある。

【0110】

薬学的に許容される担体についての詳細な説明は、Gennaro（2000）Remington：The Science and Practice of Pharmacy，20th edition，ISBN：0683306472において入手可能である。

30

【0111】

本発明の薬学的組成物は、通常、5.5から8.5の間のpHを有し、いくつかの実施形態において、6から8の間であり得、さらなる実施形態においては7であり得る。緩衝液の使用によりpHを維持することができる。本組成物は、無菌であり得るか、および/またはピロゲンを含み得ない。本組成物は、ヒトに対して等張性であり得る。一実施形態において、本発明の薬学的組成物は、密封容器中に入れて供給される。

【0112】

薬学的組成物は、本発明の1つもしくは複数の抗体、および/または本発明の抗体を結合するエピトープを含むポリペプチドの治療有効量、すなわち、所望の疾患もしくは状態を治療する、寛解させる、もしくは予防するのに十分な、または検出可能な治療効果を呈するのに十分な量を含む。また、治療効果は、身体症状の軽減も含む。任意の特定の対象に対する正確な有効量は、対象のサイズおよび健康、症状の性質および程度、ならびに投与のために選択された治療薬または治療薬の組み合わせに依存する。所与の状況に対する有効量は、日常的な実験によって決定され、臨床従事者の判断内にある。本発明の目的で、有効用量は、概して、投与される個人において、約0.01mg/kgから約50mg/kg、または約0.05mg/kgから約10mg/kgの本発明の組成物である。既知の抗体ベースの医薬品は、この点における手引きを提供し、例えば、ハーセプチン（Herceptin）（登録商標）は、21mg/mLの溶液の静脈内注入によって投与され、初期負

40

50

荷用量は体重 1 k g あたり 4 m g であり、毎週の維持量は体重 1 k g あたり 2 m g であり、リツキサン(Rituxan) (登録商標) は、3 7 5 m g / m<sup>2</sup> を毎週投与される等である。

【 0 1 1 3 】

一実施形態において、薬学的組成物は、本発明の 2 種以上の (例えば 2 種、3 種、4 種、5 種、6 種、7 種、8 種等) 抗体を含むことができる。別の実施形態において、本組成物は、2 種以上 (例えば 2 種、3 種、4 種、5 種等) の抗体を含み、第 1 の抗体は第 1 の D E N V エピトープに特異的であり、第 2 の抗体は第 2 の D E N V エピトープに特異的である。さらに別の実施形態において、薬学的組成物は、本発明の 3 種の抗体を含む。別の実施形態において、本組成物は、2 種以上の Dengue ウイルス血清型をともに中和する、2 種以上 (例えば 2 種、3 種、4 種、5 種等) の抗体を含む。さらに別の実施形態において、本発明の 2 種以上の抗体は、4 種すべての Dengue ウイルス血清型、D E N V - 1、D E N V - 2、D E N V - 3、および D E N V - 4 をともに中和する。さらなる実施形態において、本発明の 2 種以上の抗体は、各 Dengue ウイルス血清型上の少なくとも 2 つの明確に異なるエピトープに結合することによって、4 種のすべての Dengue ウイルス血清型をともに中和する。

10

【 0 1 1 4 】

Dengue ウイルス感染の抗体依存性増強の一因となることなく、Dengue ウイルスを中和する薬学的組成物において使用するための本発明の例示的な抗体には、H M B - D V 1、H M B - D V 2、H M B - D V 3、H M B - D V 4、H M B - D V 5、H M B - D V 6、H M B - D V 7、H M B - D V 8、H M B - D V 9、H M B - D V 1 0、H M B - D V 1 1、H M B - D V 1 2、H M B - D V 1 3、および H M B - D V 1 4 が含まれるが、これらに限定されない。

20

【 0 1 1 5 】

一実施形態において、薬学的組成物は、本発明の 2 つの例示的な抗体、例えば、H M B - D V 3 および H M B - D V 7、H M B - D V 3 および H M B - D V 9、H M B - D V 3 および H M B - D V 1 2、H M B - D V 3 および H M B - D V 1 4、H M B - D V 6 および H M B - D V 7、H M B - D V 6 および H M B - D V 8 を含む。別の実施形態において、薬学的組成物は、本発明の 3 つの例示的な抗体、例えば、H M B - D V 2、H M B - D V 3、および H M B - D V 6 ; H M B - D V 2、H M B - D V 6、および H M B - D V 8 ; H M B - D V 2、H M B - D V 8、および H M B - D V 9 ; H M B - D V 2、H M B - D V 8、および H M B - D V 1 2 ; H M B - D V 2、H M B - D V 8、および H M B - D V 1 4 ; H M B - D V 5、H M B - D V 6、および H M B - D V 8 を含む。本明細書の教示の基づき、当業者は、薬学的組成物において使用するための抗体の他の組み合わせを決定することができる。

30

【 0 1 1 6 】

一実施形態において、本発明は、抗体 H M B - D V 1 またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、抗体 H M B - D V 2 またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、抗体 H M B - D V 3 またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、抗体 H M B - D V 4 またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。さらに別の実施形態において、本発明は、抗体 H M B - D V 5 またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、抗体 H M B - D V 6 またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、抗体 H M B - D V 7 またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。

40

【 0 1 1 7 】

さらに別の実施形態において、本発明は、抗体 H M B - D V 8 またはその抗原結合断片

50

と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、抗体HMB-DV9またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、抗体HMB-DV10またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。さらに別の実施形態において、本発明は、抗体HMB-DV11またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、抗体HMB-DV12またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明は、抗体HMB-DV13またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。さらに別の実施形態において、本発明は、抗体HMB-DV14またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む、薬学的組成物を提供する。

#### 【0118】

本発明の抗体は、他の治療薬、例えば化学療法化合物、放射線療法等とともに、（組み合わせまたは別個に）投与することができる。好ましい治療化合物には、抗ウイルス化合物が含まれる。かかる併用療法は、単独で投与する場合に、個々の治療薬に対する治療効果の相加的または相乗的向上を提供する。本明細書で使用される「相乗作用」という用語は、各それぞれの活性薬剤の個々の効果の和よりも大きい2つ以上の活性薬剤の併用効果を説明するために使用する。したがって、2つ以上の薬剤の併用効果が活性または工程の「相乗的阻害」をもたらす場合、活性または工程の阻害が、各それぞれの活性薬剤の阻害効果の和よりも大きいことを意図する。本明細書で使用される「相乗的治療効果」という用語は、2つ以上の治療の組み合わせで観察された治療効果を指し、治療効果（いくつかのパラメータのいずれかによって測定されたような）は、それぞれ個々の治療で観察された個々の治療効果の和よりも大きい。

#### 【0119】

本発明の抗体を含む本発明の組成物では、これらの抗体は、本組成物中の総タンパク質の少なくとも50重量%（例えば60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%以上）を占め得る。したがって、これらの抗体は、精製された形態である。

#### 【0120】

本発明は、医薬品を調製する方法を提供し、該方法は、（i）本発明の抗体を調製するステップと、（ii）精製した抗体を1つもしくは複数の薬学的に許容される担体と混合するステップと、を含む。

#### 【0121】

また、本発明は、医薬品を調製する方法も提供し、該方法は、抗体を1つもしくは複数の薬学的に許容される担体と混合するステップを含み、その抗体は、本発明の形質転換されたB細胞から得られたモノクローナル抗体である。したがって、まずモノクローナル抗体を得、次いで医薬品を調製する手順は、異なる場所（例えば、異なる国）で異なる人々によって異なる時間に行うことができる。

#### 【0122】

治療目的のために抗体を送達することの代替として、核酸が対象内の原位置で発現され、所望の治療効果を提供できるように、目的のモノクローナル抗体（またはその活性断片）をコードする核酸（典型的にはDNA）を対象に送達することが可能である。適切な遺伝子治療法および核酸送達ベクターは、当該技術分野において知られている。

#### 【0123】

本発明の組成物は、免疫原性組成物であり得、いくつかの実施形態においては、DENVEピトープを含む抗原を含むワクチン組成物であってもよい。本発明によるワクチンは、予防のため（つまり、感染を防止するため）または治療のため（つまり、感染を治療するため）のいずれかであり得る。

10

20

30

40

50

## 【0124】

組成物は、特に複数回投与形式でパッケージされる場合に、抗菌薬を含み得る。組成物は、界面活性剤、例えば Tween 80 等の Tween (ポリソルベート) を含むことができる。界面活性剤は、概して低レベル、例えば 0.01% 以下で存在する。組成物は、浸透圧を得るためにナトリウム塩 (例えば、塩化ナトリウム) を含む得る。10 ± 2 mg / mL の NaCl の濃度が典型的である。

## 【0125】

組成物は、特に、それらが凍結乾燥されるか、またはそれらが、凍結乾燥された材料から再構成された材料を含む場合、糖アルコール (例えばマンニトール)、または二糖 (例えばスクロースまたはトレハロース) を、例えば約 15 ~ 30 mg / mL (例えば 25 mg / mL) で含む得る。凍結乾燥のための組成物の pH は、凍結乾燥前に約 6.1 に調整され得る。

10

## 【0126】

また、本発明の組成物は、1つもしくは複数の免疫調節剤も含み得る。一実施形態において、免疫調節剤のうちの一つもしくは複数は、アジュバントを含む。

## 【0127】

医学的治療および用途

本発明の抗体、抗原結合断片、その誘導体および変異体、またはカクテル、ならびに薬学的組成物は、DENV 感染の治療、DENV 感染の予防、または DENV 感染の診断のために使用することができる。

20

## 【0128】

診断方法は、抗体または抗体断片を試料と接触させることを含む。かかる試料は、例えば、唾液腺、肺、肝臓、膵臓、腎臓、耳、眼、胎盤、消化管、心臓、卵巣、下垂体、副腎、甲状腺、脳または皮膚から取った組織試料であり得る。また、本診断方法は、抗原 / 抗体複合体の検出も含む。

## 【0129】

したがって、本発明は、治療における使用のための (i) 本発明による抗体、抗体断片、もしくはその変異体および誘導体、(ii) 本発明による不死化 B 細胞クローン、(iii) 本発明の抗体に結合する能力を持つエピトープ、または (iv) 本発明の抗体に結合するエピトープに結合する能力を持つ、好ましくは抗体であるリガンドを提供する。

30

## 【0130】

また、対象を治療する方法であって、その対象に (i) 本発明による抗体、抗体断片、その変異体および誘導体、または薬学的組成物、あるいはリガンド、好ましくは本発明の抗体に結合するエピトープに結合可能な抗体を投与することを含む、方法も提供される。

## 【0131】

本発明はまた、DENV 感染の予防または治療のための薬物の製造における、(i) 本発明による抗体、抗体断片、またはその変異体および誘導体、(ii) 本発明による不死化 B 細胞クローン、(iii) 本発明の抗体に結合可能なエピトープ、あるいは (iv) リガンド、好ましくは本発明の抗体に結合可能なエピトープに結合する抗体の使用を提供する。

40

## 【0132】

本発明は、DENV 感染の予防または治療のための薬物として使用するための薬学的組成物を提供する。また、患者の治療および / または患者の診断のための薬物の製造における、本発明の抗体、および / またはかかる抗体が結合するエピトープを含むタンパク質の使用も提供する。また、対象、例えば、ヒト対象を治療するための方法も提供する。本方法は、対象に治療有効量の本発明の組成物を投与するステップを含む。治療処置の有効性を確認する一方法は、本発明の組成物の投与後に、疾患症状を監視するステップを包含する。治療は、単回投与スケジュールまたは複数回投与スケジュールで実施できる。

## 【0133】

一実施形態において、本発明による抗体、抗体断片、抗体変異体、エピトープ、または

50

薬学的組成物は、かかる治療を必要とする対象に投与される。かかる対象には、特に D E N V 感染の危険性があるか、または D E N V に感染し易い対象が含まれるが、それに限定されない。

【 0 1 3 4 】

本発明の抗体は、受動免疫において使用することができる。本発明に記載される抗体およびその断片もしくは変異体、あるいは抗体または抗体断片もしくは変異体をコードする核酸はまた、デングウイルス感染を診断するためのキットにおいても使用することができる。

【 0 1 3 5 】

本発明の抗体、例えば、モノクローナル抗体 H M B - D V 1、H M B - D V 2、H M B - D V 3、H M B - D V 4、H M B - D V 5、H M B - D V 6、H M B - D V 7、H M B - D V 8、H M B - D V 9、H M B - D V 10、H M B - D V 11、H M B - D V 12、H M B - D V 13、および H M B - D V 14 に結合する能力を持つエピトープは、防御的抗 D E N V 抗体の存在を検出することによりワクチン接種法の効率を監視するためのキットにおいて使用することができる。

10

【 0 1 3 6 】

また、本発明に記載される抗体、抗体断片、またはその変異体および誘導体は、所望の免疫原性を有するワクチン製造を監視するためのキットにおいて使用することもできる。

【 0 1 3 7 】

本発明はまた、薬学的組成物を調製する方法を提供し、該方法は、モノクローナル抗体を1つもしくは複数の薬学的に許容される担体と混合するステップを含み、このモノクローナル抗体は、本発明の発現宿主から得られたモノクローナル抗体である。したがって、まずモノクローナル抗体（例えばそれを発現するおよび/またはそれを精製する）を得て、次いでそれを薬学的担体と混合する手順は、異なる場所（例えば、異なる国）で異なる人々によって異なる時間に行うことができる。

20

【 0 1 3 8 】

本発明の形質転換された B 細胞から始めて、培養、継代培養、クローニング、サブクローニング、配列決定、核酸調製等の種々のステップを、各ステップで任意の最適化を用い、形質転換された B 細胞によって発現される抗体を永続化させるために行うことができる。好ましい実施形態において、上記の方法は、抗体をコードする核酸に適用される最適化の技術（例えば、親和性成熟または最適化）をさらに含む。本発明は、そのようなステップ時に使用および調製されるすべての細胞、核酸、ベクター、配列、抗体等を包含する。

30

【 0 1 3 9 】

これらのすべての方法において、発現宿主内で使用される核酸は、ある種の核酸配列を挿入、欠失、または修正するように、操作され得る。かかる操作からの変更には、制限酵素部位を導入するため、コドン使用頻度を変更するため、転写および/または翻訳制御配列を追加または最適化するため等の変更が含まれるが、これらに限定されない。また、コードされたアミノ酸を変化させるために、核酸を変更することも可能である。例えば、抗体のアミノ酸配列に1つもしくは複数（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個等）のアミノ酸置換、欠失、および/または挿入を導入するために有用であり得る。このような点変異は、エフェクター機能、抗原結合親和性、翻訳後修飾、免疫原性等を修飾することができるか、共有結合基（例えば標識）の結合のためにアミノ酸を導入することができるか、またはタグ（例えば精製目的で）を導入することができる。変異は、特異的部位に導入することができるか、または、ランダムに、その後の淘汰（例えば、分子進化）により導入することができる。例えば、本発明の抗体の C D R 領域、重鎖可変領域、または軽鎖可変領域のうちのいずれかをコードする1つもしくは複数の核酸に、無作為にまたは一方向に変異を導入して、コードしたアミノ酸に異なる特性をもたらすことができる。かかる変化は反復工程の結果であり得、最初の変化は保持されて、他のヌクレオチドの位置で新しい変化が導入される。さらに、独立したステップにおいて達成される変化を組み合わすことができる。コードされたアミノ酸にもたらされる異なる特性は、親和性の

40

50

増大を含むが、これに限定されない。

【0140】

一般

「含む (comprising)」という用語は、「含む (including)」、ならびに「からなる」を包含し、例えば、Xを「含む」組成物は、独占的にXからなるか、または、例えばX + Y等の何らかの付加的なものを含み得る。

【0141】

「実質的に」という用語は「完全に」を除外せず、例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まない可能性がある。必要であれば、「実質的に」という用語は本発明の定義から省略されてもよい。

10

【0142】

数値xに関連する「約」という用語は、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0143】

本明細書で用いる「疾患」という用語は、概して、正常機能を損ない、そして、典型的には、特徴的な徴候および症状によって顕在化し、ヒトもしくは動物の正常機能を損なわせる、ヒトもしくは動物の体の、またはその一部の異常な状態をすべてが反映するという点で、「障害」および「症状」(医学的症状等の場合)という用語と変換可能であり、それらと同じ意味で使用されることが意図されている。

【0144】

本明細書で使用される、患者の「治療」への言及は、予防および予防法、ならびに療法を含むことを意図する。「患者」という用語は、ヒトを含むすべての哺乳動物を意味する。概して、患者はヒトである。

20

【実施例】

【0145】

実施例

以下の実施例において、本発明の例示的な実施形態を提供する。以下の実施例は、単なる例示目的として、本発明を使用する当業者の補助となるように提示される。本実施例は、本発明の範囲を多少なりとも制限することを意図するものではない。

【0146】

実施例1．不死化B細胞のクローニングおよびデングウイルスに特異的なAbの識別のためのスクリーニング

30

メモリー不死化B細胞をDENV免疫ドナーの血液から単離し、参考文献に記載されるようにEBVおよびCpGを使用して不死化した。簡潔に述べると、IgG<sup>+</sup>メモリー不死化B細胞を、CD22ビーズを使用して単離し、その後、特異的抗体および細胞選別により、IgM<sup>+</sup>、IgD<sup>+</sup>、IgA<sup>+</sup>不死化B細胞を除去した。CpG2006の存在下において、分類した細胞(IgG<sup>+</sup>)をEBVで不死化し、同種単核細胞を照射した。SO-50メモリー不死化B細胞をそれぞれ含有する同型培養物を、いくつかの96ウェルU字形底プレートに配置した。2週間後、培養上清を収集し、免疫蛍光分析によって、血清型1、2、3、または4のDENVに感染したC6/36細胞を染色するそれらの能力、および/またはELISAによって、組換えDENV1-4 E2タンパク質に結合するそれらの能力について試験した。上清を、VERO細胞またはDC-SIGNをトランスフェクトしたRaji細胞のいずれかのDENV感染を中和するそれらの能力、およびK562細胞の感染を増強させるそれらの能力について試験した。不死化B細胞クローンを、すでに記載したように、陽性のポリクローナル培養物から単離した[28]。IgG特異的ELISAを用いて、選択されたクローンの上清中のIgG濃度を決定した。

40

【0147】

実施例2．不死化B細胞からのヒトmAbはデングウイルスタンパク質を認識し、感染を中和する。

ウイルス中和およびウイルス増強アッセイのために、滴定量の血清型1、2、3、または4の弱毒化DENVを、等容積の培養上清と混合した。使用したウイルスおよび感染多

50

重度 (MOI) は、rDEN1 30 (03JB186-1A+V2) MOI 0.04、rDEN2/4 30 (04JBV351-1A-V2) MOI 0.04、rDEN3/4 30 (DEN3#107C) MOI 0.02、rDEN4 30 (06JBV591-V3+1A1+v2) MOI 0.04であった。室温で1時間インキュベーションした後、混合物を、96ウェルの平底プレート中の標的細胞 (例えばVERO細胞、DC-SIGN-Raji細胞、またはK562細胞) に添加し、37℃で72~96時間インキュベートした。次いで、その細胞を、 Dengueウイルス1-4 Eタンパク質 (クローン4G2) に対するマウスモノクローナル抗体、その後フルオレセイン標識ヤギ抗マウスIgで染色し、FACSによって分析した。中和力価は、DENV感染の50%減少をもたらす抗体の濃度 (µg/mL) として示される。

10

【0148】

モノクローナル抗体によって認識される標的抗原の識別のために、DengueウイルスEタンパク質ドメインIIIもしくはドメインI-IIを示す酵母は、モノクローナル抗体、その後Cy5標識ヤギ抗ヒトIgG抗体で染色し、FACSによって分析した。DENV感染細胞の可溶化液を使用して、ウエスタンブロット実験を行った。

【0149】

表3は、3つの異なる種類の抗体が識別されたことを示す。これらには、Eタンパク質のドメインIII (DIII) に特異的であるもの、Eタンパク質のドメインI-II (DI-II) に特異的であるもの、およびprMに特異的であるものが含まれる。これらの抗体は、4つの異なるDENV血清型との異なる程度の交差反応を示し、それらの抗体が結合するこれらの血清型を中和する。

20

表3. 中和抗Dengueウイルス抗体の標的抗原特異性

【表3】

抗体	標的抗原	中和された Dengueウイルス血清型
HMB-DV-1	E, DIII	1,2,3
HMB-DV-2	E, DIII	1,3
HMB-DV-3	prM	1,2,3,4
HMB-DV-4	E, DI-II	1,2,3,4
HMB-DV-5	E, DI-II	1,2,3,4
HMB-DV-6	E, DIII	1,2,3
HMB-DV-7	E, DIII	1,2,3
HMB-DV-8	E	4
HMB-DV-9	E, DIII	2
HMB-DV-10	E, DIII	1,2,3,4
HMB-DV-11	E, DIII	1,2,3,4
HMB-DV-12	E, DI-DII	2
HMB-DV-13	E, DIII	1,2,3,4
HMB-DV-14	E, DIII	2

30

40

表4は、VERO細胞およびDC-SIGNトランスフェクトRaji細胞に対するウイルス中和アッセイの結果を示す。

50

表 4 . 抗体によるデングウイルス ( 血清型 D E N V 1 ~ D E N V 4 ) の中和  
【表 4】

抗体	細胞型	中和			
		EC <sub>50</sub> 値 (µg/ml)			
		DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
HMB-DV-1	VERO	0.013	0.577	0.014	> 20
	DC-SIGN-Raji	0.032	5.340	0.055	> 20
HMB-DV-2	VERO	0.006	> 20	0.006	> 20
	DC-SIGN-Raji	0.014	> 20	0.013	> 20
HMB-DV-3	VERO	0.912	1.615	0.120	0.070
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-4	VERO	0.591	0.251	0.809	0.367
	DC-SIGN-Raji	2.250	1.370	0.613	> 20
HMB-DV-5	VERO	0.066	0.034	0.118	0.200
	DC-SIGN-Raji	2.390	0.504	0.348	> 20
HMB-DV-6	VERO	0.008	0.002	0.011	> 20
	DC-SIGN-Raji	0.027	0.440	0.332	> 20
HMB-DV-7	VERO	0.016	0.004	0.020	> 20
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-8	VERO	> 20	> 20	> 20	0.006
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-9	VERO	> 20	0.002	> 20	> 20
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-10	VERO	> 20	0.084	> 20	0.466
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-11	VERO	> 20	0.048	> 20	0.520
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-12	VERO	ND	0.003	ND	ND
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-13	VERO	0.993	3.326	1.513	> 20
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-14	VERO	> 20	0.002	> 20	> 20
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND

ND : 測定せず

【 0 1 5 0 】

実施例 3 . F c 領域に変異を有する中和組換え抗デングウイルス抗体は K 5 6 2 細胞へのウイルス感染を増強させない。

デングウイルス感染の抗体依存性増強 ( A D E ) は、文献に記載されている。この特性は、臨床現場での使用に、抗デングウイルス抗体の治療有効性を制限しかねない。したがって、抗体 H M B - D V - 5、H M B - D V - 6、および H M B - D V - 8 を発現する不死化 B 細胞株から m R N A を単離し、オリゴ - d T 特異的プライマーを使用して c D N A を合成し、重鎖および軽鎖の可変領域を配列決定し、特異的プライマーを使用して発現ベクターにクローン化した。組換え発現のために、ベクターを宿主細胞にトランスフェクトした。また、野生型 I g G 1 抗体の組換え産生のために、部位特異的変異誘発を用いて天然ロイシンの場所にアラニンを置換することによってそれぞれの重鎖を C H 2 ドメインのアミノ酸 4 および 5 で変異させ、それにより各抗体の L A L A 変異体を作製した。組換え

野生型抗体および変異抗体の両方を、発現細胞系から回収し、精製した。野生型 I g G 1 抗 Dengue ウイルス抗体および L A L A 変異体はともに、同程度、標的タンパク質に結合した（データ表示なし）。

【 0 1 5 1 】

ウイルス中和および増強を、上記のように V E R O 細胞および K 5 6 2 細胞について判定した。3つの抗体はそれぞれ、明確な分子標的、ならびに血清型標的を有する（表3を参照）。図1は、非修飾組換え抗体が、用量依存的に V E R O 細胞の標的ウイルス感染を中和することを示す（点線）。Dengue ウイルスによって効率的には感染されない細胞系である、K 5 6 2 細胞では、非修飾抗体は、中和に必要とされるものより概して高い濃度で、ウイルス感染の増強を示す（実線）。この実験を、各抗体の L A L A 変異体を使用して繰り返した。図2は、組換え抗 Dengue ウイルス抗体の L A L A 変異体のそれぞれも、用量依存的に V E R O 細胞上で標的ウイルスを中和したことを示す（点線）。しかしながら、L A L A 抗体のそれぞれは、K 5 6 2 細胞上で、感染の抗体依存性増強の証拠を示さなかった（実線）。用量反応が、K 5 6 2 細胞では、本実験で使用された抗体の濃度で平坦であり、その線は、X 軸に非常に近接しているように見えることに留意されたい。

10

【 0 1 5 2 】

本明細書で参照されるすべての特許および刊行物は、参照することにより、それらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

【 0 1 5 3 】

本発明を実施する代替の様式が存在すること、また、本発明の範囲および主旨から逸脱することなく種々の変更を行うことが可能であることに留意されたい。したがって、本実施形態は、制限的なものではなく、例示的なものとして見なされるべきであり、本発明は、本明細書に提示した詳細に限定されるものではなく、添付の特許請求の範囲およびその等価物の範囲内で修正され得る。

20

【 0 1 5 4 】

参考文献（その内容は、参照することにより本明細書に組み込まれる）

[ 1 ] L e f r a n c e t a l . ( 2 0 0 3 ) D e v C o m p I m m u n o l . 2 7 ( 1 ) : 5 5 - 7 7 .

[ 2 ] L e f r a n c e t a l . ( 1 9 9 7 ) I m m u n o l o g y T o d a y , 1 8 : 5 0 9 .

30

[ 3 ] L e f r a n c ( 1 9 9 9 ) T h e I m m u n o l o g i s t , 7 : 1 3 2 - 1 3 6 .

[ 4 ] 米国特許第 4 , 6 7 6 , 9 8 0 号

[ 5 ] 米国特許第 4 , 8 3 1 , 1 7 5 号

[ 6 ] 米国特許第 5 , 5 9 5 , 7 2 1 号

[ 7 ] 国際公開第 0 0 / 5 2 0 3 1 号

[ 8 ] 国際公開第 0 0 / 5 2 4 7 3 号

[ 9 ] 米国特許第 4 , 7 6 6 , 1 0 6 号

[ 1 0 ] 米国特許第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号

[ 1 1 ] 米国特許第 4 , 4 9 5 , 2 8 5 号

40

[ 1 2 ] 米国特許第 4 , 6 0 9 , 5 4 6 号

[ 1 3 ] K n a u f e t a l . ( 1 9 8 8 ) J . B i o . C h e m . 2 6 3 : 1 5 0 6 4 - 1 5 0 7 0

[ 1 4 ] G a b i z o n e t a l . ( 1 9 8 2 ) C a n c e r R e s e a r c h 4 2 : 4 7 3 4

[ 1 5 ] C a f i s o ( 1 9 8 1 ) B i o c h e m B i o p h y s A c t a 6 4 9 : 1 2 9

[ 1 6 ] S z o k a ( 1 9 8 0 ) A n n . R e v . B i o p h y s . E n g . 9 : 4 6 7

[ 1 7 ] P o z n a n s k y e t a l . ( 1 9 8 0 ) D r u g D e l i v e r y S y s t e m s ( R . L . J u l i a n o , e d . , O x f o r d , N . Y . ) p p . 2

50

53 - 315

[18] Poznansky (1984) Pharm Revs 36:277

[19] Kohler, G. and Milstein, C., 1975, Nature 256:495 - 497.

[20] Kozbar et al. 1983, Immunology Today 4:72.

[21] 国際公開第2004/076677号

[22] Chapter 4 of Kuby Immunology (4th edition, 2000; ASIN: 0716733315

[23] Jones et al. Biotechnol Prog 2003, 19(1):163 - 8

10

[24] Cho et al. Cytotechnology 2001, 37:23 - 30

[25] Cho et al. Biotechnol Prog 2003, 19:229 - 32

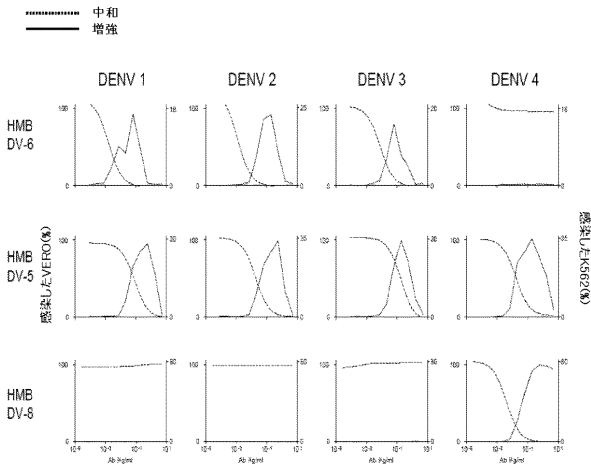
[26] 米国特許第5,807,715号

[27] 米国特許第6,300,104号

[28] Traggiai et al. (2004) Nat Med 10(8):871 - 875

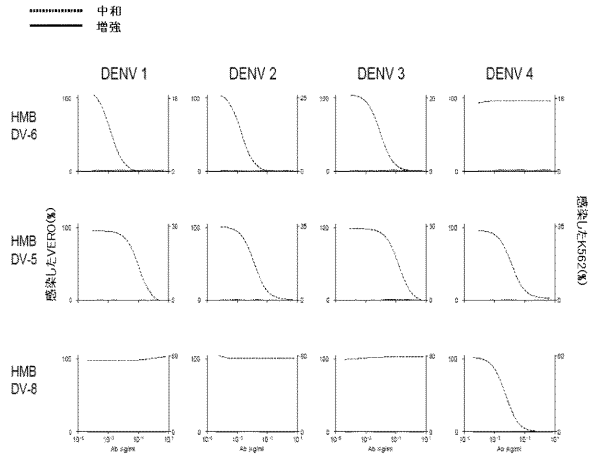
【図1】

野生型mAbの中和および抗体依存性増強



【図2】

LALA変異mAbの中和および抗体依存性増強



## 【配列表】

2016020334000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成27年7月1日(2015.7.1)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

2種以上のヒト抗体またはその抗原結合断片を含む薬学的組成物であって、前記抗体またはその抗原結合断片は、各デングウイルス血清型上の少なくとも2つの明確に異なるエピトープに結合することによって、デングウイルス血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4を中和し、前記抗体は、デングウイルス感染の抗体依存性増強の一因とはならない、薬学的組成物。

【請求項2】

デングウイルス血清型DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4を中和する3種以上のヒト抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ、前記抗体のFc受容体への結合を減少させるFc領域内の変異を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記抗体またはその抗原結合断片のそれぞれの前記Fc領域は、CH2のL4A変異、CH2のL5A変異、または両方を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体または組換え抗体である、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

配列番号1～6、17～22、33～38、49～54、67～72、83～88、99、100、105～110、121～123、124、125、135～139、149、153～158、169～174、185～188、または189のうちのいずれか1つの配列を有する少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)配列を含む、抗Eタンパク質ヒト抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、デングウイルス感染を中和する、抗Eタンパク質ヒト抗体またはその抗原結合断片。

【請求項7】

配列番号1、17、33、49、67、83、105、121、135、149、153、169、および185からなる群から選択される重鎖CDR1と、配列番号2、18、34、50、68、84、106、122、136、154、170、および186からなる群から選択される重鎖CDR2と、配列番号3、19、35、51、69、85、107、123、137、155、171、および187からなる群から選択される重鎖CDR3と、を含み、前記抗体は、デングウイルス感染を中和する、請求項6に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項8】

配列番号4、20、36、52、70、86、99、108、138、156、172、および188からなる群から選択される軽鎖CDR1と、配列番号5、21、37、53、71、87、109、124、157、および173からなる群から選択される軽鎖CDR2と、配列番号6、22、38、54、72、88、100、110、125、139、158、174、および189からなる群から選択される軽鎖CDR3と、を含み

、前記抗体は、デングウイルス感染を中和する、請求項6に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項9】

CDRH1に配列番号1、CDRH2に配列番号2、CDRH3に配列番号3、CDRH1に配列番号17、CDRH2に配列番号18、およびCDRH3に配列番号19、CDRH1に配列番号33、CDRH2に配列番号34、およびCDRH3に配列番号35、CDRH1に配列番号49、CDRH2に配列番号50、およびCDRH3に配列番号51、CDRH1に配列番号67、CDRH2に配列番号68、およびCDRH3に配列番号69、CDRH1に配列番号83、CDRH2に配列番号84、およびCDRH3に配列番号85、CDRH1に配列番号105、CDRH2に配列番号106、およびCDRH3に配列番号107、CDRH1に配列番号121、CDRH2に配列番号122、およびCDRH3に配列番号123、CDRH1に配列番号135、CDRH2に配列番号136、およびCDRH3に配列番号137、CDRH1に配列番号149、CDRH2に配列番号136、およびCDRH3に配列番号137、CDRH1に配列番号153、CDRH2に配列番号154、およびCDRH3に配列番号155、CDRH1に配列番号169、CDRH2に配列番号170、およびCDRH3に配列番号171、ならびにCDRH1に配列番号185、CDRH2に配列番号186、およびCDRH3に配列番号187を含む重鎖を含む、請求項7に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項10】

CDRL1に配列番号4、CDRL2に配列番号5、CDRL3に配列番号6、CDRL1に配列番号20、CDRL2に配列番号21、CDRL3に配列番号22、CDRL1に配列番号36、CDRL2に配列番号37、CDRL3に配列番号38、CDRL1に配列番号52、CDRL2に配列番号53、CDRL3に配列番号54、CDRL1に配列番号70、CDRL2に配列番号71、CDRL3に配列番号72、CDRL1に配列番号86、CDRL2に配列番号87、CDRL3に配列番号88、CDRL1に配列番号99、CDRL2に配列番号53、CDRL3に配列番号100、CDRL1に配列番号108、CDRL2に配列番号109、CDRL3に配列番号110、CDRL1に配列番号70、CDRL2に配列番号124、CDRL3に配列番号125、CDRL1に配列番号138、CDRL2に配列番号109、CDRL3に配列番号139、CDRL1に配列番号156、CDRL2に配列番号157、CDRL3に配列番号158、CDRL1に配列番号172、CDRL2に配列番号173、CDRL3に配列番号174、ならびにCDRL1に配列番号188、CDRL2に配列番号37、CDRL3に配列番号189を含む軽鎖を含む、請求項8に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項11】

CDRL1に配列番号4、CDRL2に配列番号5、CDRL3に配列番号6、CDRL1に配列番号20、CDRL2に配列番号21、CDRL3に配列番号22、CDRL1に配列番号36、CDRL2に配列番号37、CDRL3に配列番号38、CDRL1に配列番号52、CDRL2に配列番号53、CDRL3に配列番号54、CDRL1に配列番号70、CDRL2に配列番号71、CDRL3に配列番号72、CDRL1に配列番号86、CDRL2に配列番号87、CDRL3に配列番号88、CDRL1に配列番号99、CDRL2に配列番号53、CDRL3に配列番号100、CDRL1に配列番号108、CDRL2に配列番号109、CDRL3に配列番号110、CDRL1に配列番号70、CDRL2に配列番号124、CDRL3に配列番号125、CDRL1に配列番号138、CDRL2に配列番号109、CDRL3に配列番号139、CDRL1に配列番号156、CDRL2に配列番号157、CDRL3に配列番号158、CDRL1に配列番号172、CDRL2に配列番号173、CDRL3に配列番号174、ならびにCDRL1に配列番号188、CDRL2に配列番号37、CDRL3に配列番号189を含む軽鎖を含む、請求項9に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項12】

配列番号13、29、45、61、65、79、95、117、131、145、15

1、165、181、または195のうちのいずれか1つと少なくとも70%の配列相同性を有する重鎖可変領域を含む、請求項6に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項13】

配列番号14、30、46、62、80、96、103、118、132、146、166、182、または196のうちのいずれか1つと少なくとも70%の配列相同性を有する軽鎖可変領域を含む、請求項6に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項14】

前記抗体は、配列番号13、29、45、61、65、79、95、117、131、145、151、165、181、または195のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、前記抗体は、配列番号14、30、46、62、80、96、103、118、132、146、166、182、または196のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項6に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項15】

抗Eタンパク質ヒト抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体は、配列番号13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号29のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号45のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号46のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号61のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号62のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号65のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号62のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号79のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号80のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号95のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号96のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号95のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号103のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号117のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号118のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号131のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号132のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号145のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号146のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号151のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号146のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号165のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号166のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号181のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号182のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号195のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号196のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、前記抗体は、デングウイルス感染を中和する、抗Eタンパク質ヒト抗体またはその抗原結合断片。

【請求項16】

前記1つもしくは複数の抗体は、HMB-DV1、HMB-DV2、HMB-DV3、HMB-DV4、HMB-DV5、HMB-DV6、HMB-DV7、HMB-DV8、HMB-DV9、HMB-DV10、HMB-DV11、HMB-DV12、HMB-DV13、およびHMB-DV14からなる群から選択される、請求項6に記載の抗体。

【請求項17】

前記抗体は、モノクローナル抗体、単鎖抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、またはscFvである、前述の請求項のいずれか1項に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項18】

前記抗体の前記Fc領域は、CH2のL4A変異、CH2のL5A変異、または両方を含む、前述の請求項のいずれか1項に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項19】

前記抗体は、2種、3種、または4種の異なるデングウイルス血清型のうちの1種以上

の Deng ウイルスを中和する、前述の請求項のいずれか 1 項に記載のヒト抗体、またはその抗原結合断片。

【請求項 20】

上記請求項のいずれか 1 項に記載の 1 つもしくは複数の抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドを含む、核酸分子。

【請求項 21】

前記ポリヌクレオチドの配列が、配列番号 7 ~ 12、15、16、23 ~ 28、31、32、39 ~ 44、47、48、55 ~ 60、63、64、66、73 ~ 78、81、82、89 ~ 94、97、98、101、102、104、111 ~ 116、119、120、126 ~ 128、129、130、133、134、140 ~ 143、144、147、148、150、152、159 ~ 164、167、168、175 ~ 180、183、184、190 ~ 193、194、197、および 198 の核酸配列と少なくとも 70 % 相同である、請求項 20 に記載の核酸分子。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片を発現する、細胞。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の抗体を発現する、不死化 B 細胞クローン。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の抗体に結合するエピトープを含む、単離または精製された免疫原性ポリペプチド。

【請求項 25】

請求項 24 に記載のエピトープを含む、免疫原性ポリペプチド。

【請求項 26】

請求項 6 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの抗体、もしくはその抗原結合断片、請求項 20 もしくは請求項 21 に記載の核酸、または請求項 25 に記載の免疫原性ポリペプチドと、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体と、任意で、前記抗体またはその抗原結合断片の半減期を延長させるために有用な薬剤と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 27】

薬学的に許容される希釈剤もしくは担体と、任意で、抗体またはその抗原結合断片の半減期を延長させるために有用な薬剤と、をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 28】

第 1 のエピトープに特異的な第 1 の抗体またはその抗原結合断片と、第 2 のエピトープに特異的な第 2 の抗体またはその抗原結合断片と、を含む、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

【請求項 29】

Deng ウイルス感染または Deng ウイルス関連疾患を阻害するための、それを必要とする対象に、治療有効量の、請求項 6 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの抗体もしくはその抗原結合断片、または請求項 1 ~ 5 もしくは 26 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与するステップを含む、治療有効量の、請求項 6 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの抗体もしくはその抗原結合断片、または請求項 1 ~ 5 もしくは 26 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 30】

第 2 の治療薬の投与をさらに含む、請求項 29 に記載の使用。

【請求項 31】

前記第 2 の治療薬は、抗ウイルス剤である、請求項 30 に記載の使用。

【請求項 32】

Deng ウイルス感染または Deng ウイルス関連疾患を阻害するための、それを必要とする対象に、治療有効量の、第 1 のエピトープに特異的な、請求項 6 ~ 19 のいずれか 1 項

に記載の第 1 の抗体またはその抗原結合断片と、第 2 の異なるエピトープに特異的な、第 2 の抗体またはその抗原結合断片とを投与するステップを含む、治療有効量の、第 1 のエピトープに特異的な、請求項 6 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の第 1 の抗体またはその抗原結合断片と、第 2 の異なるエピトープに特異的な、第 2 の抗体またはその抗原結合断片との使用。

【請求項 33】

デングウイルス感染またはデングウイルス関連疾患の治療のための、かかる治療を必要とする患者を識別するステップと、前記患者に、治療有効量の、請求項 6 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の精製された中和ヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、または請求項 1 ~ 5 もしくは 26 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を投与するステップと、を含む、治療有効量の、請求項 6 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の精製された中和ヒトモノクローナル抗体もしくは抗体断片、または請求項 1 ~ 5 もしくは 26 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物の使用。

【請求項 34】

前記治療は、前記抗体またはその抗原結合断片のうちの 2 種以上の投与を含む、請求項 33 に記載の使用。

【請求項 35】

前記治療は、前記抗体またはその抗原結合断片のうちの 3 種以上の投与を含む、請求項 33 に記載の使用。

【請求項 36】

請求項 6 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片に特異的に結合するエピトープを含む、ワクチン。

【請求項 37】

( i ) デングウイルス感染の治療のための薬物の製造における、( i i ) ワクチンにおける、または( i i i ) デングウイルス感染の診断における、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の抗体、もしくはその抗原結合断片、請求項 20 もしくは請求項 21 に記載の核酸、請求項 25 に記載の免疫原性ポリペプチド、または請求項 1 ~ 5 もしくは 26 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物の使用。

【請求項 38】

前記ワクチンの前記抗原が、正しい構造の特異的エピトープを含有することを確認することによって、抗デングウイルスワクチンの品質を監視するための、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の抗体、またはその抗原結合断片の使用。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/531	A
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2
		C 1 2 P	21/08	

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 アントニオ・ランツァヴェッキア

スイス、ツェーハー - 5 4 0 0 ベリンツォーナ、ヴィア・ヴェーラ 6 番、インスティテュート・フォー・リサーチ・イン・バイオメディシン

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA32 BA51 CA04 DA02 DA05 DA11 EA04 GA03  
 GA11 HA03 HA15  
 4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 DA01  
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA90Y AA94X AA95Y AB01 AB04 BA01  
 BA08 CA24 CA25 CA44 CA45 CA46  
 4C084 AA19  
 4C085 AA14 BA51 BB41 BB43 CC02 DD62 EE01  
 4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 ZB33  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 CA40 DA76 DA86 EA29 EA31  
 EA53 FA72 FA74

## 【 外国語明細書 】

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

**DENGUE VIRUS NEUTRALIZING ANTIBODIES AND USES THEREOF**

This application claims priority to U.S. Provisional Application Serial No. 61/104,911, entitled "Dengue Virus Neutralizing Antibodies and Use Thereof," filed October 13, 2008, which is incorporated herein by reference in its entirety.

5

**BACKGROUND**

Dengue viruses (DENV) are human pathogens with a significant threat to world health. These viruses are estimated to cause several hundred thousand cases of dengue fever, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome annually. There are four closely related serotypes of dengue viruses, DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4, of the genus *Flavivirus*.  
10 The four viruses are spread from human to human through the bite of *Aedes aegypti*, a highly urbanized mosquito species that has successfully resisted all attempts at eradication and control. Vaccination is considered to be the only efficient method of control of dengue. To this end, several tetravalent dengue candidate vaccines are in late stages of development.

A first infection with one Dengue virus serotype induces a life-long protective immunity  
15 to the homologous serotype. However, there is no cross-protection against infection by a different serotype. Indeed, pre-existing immunity against one serotype is associated with increased risk for dengue infection and dengue hemorrhagic fever caused by a different serotype due to antibody-dependent enhancement (ADE) of infection. In ADE, antibodies raised by prior dengue infection or passively transferred from mother form infectious immune complexes that  
20 attach to Fc-receptor-bearing cells in the mononuclear phagocyte lineage resulting in efficient infection.

Accordingly, there is a need for materials and methods for preventing dengue virus infection without increasing the risk of antibody-dependent enhancement of infection.

**SUMMARY**

25 The invention is based, in part, on the discovery of antibodies and cocktails of antibodies that neutralize dengue virus infection without contributing to antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. Accordingly, in one aspect of the invention, the invention comprises a human antibody, an antibody variant, or an antigen binding fragment thereof, that neutralize a dengue virus, wherein the antibody, antibody variant, or antigen binding fragment does not  
30 contribute to antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. In one embodiment,

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

the invention comprises a human antibody, an antibody variant, or an antigen binding fragment thereof, that neutralize a dengue virus, wherein the antibody, antibody variant, or antigen binding fragment comprises a mutation in the Fc region, and wherein the mutation reduces binding of the antibody to an Fc receptor.

5           In another embodiment of the invention, the invention comprises a pharmaceutical composition comprising two or more human antibodies, or antigen binding fragments thereof. The antibodies or antigen binding fragments neutralize dengue virus serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4 by binding at least two distinct epitopes on each dengue virus serotype. The antibodies of the pharmaceutical composition do not contribute to antibody-  
10           dependent enhancement of dengue virus infection.

          In yet another embodiment, the invention comprises an antibody, or an antigen binding fragment thereof, comprising at least one complementarity determining region (CDR) sequence having the sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-6, 17-22, 33-38, 49-54, 67-72, 83-88, 99, 100, 105-110, 121-123, 124, 125, 135-139, 149, 153-158, 169-174, 185-188, or 189, wherein the  
15           antibody neutralizes dengue virus infection.

          In yet another embodiment, the invention comprises an antibody, or an antigen binding fragment thereof, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14; or a heavy chain variable region comprising the amino acid  
20           sequence of SEQ ID NO: 29 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 30; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 61 and a light chain variable region comprising the amino acid  
25           sequence of SEQ ID NO: 62; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 65 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 62; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 79 and a light chain variable region comprising the amino acid  
30           sequence of SEQ ID NO: 95 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 96; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 95 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 103; or a heavy chain variable region comprising the amino acid

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

sequence of SEQ ID NO: 117 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 118; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 131 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 132; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 145 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 146; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 151 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 146; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 165 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 166; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 181 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 182; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 195 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 196, wherein the antibody neutralizes dengue virus infection.

15 In a further embodiment, the invention comprises a recombinant antibody, antibody variant, or antigen binding fragment thereof, that can neutralize a dengue virus. The recombinant antibody, antibody variant, or antigen binding fragment does not contribute to antibody-dependent enhancement of dengue virus infection.

20 In another aspect, the invention comprises a nucleic acid molecule comprising a polynucleotide encoding an antibody or antibody fragment of the invention that neutralizes dengue virus infection. In yet another aspect, the invention comprises a cell expressing an antibody of the invention. In still another aspect, the invention comprises an isolated or purified immunogenic polypeptide comprising an epitope that binds to an antibody of the invention.

25 The invention also comprises a pharmaceutical composition comprising an antibody, an antibody variant or an antigen binding fragment of the invention, a nucleic acid of the invention, or an immunogenic polypeptide of the invention and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier and, optionally, an agent useful for extending the half life of the antibody or antigen binding fragment thereof.

30 In another aspect of the invention, the invention provides a method of inhibiting or preventing dengue virus infection or a dengue virus-related disease or a method of treating dengue virus infection or a dengue virus-related disease. The method comprises administering to a subject in need thereof, a therapeutically effective amount of at least one antibody, antibody variant, antigen binding fragment, or a pharmaceutical composition of the invention.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

In yet another aspect of the invention, the invention comprises a method of screening for polypeptides that can induce or reveal an immune response against dengue virus, comprising screening polypeptide libraries using an antibody, an antibody fragment or variant of the invention.

5 In yet another aspect of the invention, the invention comprises a method of monitoring the quality of anti-dengue virus vaccines. The method comprises using an antibody, an antibody variant, or an antigen binding fragment thereof of the invention to check that the antigen of the vaccine contains the specific epitope in the correct conformation.

In a further aspect of the invention, the invention comprises a vaccine comprising an  
10 epitope which specifically binds to an antibody, an antibody fragment or variant of the invention.

Use of an antibody of the invention, or an antigen binding fragment thereof, a nucleic acid of the invention, an immunogenic polypeptide of the invention, or a pharmaceutical composition of the invention (i) in the manufacture of a medicament for the treatment of dengue virus infection, (ii) in a vaccine, or (iii) in diagnosis of dengue virus infection is also  
15 contemplated to be within the scope of the invention. Further, use of an antibody of the invention, or an antigen binding fragment thereof, for monitoring the quality of anti-DENV vaccines by checking that the antigen of said vaccine contains the specific epitope in the correct conformation is also contemplated to be within the scope of the invention.

In a further aspect, the invention comprises an epitope which specifically binds to an  
20 antibody of any one of the invention, or an antigen binding fragment thereof, for use (i) in therapy, (ii) in the manufacture of a medicament for treating dengue virus infection, (iii) as a vaccine, or (iv) in screening for ligands able to neutralise dengue virus infection.

#### BRIEF DESCRIPTION OF FIGURES

Figure 1. VERO cells and K562 cells were used in virus neutralization and enhancement  
25 assays with each serotype of dengue virus using wild-type anti-dengue virus antibodies. Antibodies to dengue virus inhibit infection of the target virus on VERO cells in a dose-dependent manner. On K562 cells, the antibodies lead to a dose dependent antibody-dependent enhancement (ADE) of infection.

Figure 2. Anti-dengue virus antibodies that have a CH2 L4A and L5A substitution  
30 (LALA variants) in the heavy chain neutralize target virus infection on VERO cells as did the unmodified antibodies. However, the LALA variants completely abolished the antibody-dependent enhancement of infection by the target virus on K562 cells.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

**DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

The invention is based on the discovery of antibodies and cocktails of antibodies that neutralize dengue virus (DENV) infection without contributing to antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue virus infection. In one aspect of the invention, the invention  
5 comprises a human antibody, a variant antibody, or an antigen binding fragment thereof, that neutralizes a dengue virus without contributing to antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. The antibodies or antibody fragments can neutralize more than one dengue virus serotype, for example, 2, 3 or all 4 dengue virus serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4.

10 The invention also comprises a pharmaceutical composition comprising, for example, an antibody cocktail that comprises two or more human antibodies, antibody variants or antigen binding fragments thereof. The pharmaceutical compositions of the invention comprising a cocktail of human antibodies, antibody fragments or variants neutralize all four dengue virus serotypes, *i.e.*, DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4. In one embodiment, the cocktail of  
15 antibodies, antibody fragments or variants neutralize dengue virus by binding at least two distinct epitopes on each dengue virus serotype. It is noted that the antibodies, variants and fragments of the pharmaceutical composition do not contribute to antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. In one embodiment, the cocktail comprises two antibodies, fragments or variants thereof. In another embodiment, the cocktail comprises three antibodies, fragments or variants  
20 thereof. In yet another embodiment, the cocktail comprises more than 3 antibodies, *e.g.*, 4, 5, 6, 7 or 8 antibodies.

As used herein, the terms “fragment,” “antibody fragment,” and “antigen binding fragment” are used interchangeably to refer to any fragment of an antibody of the invention that retains the antigen-binding activity of the antibody. Exemplary antibody fragments include, but  
25 are not limited to, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, and scFv fragments.

The terms “mutation,” and “substitution” are used interchangeably to refer to a change in one or more nucleic acid or amino acid residues.

As used herein, the terms “variant,” and “antibody variant” are used interchangeably to refer to any variant of an antibody of the invention that retains the antigen-binding activity of the  
30 antibodies. The term variant includes antibodies that comprise mutations and/or substitutions. Exemplary antibody variants include, but are not limited to, those that have an L to A substitution at position CH2 4, 5, or both.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

**Antibodies of the invention**

The invention provides antibodies that neutralize dengue virus, but do not contribute to ADE of dengue virus infection. A “neutralizing antibody” is one that can neutralize the ability of a pathogen to initiate and/or perpetuate an infection in a host. The antibodies of the invention are able to neutralize one or more dengue virus serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4. In one embodiment, the antibody of the invention neutralizes more than one, *e.g.*, 2, 3, or all 4 dengue virus serotypes. In another embodiment, a pharmaceutical composition comprising two or more antibodies, antibody fragments or variants can neutralize all 4 dengue virus serotypes. In yet another embodiment, the pharmaceutical composition comprising two or more antibodies, antibody fragments or variants neutralizes dengue virus infection by targeting two distinct epitopes on each dengue virus serotype. These antibodies, antigen binding fragment and variants can be used as prophylactic or therapeutic agents upon appropriate formulation, or as a diagnostic tool, as described herein.

The antibodies of the invention may be monoclonal, for example, human monoclonal antibodies, or recombinant antibodies. The invention also provides fragments of the antibodies of the invention, particularly fragments that retain the antigen-binding activity of the antibodies. Although the specification, including the claims, may, in some places, refer explicitly to antibody fragment(s), variant(s) and/or derivative(s) of antibodies, it is understood that the term “antibody” or “antibody of the invention” includes all categories of antibodies, namely, antibody fragment(s), variant(s) and derivative(s) of antibodies.

Without being bound to any theory, it is believed that antibody-dependent enhancement of dengue virus infection is brought about by the binding of the Fc region of the antibody, in particular, the Fc region of the heavy chain of an IgG molecule, to an Fc receptor, *e.g.*, an Fc $\gamma$  receptor on a host cell. The invention, on the other hand, provides antibodies, including IgG molecules, that have reduced binding to the Fc receptors (FcR). In one embodiment, the antibody of the invention comprises one or more mutations in the Fc region. The mutation(s) may be any mutation that reduces binding of the antibody to an Fc receptor. In one embodiment, the Fc region of an antibody of the invention comprises a substitution at positions CH2 4, 5, or both. In general, the amino acid at positions 4 and 5 of CH2 of the wild-type IgG1 and IgG3 is a leucine (“L”). In one embodiment, the antibodies of the invention comprise an amino acid at position CH2 4, 5, or both, that is not an L. In another embodiment, the antibodies of the invention comprise an alanine (“A”) at position CH2 4, or 5, or both. An antibody comprising a CH2 L4A and an L5A substitution is referred to herein as a “LALA” variant.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

Alternatively, the invention provides antibody fragments that do not comprise an Fc region and thus do not bind to an FcR. Exemplary antibody fragments include, but are not limited to, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv and scFv.

The sequences of the heavy chains and light chains of several exemplary antibodies of the invention, each comprising three CDRs on the heavy chain and three CDRs on the light chain have been determined. The position of the CDR amino acids are defined according to the IMGT numbering system [1, 2, 3]. The sequences of the CDRs, heavy chains, light chains as well as the sequences of the nucleic acid molecules encoding the CDRs, heavy chains, light chains of many exemplary antibodies of the invention are disclosed in the sequence listing. Table 1 provides the SEQ ID NOs for the amino acid sequences of the six CDRs, the variable region of the heavy and light chains, respectively, of exemplary antibodies of the invention. Table 2 provides the SEQ ID NOs for the sequences of the nucleic acid molecules encoding the CDRs, heavy chains and light chains of exemplary antibodies of the invention.

Table 1. Amino Acid SEQ IDs for Antibody CDRs, Heavy and Light Chains

Antibody	CDRs	Heavy Chain Variable Region	Light Chain Variable Region
HMB-DV-1	1-6	13	14
HMB-DV-2	17-22	29	30
HMB-DV-3	33-38	45	46
HMB-DV-4	49-54	61, 65	62
HMB-DV-5	67-72	79	80
HMB-DV-6	83-88	95	96
HMB-DV-7	83-85, 99, 53, 100	95	103
HMB-DV-8	105-110	117	118
HMB-DV-9	121-123, 70 124, 125	131	132
HMB-DV-10	135-139, 109	145	146
HMB-DV-11	149, 136-139, 109	151	146
HMB-DV-12	153-158	165	166
HMB-DV-13	169-174	181	182
HMB-DV-14	185-188, 37, 189	195	196

Table 2. Nucleic Acid SEQ IDs for Antibody CDRs, Heavy and Light Chains

Antibody	CDRs	Heavy Chain Variable Region	Light Chain Variable Region
HMB-DV-1	7-12	15	16
HMB-DV-2	23-28	31	32
HMB-DV-3	39-44	47	48
HMB-DV-4	55-60	63, 66	64
HMB-DV-5	73-78	81	82
HMB-DV-6	89-94	97	98
HMB-DV-7	89-91, 101, 59, 102	97	104
HMB-DV-8	111-116	119	120

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

HMB-DV-9	126-128, 76, 129, 130	133	134
HMB-DV-10	140-143, 115, 144	147	148
HMB-DV-11	150, 141-143, 115, 144	152	148
HMB-DV-12	159-164	167	168
HMB-DV-13	175-180	183	184
HMB-DV-14	190-193, 43, 194	197	198

In one embodiment, the antibodies or antigen-binding fragments of the invention comprise one or more heavy or light chain CDRs of the exemplary antibodies of the invention. In an exemplary embodiment, the antibodies or antigen-binding fragments of the invention neutralize dengue virus infection and comprise at least one CDR sequence having the sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-6, 17-22, 33-38, 49-54, 67-72, 83-88, 99, 100, 105-110, 121-123, 124, 125, 135-139, 149, 153-158, 169-174, 185-188, or 189.

In another embodiment, the antibodies, antibody variants or antigen binding fragments of the invention comprise a heavy chain comprising an amino acid sequence of one or more of SEQ ID NOs: 1-3, 17-19, 33-35, 49-51, 67-69, 83-85, 105-107, 121-123, 135-137, 149, 153-155, 169-171, or 185-187. In yet another embodiment, the antibodies, antibody variants or antigen binding fragments of the invention comprise a heavy chain CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 17, 33, 49, 67, 83, 105, 121, 135, 149, 153, 169, and 185; a heavy chain CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 68, 84, 106, 122, 136, 154, 170, and 186; and a heavy chain CDR3 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 3, 19, 35, 51, 69, 85, 107, 123, 137, 155, 171, and 187.

For example, the antibodies of the invention comprise a heavy chain comprising SEQ ID NO: 1 for CDRH1, SEQ ID NO: 2 for CDRH2, SEQ ID NO: 3 for CDRH3; SEQ ID NO: 17 for CDRH1, SEQ ID NO: 18 for CDRH2 and SEQ ID NO: 19 for CDRH3; SEQ ID NO: 33 for CDRH1, SEQ ID NO: 34 for CDRH2 and SEQ ID NO: 35 for CDRH3; SEQ ID NO: 49 for CDRH1, SEQ ID NO: 50 for CDRH2 and SEQ ID NO: 51 for CDRH3; SEQ ID NO: 67 for CDRH1, SEQ ID NO: 68 for CDRH2 and SEQ ID NO: 69 for CDRH3; SEQ ID NO: 83 for CDRH1, SEQ ID NO: 84 for CDRH2 and SEQ ID NO: 85 for CDRH3; SEQ ID NO: 105 for CDRH1, SEQ ID NO: 106 for CDRH2 and SEQ ID NO: 107 for CDRH3; SEQ ID NO: 121 for CDRH1, SEQ ID NO: 122 for CDRH2 and SEQ ID NO: 123 for CDRH3; SEQ ID NO: 135 for CDRH1, SEQ ID NO: 136 for CDRH2 and SEQ ID NO: 137 for CDRH3; SEQ ID NO: 149 for CDRH1, SEQ ID NO: 136 for CDRH2 and SEQ ID NO: 137 for CDRH3; SEQ ID NO: 153 for CDRH1, SEQ ID NO: 154 for CDRH2 and SEQ ID NO: 155 for CDRH3; SEQ ID NO: 169 for CDRH1, SEQ ID NO: 170 for CDRH2 and SEQ ID NO: 171 for CDRH3; and SEQ ID NO: 185 for CDRH1, SEQ ID NO: 186 for CDRH2 and SEQ ID NO: 187 for CDRH3.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

In yet another embodiment, the antibodies, antibody variants or antibody fragments of the invention comprise a light chain comprising an amino acid sequence of one or more of SEQ ID NOs: 4-6, 20-22, 36-38, 52-54, 70-72, 86-88, 99, 100, 108-110, 124, 125, 138, 139, 156-158, 172-174, 188, or 189. In a further embodiment, the antibodies, antibody variants or antibody  
5 fragments of the invention comprise a light chain CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 20, 36, 52, 70, 86, 99, 108, 138, 156, 172, and 188; a light chain CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 21, 37, 53, 71, 87, 109, 124, 157, and 173; and a light chain CDR3 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 6, 22, 38, 54, 72, 88, 100, 110, 125, 139, 158, 174, and 189.

10 For example, the antibodies of the invention comprise a light chain comprising SEQ ID NO: 4 for CDRL1, SEQ ID NO: 5 for CDRL2; SEQ ID NO: 6 for CDRL3; SEQ ID NO: 20 for CDRL1, SEQ ID NO: 21 for CDRL2; SEQ ID NO: 22 for CDRL3; SEQ ID NO: 36 for CDRL1, SEQ ID NO: 37 for CDRL2; SEQ ID NO: 38 for CDRL3; SEQ ID NO: 52 for CDRL1, SEQ ID NO: 53 for CDRL2; SEQ ID NO: 54 for CDRL3; SEQ ID NO: 70 for CDRL1, SEQ ID NO: 71  
15 for CDRL2; SEQ ID NO: 72 for CDRL3; SEQ ID NO: 86 for CDRL1, SEQ ID NO: 87 for CDRL2; SEQ ID NO: 88 for CDRL3; SEQ ID NO: 99 for CDRL1, SEQ ID NO: 53 for CDRL2; SEQ ID NO: 100 for CDRL3; SEQ ID NO: 108 for CDRL1, SEQ ID NO: 109 for CDRL2; SEQ ID NO: 110 for CDRL3; SEQ ID NO: 70 for CDRL1, SEQ ID NO: 124 for CDRL2; SEQ ID NO: 125 for CDRL3; SEQ ID NO: 138 for CDRL1, SEQ ID NO: 109 for CDRL2; SEQ ID NO:  
20 139 for CDRL3; SEQ ID NO: 156 for CDRL1, SEQ ID NO: 157 for CDRL2; SEQ ID NO: 158 for CDRL3; SEQ ID NO: 172 for CDRL1, SEQ ID NO: 173 for CDRL2; SEQ ID NO: 174 for CDRL3; and SEQ ID NO: 188 for CDRL1, SEQ ID NO: 37 for CDRL2; SEQ ID NO: 189 for CDRL3.

In one embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof,  
25 comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-1 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-2 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-  
30 DV-3 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In yet another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-4 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In yet another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-5 as listed in Table 1, and

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

neutralizes dengue virus infection in a human host. In yet another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-6 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In yet another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-7 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host.

In a further embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-8 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-9 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In still another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-10 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In yet another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-11 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In yet another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-12 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In yet another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-13 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host. In yet another embodiment, an antibody of the invention, or antigen binding fragment thereof, comprises all of the CDRs of antibody HMB-DV-14 as listed in Table 1, and neutralizes dengue virus infection in a human host.

In still another embodiment, the antibodies of the invention comprise a heavy chain with an amino acid sequence that is at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 98%, or at least 99% identical to those of SEQ ID NOs: 13, 29, 45, 61, 65, 79, 95, 117, 131, 145, 151, 165, 181, or 195. In yet another embodiment, the antibodies of the invention comprise a light chain with an amino acid sequence that is at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 98%, or at least 99% identical to those of SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 80, 96, 103, 118, 132, 146, 166, 182, or 196.

In a further embodiment, the antibodies, antibody variants or antibody fragments of the invention comprise a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs: 13, 29, 45, 61, 65, 79, 95, 117, 131, 145, 151, 165, 181, or 195, and a light chain

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

variable region comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 80, 96, 103, 118, 132, 146, 166, 182, or 196.

In yet another embodiment, the antibodies, antibody variants or antibody fragments of the invention neutralize dengue virus infection and comprise a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 30; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 61 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 62; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 65 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 62; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 79 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 80; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 95 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 96; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 95 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 103; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 117 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 118; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 131 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 132; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 145 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 146; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 151 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 146; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 165 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 166; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 181 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 182; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 195 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 196.

Methods for chain replacement and for CDR grafting are well known in the art. Originally these methods were developed to humanize non-human antibodies (generally mouse antibodies) or to select human antibody counterparts having equivalent bioactivity to the non-

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

human antibodies. These methods include replacement techniques where only one of the CDRs, for example, the CDR3s, of the non-human antibody are retained and the remainder of the V-region, including the framework and the other two CDRs, for example, the CDRs 1 and 2, are individually replaced in steps performed sequentially (e.g. U.S. Patent Application No. 20030166871; Rader, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8910-15, 1998; Steinberg, et al., *J Biol Chem* 275:36073-78, 2000; Rader, et al., *J Biol Chem* 275:13668-76, 2000).

In addition, methods of creating antibodies with the binding specificities of a reference antibody for a target antigen are described in Patent Application No. WO05/069,970. The methods include transferring, from the reference antibody to a recipient antibody or antibody fragment, the minimal essential binding specificity of the reference antibody. Examples of regions that can be transferred include, but are not limited to, the transfer of a single CDR segment, for example a CDR3 segment, from the heavy and/or from the light chain, or a D segment, or a CDR3-FR4 segment, or any CDR3-FR4 segment that comprises the minimal essential binding specificity determinant. Antibodies created using these methods retain the binding specificity, and often affinity, of the reference antibody.

The antibodies, antibody variants or antibody fragments of the invention include antibodies that comprise, *inter alia*, one or more CDRs, a heavy chain or a light chain of an exemplary antibody of the invention and retain their specificity and ability to neutralize dengue virus infection.

Exemplary antibodies of the invention include, but are not limited to, HMB-DV1, HMB-DV2, HMB-DV3, HMB-DV4, HMB-DV5, HMB-DV6, HMB-DV7, HMB-DV8, HMB-DV9, HMB-DV10, HMB-DV11, HMB-DV12, HMB-DV13, and HMB-DV14.

Variants of HMB-DV4 consist of a heavy chain variants having amino acid sequence recited in SEQ ID NO: 61 and SEQ ID NO: 65, and a light chain having the amino acid sequence recited in SEQ ID NO: 62. The nucleic acid sequences encoding the heavy chain variants are recited in SEQ ID NO: 63 and SEQ ID NO: 66. The nucleic acid encoding the light chain is recited in SEQ ID NO: 64. Thus, antibodies comprising the HMB-DV4 variant heavy chains (SEQ ID NOs: 61, 65) and light chain (SEQ ID NO: 62) are included within the scope of the invention.

As used herein, the term "HMB-DV4" is used to refer to any and/or all variants of HMB-DV4, for example, those with heavy chains corresponding to SEQ ID NOs: 61 and 65 and light chain corresponding to SEQ ID NO: 62.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

In one embodiment, an antibody cocktail of the invention comprises two or more antibodies selected from the group consisting of HMB-DV1, HMB-DV2, HMB-DV3, HMB-DV4, HMB-DV5, HMB-DV6, HMB-DV7, HMB-DV8, HMB-DV9, HMB-DV10, HMB-DV11, HMB-DV12, HMB-DV13, and HMB-DV14. In another embodiment, a cocktail of the invention  
5 comprises three antibodies selected from the group consisting of HMB-DV1, HMB-DV2, HMB-DV3, HMB-DV4, HMB-DV5, HMB-DV6, HMB-DV7, HMB-DV8, HMB-DV9, HMB-DV10, HMB-DV11, HMB-DV12, HMB-DV13, and HMB-DV14. In yet another embodiment, an antibody cocktail of the invention comprises more than three, for example, 4, 5, 6, 7, or 8 antibodies selected from the group consisting of HMB-DV1, HMB-DV2, HMB-DV3, HMB-  
10 DV4, HMB-DV5, HMB-DV6, HMB-DV7, HMB-DV8, HMB-DV9, HMB-DV10, HMB-DV11, HMB-DV12, HMB-DV13, and HMB-DV14. In an exemplary embodiment, a cocktail of the invention comprises HMB-DV5, HMB-DV6, and HMB-DV8.

The invention further comprises an antibody, or fragment thereof, that binds to an epitope capable of binding to an antibody of the invention. The invention also comprises an antibody or  
15 an antibody fragment that competes with an antibody of the invention.

In another aspect, the invention also includes nucleic acid sequences encoding part or all of the light and heavy chains and CDRs of the antibodies of the present invention. In one embodiment, nucleic acid sequences according to the invention include nucleic acid sequences having at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least  
20 98%, or at least 99% identity to the nucleic acid encoding a heavy or light chain of an antibody of the invention. In another embodiment, a nucleic acid sequence of the invention has the sequence of a nucleic acid encoding a heavy or light chain CDR of an antibody of the invention. For example, a nucleic acid sequence according to the invention comprises a sequence that is at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 98%, or at  
25 least 99% identical to the nucleic acid sequences of SEQ ID NOs: 7-12, 23-28, 39-44, 55-60, 73-78, 89-94, 101, 102, 111-116, 126-128, 129, 130, 140-144, 150, 159-164, 175-180, and 190-194.

Due to the redundancy of the genetic code, variants of these sequences will exist that encode the same amino acid sequences. These variants are included within the scope of the invention.

30 Variant antibodies are also included within the scope of the invention. Thus, variants of the sequences recited in the application are also included within the scope of the invention. Such variants include natural variants generated by somatic mutation *in vivo* during the immune response or *in vitro* upon culture of immortalized B cell clones. Alternatively, variants may arise

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

due to the degeneracy of the genetic code, as mentioned above or may be produced due to errors in transcription or translation. Variants may also be introduced to modify the antibody effector function, for instance in the Fc region to reduce the binding of the antibody to an Fc receptor.

Further variants of the antibody sequences having improved affinity and/or potency may be obtained using methods known in the art and are included within the scope of the invention. For example, amino acid substitutions may be used to obtain antibodies with further improved affinity. Alternatively, codon optimisation of the nucleotide sequence may be used to improve the efficiency of translation in expression systems for the production of the antibody. Further, polynucleotides comprising a sequence optimized for antibody specificity or neutralizing activity by the application of a directed evolution method to any of the nucleic acid sequences of the invention are also within the scope of the invention.

In one embodiment variant antibody sequences may share 70% or more (*i.e.* 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% or more) amino acid sequence identity with the sequences recited in the application. In some embodiments such sequence identity is calculated with regard to the full length of the reference sequence (*i.e.* the sequence recited in the application). In some further embodiments, percentage identity, as referred to herein, is as determined using BLAST version 2.1.3 using the default parameters specified by the NCBI (the National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62 matrix; gap open penalty=11 and gap extension penalty=1].

Further included within the scope of the invention are vectors, for example expression vectors, comprising a nucleic acid sequence according to the invention. Cells transformed with such vectors are also included within the scope of the invention. Examples of such cells include but are not limited to, eukaryotic cells, *e.g.* yeast cells, animal cells or plant cells. In one embodiment the cells are mammalian, *e.g.* human, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, myeloma or hybridoma cells.

The invention also relates to monoclonal antibodies that bind to an epitope capable of binding an antibody of the invention. In one embodiment, the invention includes a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding a monoclonal antibody selected from the group consisting of HMB-DV1, HMB-DV2, HMB-DV3, HMB-DV4, HMB-DV5, HMB-DV6, HMB-DV7, HMB-DV8, HMB-DV9, HMB-DV10, HMB-DV11, HMB-DV12, HMB-DV13, and HMB-DV14.

Monoclonal and recombinant antibodies are particularly useful in identification and purification of the individual polypeptides or other antigens against which they are directed. The

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

antibodies of the invention have additional utility in that they may be employed as reagents in immunoassays, radioimmunoassays (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). In these applications, the antibodies can be labelled with an analytically-detectable reagent such as a radioisotope, a fluorescent molecule or an enzyme. The antibodies may also be used for the  
5 molecular identification and characterisation (epitope mapping) of antigens.

Antibodies of the invention will typically be glycosylated. N-linked glycans attached to the C<sub>H</sub>2 domain of a heavy chain, for instance, can influence C1q and FcR binding, with aglycosylated antibodies having lower affinity for these receptors. The glycan structure can also affect activity *e.g.* differences in complement-mediated cell death may be seen depending on the  
10 number of galactose sugars (0, 1 or 2) at the terminus of a glycan's biantennary chain. An antibody's glycans preferably do not lead to a human immunogenic response after administration.

Antibodies of the invention can be coupled to a drug for delivery to a treatment site or coupled to a detectable label to facilitate imaging of a site comprising cells of interest, such as  
15 cells infected with dengue virus. Methods for coupling antibodies to drugs and detectable labels are well known in the art, as are methods for imaging using detectable labels. Labelled antibodies may be employed in a wide variety of assays, employing a wide variety of labels. Detection of the formation of an antibody-antigen complex between an antibody of the invention and an epitope of interest (a DENV epitope) can be facilitated by attaching a detectable  
20 substance to the antibody. Suitable detection means include the use of labels such as radionuclides, enzymes, coenzymes, fluorescers, chemiluminescers, chromogens, enzyme substrates or co-factors, enzyme inhibitors, prosthetic group complexes, free radicals, particles, dyes, and the like. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group  
25 complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material is luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin; and examples of suitable radioactive material include <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S, or <sup>3</sup>H.  
30 Such labeled reagents may be used in a variety of well-known assays, such as radioimmunoassays, enzyme immunoassays, *e.g.*, ELISA, fluorescent immunoassays, and the like.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

An antibody according to the invention may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, a therapeutic agent, or a radioactive metal ion or radioisotope. Examples of radioisotopes include, but are not limited to, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111, and the like. Such antibody conjugates can be used for modifying a given biological response; the drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, calicheamicin bacterial toxin, or diphtheria toxin.

Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known. See, for example, Arnon *et al.* (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld *et al.* (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; ed. Hellstrom *et al.* (1987) "Antibodies for Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson *et al.* (2d ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera *et al.* pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin *et al.* (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316; and Thorpe *et al.* (1982) *Immunol. Rev.* 62:119-158.

Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described in reference 4. In addition, linkers may be used between the labels and the antibodies of the invention [5]. Antibodies or, antigen-binding fragments thereof may be directly labelled with radioactive iodine, indium, yttrium, or other radioactive particle known in the art [6]. Treatment may consist of a combination of treatment with conjugated and non-conjugated antibodies administered simultaneously or subsequently [7, 8].

Antibodies of the invention may also be attached to a solid support.

Additionally, antibodies of the invention, or functional antibody fragments thereof, can be chemically modified by covalent conjugation to a polymer to, for example, increase their circulating half-life, for example. Examples of polymers, and methods to attach them to peptides, are shown in references 9-12. In some embodiments the polymers may be selected from polyoxyethylated polyols and polyethylene glycol (PEG). PEG is soluble in water at room temperature and has the general formula:  $R(O-CH_2-CH_2)_n O-R$  where R can be hydrogen, or a

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

protective group such as an alkyl or alkanol group. In one embodiment the protective group may have between 1 and 8 carbons. In a further embodiment the protective group is methyl. The symbol  $n$  is a positive integer. In one embodiment  $n$  is between 1 and 1,000. In another embodiment  $n$  is between 2 and 500. In one embodiment the PEG has an average molecular weight between 1,000 and 40,000. In a further embodiment the PEG has a molecular weight between 2,000 and 20,000. In yet a further embodiment the PEG has a molecular weight of between 3,000 and 12,000. In one embodiment PEG has at least one hydroxy group. In another embodiment the PEG has a terminal hydroxy group. In yet another embodiment it is the terminal hydroxy group which is activated to react with a free amino group on the inhibitor. However, it will be understood that the type and amount of the reactive groups may be varied to achieve a covalently conjugated PEG/antibody of the present invention.

Antibodies of the invention can be modified by introducing random amino acid mutations into particular region of the CH2 or CH3 domain of the heavy chain in order to alter their binding affinity for FeRn and/or their serum half-life in comparison to the unmodified antibodies. Examples of such modifications include, but are not limited to, substitutions of at least one amino acid from the heavy chain constant region selected from the group consisting of amino acid residues 250, 314, and 428.

Water-soluble polyoxyethylated polyols are also useful in the present invention. They include polyoxyethylated sorbitol, polyoxyethylated glucose, polyoxyethylated glycerol (POG), and the like. In one embodiment, POG is used. Without being bound by any theory, because the glycerol backbone of polyoxyethylated glycerol is the same backbone occurring naturally in, for example, animals and humans in mono-, di-, triglycerides, this branching would not necessarily be seen as a foreign agent in the body. In some embodiments POG has a molecular weight in the same range as PEG. The structure for POG is shown in reference 13, and a discussion of POG/IL-2 conjugates is found in reference 9.

Another drug delivery system that can be used for increasing circulatory half-life is the liposome. Methods of preparing liposome delivery systems are discussed in references 14, 15 and 16. Other drug delivery systems are known in the art and are described in, for example, references 17 and 18.

Antibodies of the invention may be provided in purified form. Typically, the antibody will be present in a composition that is substantially free of other polypeptides *e.g.* where less than 90% (by weight), usually less than 60% and more usually less than 50% of the composition is made up of other polypeptides.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

Antibodies of the invention may be immunogenic in non-human (or heterologous) hosts *e.g.* in mice. In particular, the antibodies may have an idiotope that is immunogenic in non-human hosts, but not in a human host. Antibodies of the invention for human use include those that cannot be easily isolated from hosts such as mice, goats, rabbits, rats, non-primate mammals, *etc.* and cannot generally be obtained by humanisation or from xeno-mice.

Antibodies of the invention can be of any isotype (*e.g.* IgA, IgG, IgM *i.e.* an  $\alpha$ ,  $\gamma$  or  $\mu$  heavy chain), but will generally be IgG. Within the IgG isotype, antibodies may be IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4 subclass. In one embodiment, the antibody is IgG1. Antibodies of the invention may have a  $\kappa$  or a  $\lambda$  light chain.

Included within the scope of the invention are DENV-neutralizing recombinant or engineered bispecific antibody molecules or antigen binding fragments thereof. Such antibodies and fragments may comprise a first binding site for an epitope on a first Dengue virus serotype and a second binding site for a second epitope on the same dengue virus serotype or on a different, for example, a second, third or fourth, dengue virus serotype. The variable domains of the respective binding sites can be formed as immunoglobulin isotypes of the invention or as heterodimeric Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, ScFv or diabodies that can be linked together via one or more peptide linkers.

#### ***Production of antibodies***

Monoclonal antibodies according to the invention can be made by any method known in the art. The general methodology for making monoclonal antibodies using hybridoma technology is well known [19, 20]. Preferably, the alternative EBV immortalisation method described in reference 21 is used.

Using the method described in reference 21, B cells producing the antibody of the invention can be transformed with EBV in the presence of a polyclonal B cell activator. Transformation with EBV is a standard technique and can easily be adapted to include polyclonal B cell activators.

Additional stimulants of cellular growth and differentiation may optionally be added during the transformation step to further enhance the efficiency. These stimulants may be cytokines such as IL-2 and IL-15. In one aspect, IL-2 is added during the immortalisation step to further improve the efficiency of immortalisation, but its use is not essential.

The immortalised B cells produced using these methods can then be cultured using methods known in the art and antibodies isolated therefrom.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

The antibodies of the invention can also be made by culturing single plasma cells in microwell culture plates using the method described in UK Patent Application 0819376.5. Further, from single plasma cell cultures, RNA can be extracted and single cell PCR can be performed using methods known in the art. The VH and VL regions of the antibodies can be amplified by RT-PCR, sequenced and cloned into an expression vector that is then transfected into HEK293T cells or other host cells. The cloning of nucleic acid in expression vectors, the transfection of host cells, the culture of the transfected host cells and the isolation of the produced antibody can be done using any methods known to one of skill in the art.

Monoclonal antibodies may be further purified, if desired, using filtration, centrifugation and various chromatographic methods such as HPLC or affinity chromatography. Techniques for purification of monoclonal antibodies, including techniques for producing pharmaceutical-grade antibodies, are well known in the art.

Fragments of the monoclonal antibodies of the invention can be obtained from the monoclonal antibodies by methods that include digestion with enzymes, such as pepsin or papain, and/or by cleavage of disulfide bonds by chemical reduction. Alternatively, fragments of the monoclonal antibodies can be obtained by cloning and expression of part of the sequences of the heavy or light chains. Antibody "fragments" may include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> and Fv fragments. The invention also encompasses single-chain Fv fragments (scFv) derived from the heavy and light chains of a monoclonal antibody of the invention *e.g.* the invention includes a scFv comprising the CDRs from an antibody of the invention. Also included are heavy or light chain monomers and dimers as well as single chain antibodies, *e.g.* single chain Fv in which the heavy and light chain variable domains are joined by a peptide linker.

Standard techniques of molecular biology may be used to prepare DNA sequences coding for the antibodies or fragments or variants of the antibodies of the present invention. Desired DNA sequences may be synthesised completely or in part using oligonucleotide synthesis techniques. Site-directed mutagenesis and polymerase chain reaction (PCR) techniques may be used as appropriate.

Any suitable host cell/vector system may be used for expression of the DNA sequences encoding the antibody molecules of the present invention or fragments thereof. Bacterial, for example *E. coli*, and other microbial systems may be used, in part, for expression of antibody fragments such as Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments, and especially Fv fragments and single chain antibody fragments, for example, single chain Fvs. Eukaryotic, *e.g.* mammalian, host cell expression systems may be used for production of larger antibody molecules, including complete

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

antibody molecules. Suitable mammalian host cells include CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, myeloma or hybridoma cells.

The present invention also provides a process for the production of an antibody of the invention comprising culturing a host cell comprising a vector of the present invention under  
5 conditions suitable for leading to expression of protein from DNA encoding the antibody of the present invention, and isolating the antibody molecule.

The antibody molecule may comprise only a heavy or light chain polypeptide, in which case only a heavy chain or light chain polypeptide coding sequence needs to be used to transfect the host cells. For production of products comprising both heavy and light chains, the cell line  
10 may be transfected with two vectors, a first vector encoding a light chain polypeptide and a second vector encoding a heavy chain polypeptide. Alternatively, a single vector may be used, the vector including sequences encoding light chain and heavy chain polypeptides.

Alternatively, antibodies according to the invention may be produced by i) expressing a nucleic acid sequence according to the invention in a cell, and ii) isolating the expressed  
15 antibody product. Additionally, the method may include iii) purifying the antibody.

#### ***Screening and isolation of B cells***

Transformed B cells may be screened for those producing antibodies of the desired antigen specificity, and individual B cell clones may then be produced from the positive cells.

The screening step may be carried out by ELISA, by staining of tissues or cells (including  
20 infected or transfected cells), a neutralisation assay or one of a number of other methods known in the art for identifying desired antigen specificity. The assay may select on the basis of simple antigen recognition, or may select on the additional basis of a desired function *e.g.* to select neutralizing antibodies rather than just antigen-binding antibodies, to select antibodies that can change characteristics of targeted cells, such as their signalling cascades, their shape, their  
25 growth rate, their capability of influencing other cells, their response to the influence by other cells or by other reagents or by a change in conditions, their differentiation status, *etc.*

The cloning step for separating individual clones from the mixture of positive cells may be carried out using limiting dilution, micromanipulation, single cell deposition by cell sorting or another method known in the art.

30 The immortalised B cell clones of the invention can be used in various ways *e.g.* as a source of monoclonal antibodies, as a source of nucleic acid (DNA or mRNA) encoding a monoclonal antibody of interest, for research, *etc.*

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

The invention provides a composition comprising immortalised B memory cells, wherein the cells produce antibodies that neutralize one or more dengue virus serotypes, and wherein the antibodies are produced at  $\geq 5$ pg per cell per day. The invention also provides a composition comprising clones of an immortalised B memory cell, wherein the clones produce a monoclonal antibody that neutralizes one or more dengue virus serotypes, and wherein the antibody is produced at  $\geq 5$ pg per cell per day.

Exemplary immortalised B cell clone according to the invention include, but are not limited to, HMB-DV1, HMB-DV2, HMB-DV3, HMB-DV4, HMB-DV5, HMB-DV6, HMB-DV7, HMB-DV8, HMB-DV9, HMB-DV10, HMB-DV11, HMB-DV12, HMB-DV13, and HMB-DV14.

### ***Epitopes***

As mentioned above, the antibodies of the invention can be used to map the epitopes to which they bind. The epitopes recognised by the antibodies of the present invention may have a number of uses. The epitope and mimotopes thereof in purified or synthetic form can be used to raise immune responses (*i.e.* as a vaccine, or for the production of antibodies for other uses) or for screening patient serum for antibodies that immunoreact with the epitope or mimotopes thereof. In one embodiment such an epitope or mimotope, or antigen comprising such an epitope or mimotope may be used as a vaccine for raising an immune response. The antibodies and antigen binding fragments of the invention can also be used in a method of monitoring the quality of vaccines. In particular the antibodies can be used to check that the antigen in a vaccine contains the specific epitope in the correct conformation.

The epitope may also be useful in screening for ligands that bind to said epitope. Such ligands, include but are not limited to antibodies, including those from camels, sharks and other species, fragments of antibodies, peptides, phage display technology products, aptamers, adnectins, synthetic compounds, or fragments of other viral or cellular proteins, that may block the epitope and so prevent infection. Such ligands are encompassed within the scope of the invention.

### ***Recombinant expression***

The immortalised B memory cells of the invention may also be used as a source of nucleic acid for the cloning of antibody genes for subsequent recombinant expression. Expression from recombinant sources is more common for pharmaceutical purposes than

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

expression from B cells or hybridomas *e.g.* for reasons of stability, reproducibility, culture ease, *etc.*

Thus the invention provides a method for preparing a recombinant cell, comprising the steps of: (i) obtaining one or more nucleic acids (*e.g.* heavy and/or light chain genes) from the B  
5 cell clone that encodes the antibody of interest; and (ii) inserting the nucleic acid into an expression host in order to permit expression of the antibody of interest in that host.

Similarly, the invention provides a method for preparing a recombinant cell, comprising the steps of: (i) sequencing nucleic acid(s) from the B cell clone that encodes the antibody of interest; and (ii) using the sequence information from step (i) to prepare nucleic acid(s) for  
10 insertion into an expression host in order to permit expression of the antibody of interest in that host. The nucleic acid may, but need not, be manipulated between steps (i) and (ii) to introduce restriction sites, to change codon usage, to optimise transcription and/or translation regulatory sequences, and/or to modify effector function.

The invention also provides a method of preparing a recombinant cell, comprising the  
15 step of transforming a host cell with one or more nucleic acids that encode a monoclonal antibody of interest, wherein the nucleic acids are nucleic acids that were derived from an immortalised B cell clone of the invention. Thus the procedures for first preparing the nucleic acid(s) and then using it to transform a host cell can be performed at different times by different people in different places (*e.g.*, in different countries).

20 These recombinant cells of the invention can then be used for expression and culture purposes. They are particularly useful for expression of antibodies for large-scale pharmaceutical production. They can also be used as the active ingredient of a pharmaceutical composition. Any suitable culture techniques can be used, including but not limited to static culture, roller bottle culture, ascites fluid, hollow-fiber type bioreactor cartridge, modular  
25 minifermenter, stirred tank, microcarrier culture, ceramic core perfusion, *etc.*

Methods for obtaining and sequencing immunoglobulin genes from B cells are well known in the art (*e.g.*, see reference 22).

The expression host is preferably a eukaryotic cell, including yeast and animal cells, particularly mammalian cells (*e.g.* CHO cells, NS0 cells, human cells such as PER.C6 [Crucell;  
30 reference 23] or HKB-11 [Bayer; references 24 & 25] cells, myeloma cells [26 & 27], *etc.*), as well as plant cells. Preferred expression hosts can glycosylate the antibody of the invention, particularly with carbohydrate structures that are not themselves immunogenic in humans. In one embodiment the expression host may be able to grow in serum-free media. In a further

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

embodiment the expression host may be able to grow in culture without the presence of animal-derived products.

The expression host may be cultured to give a cell line.

The invention provides a method for preparing one or more nucleic acid molecules (*e.g.* heavy and light chain genes) that encode an antibody of interest, comprising the steps of:  
5 (i) preparing an immortalised B cell clone according to the invention; (ii) obtaining from the B cell clone nucleic acid that encodes the antibody of interest. The invention also provides a method for obtaining a nucleic acid sequence that encodes an antibody of interest, comprising the steps of: (i) preparing an immortalised B cell clone according to the invention; (ii)  
10 sequencing nucleic acid from the B cell clone that encodes the antibody of interest.

The invention also provides a method of preparing nucleic acid molecule(s) that encodes an antibody of interest, comprising the step of obtaining the nucleic acid from a B cell clone that was obtained from a transformed B cell of the invention. Thus the procedures for first obtaining the B cell clone and then preparing nucleic acid(s) from it can be performed at very different  
15 times by different people in different places (*e.g.* in different countries).

The invention provides a method for preparing an antibody (*e.g.* for pharmaceutical use), comprising the steps of: (i) obtaining and/or sequencing one or more nucleic acids (*e.g.* heavy and light chain genes); (ii) using the sequence information from step (i) to prepare nucleic acid(s) for insertion into an expression host in order to permit expression of the antibody of interest in  
20 that host; (iii) culturing or sub-culturing the expression host under conditions where the antibody of interest is expressed; and, optionally, (iv) purifying the antibody of the interest. The nucleic acid can, but need not be, obtained and/or sequenced from a B cell clone expressing the antibody of interest. In one embodiment, the nucleic acid from step (i) may, optionally be modified so as to introduce desired substitutions in the amino acid sequence of the antibody.

25 The invention also provides a method of preparing an antibody comprising the steps of: culturing or sub-culturing an expression host cell population under conditions where the antibody of interest is expressed and, optionally, purifying the antibody of the interest, wherein said expression host cell population has been prepared by (i) providing nucleic acid(s) encoding an antibody of interest; (ii) inserting the nucleic acid(s) into an expression host that can express the  
30 antibody of interest, and (iii) culturing or sub-culturing expression hosts comprising said inserted nucleic acids to produce said expression host cell population.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

***Pharmaceutical compositions***

The invention provides a pharmaceutical composition containing the antibodies and/or antibody fragments of the invention and/or nucleic acid encoding such antibodies and/or immortalised B cells that express such antibodies and/or the epitopes recognised by the antibodies of the invention. A pharmaceutical composition may also contain a pharmaceutically acceptable carrier to allow administration. The carrier should not itself induce the production of antibodies harmful to the individual receiving the composition and should not be toxic. Suitable carriers may be large, slowly metabolised macromolecules such as proteins, polypeptides, liposomes, polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers and inactive virus particles.

Pharmaceutically acceptable salts can be used, for example mineral acid salts, such as hydrochlorides, hydrobromides, phosphates and sulphates, or salts of organic acids, such as acetates, propionates, malonates and benzoates.

Pharmaceutically acceptable carriers in therapeutic compositions may additionally contain liquids such as water, saline, glycerol and ethanol. Additionally, auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents or pH buffering substances, may be present in such compositions. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries and suspensions, for ingestion by the patient.

Within the scope of the invention, forms of administration may include those forms suitable for parenteral administration, *e.g.* by injection or infusion, for example by bolus injection or continuous infusion. Where the product is for injection or infusion, it may take the form of a suspension, solution or emulsion in an oily or aqueous vehicle and it may contain formulatory agents, such as suspending, preservative, stabilising and/or dispersing agents. Alternatively, the antibody molecule may be in dry form, for reconstitution before use with an appropriate sterile liquid.

Once formulated, the compositions of the invention can be administered directly to the subject. In one embodiment the compositions are adapted for administration to human subjects.

The pharmaceutical compositions of this invention may be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intraperitoneal, intrathecal, intraventricular, transdermal, transcutaneous, topical, subcutaneous, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal or rectal routes. Hyposprays may also be used to administer the pharmaceutical compositions of the invention. Typically, the

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

therapeutic compositions may be prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions. Solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid vehicles prior to injection may also be prepared.

5 Direct delivery of the compositions will generally be accomplished by injection, subcutaneously, intraperitoneally, intravenously or intramuscularly, or delivered to the interstitial space of a tissue. Dosage treatment may be a single dose schedule or a multiple dose schedule. Known antibody-based pharmaceuticals provide guidance relating to frequency of administration *e.g.* whether a pharmaceutical should be delivered daily, weekly, monthly, *etc.* Frequency and dosage may also depend on the severity of symptoms.

10 Compositions of the invention may be prepared in various forms. For example, the compositions may be prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions. Solid forms suitable for solution, or suspension, in liquid vehicles prior to injection can also be prepared (*e.g.* a lyophilised composition, like Synagis™ and Herceptin™, for reconstitution with sterile water containing a preservative). The composition may be prepared for topical  
15 administration *e.g.* as an ointment, cream or powder. The composition may be prepared for oral administration *e.g.* as a tablet or capsule, as a spray, or as a syrup (optionally flavoured). The composition may be prepared for pulmonary administration *e.g.* as an inhaler, using a fine powder or a spray. The composition may be prepared as a suppository or pessary. The composition may be prepared for nasal, aural or ocular administration *e.g.* as drops. The  
20 composition may be in kit form, designed such that a combined composition is reconstituted just prior to administration to a patient. For example, a lyophilised antibody can be provided in kit form with sterile water or a sterile buffer.

It will be appreciated that the active ingredient in the composition will be an antibody molecule, an antibody fragment or variants and derivatives thereof. As such, it will be  
25 susceptible to degradation in the gastrointestinal tract. Thus, if the composition is to be administered by a route using the gastrointestinal tract, the composition will need to contain agents which protect the antibody from degradation but which release the antibody once it has been absorbed from the gastrointestinal tract.

A thorough discussion of pharmaceutically acceptable carriers is available in Gennaro  
30 (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th edition, ISBN: 0683306472.

Pharmaceutical compositions of the invention generally have a pH between 5.5 and 8.5, in some embodiments this may be between 6 and 8, and in further embodiments about 7. The pH may be maintained by the use of a buffer. The composition may be sterile and/or pyrogen free.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

The composition may be isotonic with respect to humans. In one embodiment pharmaceutical compositions of the invention are supplied in hermetically-sealed containers.

Pharmaceutical compositions will include a therapeutically effective amount of one or more antibodies of the invention and/or a polypeptide comprising an epitope that binds an antibody of the invention *i.e.* an amount that is sufficient to treat, ameliorate, or prevent a desired disease or condition, or to exhibit a detectable therapeutic effect. Therapeutic effects also include reduction in physical symptoms. The precise effective amount for any particular subject will depend upon their size and health, the nature and extent of the condition, and the therapeutics or combination of therapeutics selected for administration. The effective amount for a given situation is determined by routine experimentation and is within the judgment of a clinician. For purposes of the present invention, an effective dose will generally be from about 0.01mg/kg to about 50mg/kg, or about 0.05 mg/kg to about 10 mg/kg of the compositions of the present invention in the individual to which it is administered. Known antibody-based pharmaceuticals provide guidance in this respect *e.g.*, Hereceptin™ is administered by intravenous infusion of a 21 mg/ml solution, with an initial loading dose of 4mg/kg body weight and a weekly maintenance dose of 2mg/kg body weight; Rituxan™ is administered weekly at 375mg/m<sup>2</sup>; *etc.*

In one embodiment pharmaceutical compositions can include more than one (*e.g.* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, *etc.*) antibody of the invention. In another embodiment the composition comprises two or more (*e.g.* 2, 3, 4, 5, *etc.*) antibodies, wherein the first antibody is specific for a first DENV epitope, and the second antibody is specific for a second DENV epitope. In yet another embodiment, the pharmaceutical composition comprises three antibodies of the invention. In another embodiment, the composition comprises two or more (*e.g.* 2, 3, 4, 5, *etc.*) antibodies, that together neutralise more than one dengue virus serotype. In yet another embodiment, the two or more antibodies of the invention together neutralise all four dengue virus serotypes, DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. In a further embodiment two or more antibodies of the invention together neutralise all four dengue virus serotypes by binding at least two distinct epitopes on each dengue virus serotype.

Exemplary antibodies of the invention for use in a pharmaceutical composition that neutralize a dengue virus without contributing to antibody-dependent enhancement of dengue virus infection include, but are not limited to, HMB-DV1, HMB-DV2, HMB-DV3, HMB-DV4, HMB-DV5, HMB-DV6, HMB-DV7, HMB-DV8, HMB-DV9, HMB-DV10, HMB-DV11, HMB-DV12, HMB-DV13, and HMB-DV14.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

In one embodiment, a pharmaceutical composition includes two exemplary antibodies of the invention, for example, HMB-DV3 and HMB-DV7; HMB-DV3 and HMB-DV9; HMB-DV3 and HMB-DV12; HMB-DV3 and HMB-DV14; HMB-DV6 and HMB-DV7; HMB-DV6 and HMB-DV8. In another embodiment, a pharmaceutical composition includes three exemplary  
5 antibodies of the invention, for example, HMB-DV2, HMB-DV3 and HMB-DV6; HMB-DV2, HMB-DV6 and HMB-DV8; HMB-DV2, HMB-DV8 and HMB-DV9; HMB-DV2, HMB-DV8 and HMB-DV12; HMB-DV2, HMB-DV8 and HMB-DV14; HMB-DV5, HMB-DV6 and HMB-DV8. Based on the teachings herein, one of skill in the art can determine other combinations of antibodies for use in a pharmaceutical composition.

10 In one embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV1 or an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV2 or an antigen binding fragment thereof, and a  
15 pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV3 or an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV4 or an  
20 antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In yet another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV5 or an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV6 or an antigen binding fragment thereof, and a  
25 pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV7 or an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier.

In yet another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV8 or an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV9 or an antigen binding fragment  
30 thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV10 or an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In yet another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV11 or an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

diluent or carrier. In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV12 or an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV13 or an antigen binding  
5 fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier. In yet another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the antibody HMB-DV14 or an antigen binding fragment thereof, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier.

Antibodies of the invention may be administered (either combined or separately) with  
10 other therapeutics *e.g.* with chemotherapeutic compounds, with radiotherapy, *etc.* Preferred therapeutic compounds include anti-viral compounds. Such combination therapy provides an additive or synergistic improvement in therapeutic efficacy relative to the individual therapeutic agents when administered alone. The term “synergy” is used to describe a combined effect of  
15 two or more active agents that is greater than the sum of the individual effects of each respective active agent. Thus, where the combined effect of two or more agents results in “synergistic inhibition” of an activity or process, it is intended that the inhibition of the activity or process is greater than the sum of the inhibitory effects of each respective active agent. The term  
“synergistic therapeutic effect” refers to a therapeutic effect observed with a combination of two or more therapies wherein the therapeutic effect (as measured by any of a number of parameters)  
20 is greater than the sum of the individual therapeutic effects observed with the respective individual therapies.

In compositions of the invention that include antibodies of the invention, the antibodies may make up at least 50% by weight (*e.g.* 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% or more) of the total protein in the composition. The antibodies are thus in purified form.

25 The invention provides a method of preparing a pharmaceutical, comprising the steps of: (i) preparing an antibody of the invention; and (ii) admixing the purified antibody with one or more pharmaceutically-acceptable carriers.

The invention also provides a method of preparing a pharmaceutical, comprising the step of admixing an antibody with one or more pharmaceutically-acceptable carriers, wherein the  
30 antibody is a monoclonal antibody that was obtained from a transformed B cell of the invention. Thus the procedures for first obtaining the monoclonal antibody and then preparing the pharmaceutical can be performed at very different times by different people in different places (*e.g.* in different countries).

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

As an alternative to delivering antibodies for therapeutic purposes, it is possible to deliver nucleic acid (typically DNA) that encodes the monoclonal antibody (or active fragment thereof) of interest to a subject, such that the nucleic acid can be expressed in the subject *in situ* to provide a desired therapeutic effect. Suitable gene therapy and nucleic acid delivery vectors are  
5 known in the art.

Compositions of the invention may be immunogenic compositions, and in some embodiments may be vaccine compositions comprising an antigen comprising a DENV epitope. Vaccines according to the invention may either be prophylactic (*i.e.* to prevent infection) or therapeutic (*i.e.* to treat infection).

10 Compositions may include an antimicrobial, particularly if packaged in a multiple dose format. Compositions may comprise detergent *e.g.* a Tween (polysorbate), such as Tween 80. Detergents are generally present at low levels *e.g.* <0.01%. Compositions may include sodium salts (*e.g.* sodium chloride) to give tonicity. A concentration of 10±2mg/ml NaCl is typical.

15 Compositions may comprise a sugar alcohol (*e.g.* mannitol) or a disaccharide (*e.g.* sucrose or trehalose) *e.g.* at around 15-30mg/ml (*e.g.* 25 mg/ml), particularly if they are to be lyophilised or if they include material which has been reconstituted from lyophilised material. The pH of a composition for lyophilisation may be adjusted to around 6.1 prior to lyophilisation.

The compositions of the invention may also comprise one or more immunoregulatory agents. In one embodiment, one or more of the immunoregulatory agents include(s) an adjuvant.

#### 20 ***Medical treatments and uses***

The antibodies, antigen binding fragments, derivatives and variants thereof, or the cocktails and pharmaceutical compositions of the invention can be used for the treatment of DENV infection, for the prevention of DENV infection or for the diagnosis of DENV infection.

25 Methods of diagnosis may include contacting an antibody or an antibody fragment with a sample. Such samples may be tissue samples taken from, for example, salivary glands, lung, liver, pancreas, kidney, ear, eye, placenta, alimentary tract, heart, ovaries, pituitary, adrenals, thyroid, brain or skin. The methods of diagnosis may also include the detection of an antigen/antibody complex.

30 The invention therefore provides (i) an antibody, an antibody fragment, or variants and derivatives thereof according to the invention, (ii) an immortalised B cell clone according to the invention, (iii) an epitope capable of binding an antibody of the invention or (iv) a ligand,

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

preferably an antibody, capable of binding an epitope that binds an antibody of the invention for use in therapy.

Also provided is a method of treating a subject comprising administering to that subject (i) an antibody, an antibody fragment, variants and derivatives thereof, or a pharmaceutical composition according to the invention, or, a ligand, preferably an antibody, capable of binding an epitope that binds an antibody of the invention.

The invention also provides the use of (i) an antibody, an antibody fragment, or variants and derivatives thereof according to the invention, (ii) an immortalised B cell clone according to the invention, (iii) an epitope capable of binding an antibody of the invention, or (iv) a ligand, preferably an antibody, that binds to an epitope capable of binding an antibody of the invention, in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of DENV infection.

The invention provides a pharmaceutical composition for use as a medicament for the prevention or treatment of DENV infection. It also provides the use of an antibody of the invention and/or a protein comprising an epitope to which such an antibody binds in the manufacture of a medicament for treatment of a patient and/or diagnosis in a patient. It also provides a method for treating a subject, *e.g.*, a human subject. The method comprises the step of administering to the subject a therapeutically effective dose of a composition of the invention. One way of checking efficacy of therapeutic treatment involves monitoring disease symptoms after administration of the composition of the invention. Treatment can be a single dose schedule or a multiple dose schedule.

In one embodiment, an antibody, antibody fragment, antibody variant, epitope or pharmaceutical composition according to the invention is administered to a subject in need of such treatment. Such a subject includes, but is not limited to, one who is particularly at risk of or susceptible to DENV infection.

Antibodies of the invention can be used in passive immunisation. Antibodies and fragments or variants thereof, or a nucleic acid encoding an antibody or an antibody fragment or variant as described in the present invention may also be used in a kit for the diagnosis of dengue virus infection.

Epitopes capable of binding an antibody of the invention, *e.g.*, the monoclonal antibodies HMB-DV1, HMB-DV2, HMB-DV3, HMB-DV4, HMB-DV5, HMB-DV6, HMB-DV7, HMB-DV8, HMB-DV9, HMB-DV10, HMB-DV11, HMB-DV12, HMB-DV13, and HMB-DV14, may be used in a kit for monitoring the efficacy of vaccination procedures by detecting the presence of protective anti-DENV antibodies.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

Antibodies, antibody fragments, or variants and derivatives thereof, as described in the present invention may also be used in a kit for monitoring vaccine manufacture with the desired immunogenicity.

The invention also provides a method of preparing a pharmaceutical composition,  
5 comprising the step of admixing a monoclonal antibody with one or more pharmaceutically-  
acceptable carriers, wherein the monoclonal antibody is a monoclonal antibody that was obtained  
from an expression host of the invention. Thus the procedures for first obtaining the monoclonal  
antibody (*e.g.* expressing it and/or purifying it) and then admixing it with the pharmaceutical  
carrier(s) can be performed at very different times by different people in different places (*e.g.* in  
10 different countries).

Starting with a transformed B cell of the invention, various steps of culturing,  
sub-culturing, cloning, sub-cloning, sequencing, nucleic acid preparation *etc.* can be performed  
in order to perpetuate the antibody expressed by the transformed B cell, with optional  
optimisation at each step. In a preferred embodiment, the above methods further comprise  
15 techniques of optimisation (*e.g.* affinity maturation or optimisation) applied to the nucleic acids  
encoding the antibody. The invention encompasses all cells, nucleic acids, vectors, sequences,  
antibodies *etc.* used and prepared during such steps.

In all these methods, the nucleic acid used in the expression host may be manipulated to  
insert, delete or amend certain nucleic acid sequences. Changes from such manipulation include,  
20 but are not limited to, changes to introduce restriction sites, to amend codon usage, to add or  
optimise transcription and/or translation regulatory sequences, *etc.* It is also possible to change  
the nucleic acid to alter the encoded amino acids. For example, it may be useful to introduce one  
or more (*e.g.* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, *etc.*) amino acid substitutions, deletions and/or insertions  
into the antibody's amino acid sequence. Such point mutations can modify effector functions,  
25 antigen-binding affinity, post-translational modifications, immunogenicity, *etc.*, can introduce  
amino acids for the attachment of covalent groups (*e.g.* labels) or can introduce tags (*e.g.* for  
purification purposes). Mutations can be introduced in specific sites or can be introduced at  
random, followed by selection (*e.g.* molecular evolution). For instance, one or more nucleic  
30 acids encoding any of the CDR regions, heavy chain variable regions or light chain variable  
regions of antibodies of the invention can be randomly or directionally mutated to introduce  
different properties in the encoded amino acids. Such changes can be the result of an iterative  
process wherein initial changes are retained and new changes at other nucleotide positions are  
introduced. Moreover, changes achieved in independent steps may be combined. Different

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

properties introduced into the encoded amino acids may include, but are not limited to, enhanced affinity.

### *General*

The term “comprising” encompasses “including” as well as “consisting” *e.g.* a composition “comprising” X may consist exclusively of X or may include something additional *e.g.* X + Y.

The word “substantially” does not exclude “completely” *e.g.* a composition which is “substantially free” from Y may be completely free from Y. Where necessary, the word “substantially” may be omitted from the definition of the invention.

The term “about” in relation to a numerical value  $x$  means, for example,  $x \pm 10\%$ .

The term “disease” as used herein is intended to be generally synonymous, and is used interchangeably with, the terms “disorder” and “condition” (as in medical condition), in that all reflect an abnormal condition of the human or animal body or of one of its parts that impairs normal functioning, is typically manifested by distinguishing signs and symptoms, and causes the human or animal to have a reduced duration or quality of life.

As used herein, reference to “treatment” of a patient is intended to include prevention and prophylaxis as well as therapy. The term “patient” means all mammals including humans. Generally, the patient is a human.

### **EXAMPLES**

Exemplary embodiments of the present invention are provided in the following examples. The following examples are presented only by way of illustration and to assist one of ordinary skill in using the invention. The examples are not intended in any way to limit the scope of the invention.

#### ***Example 1. Cloning of B cells and screening for identification of Dengue virus specific Abs.***

Memory B cells were isolated from the blood of DENV immune donors and immortalized using EBV and CpG as described in reference. Briefly, IgG<sup>+</sup> memory B cells were isolated using CD22 beads, followed by removal of IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup> IgA<sup>+</sup> B cells using specific antibodies and cell sorting. The sorted cells (IgG<sup>+</sup>) were immortalized with EBV in the presence of CpG 2006 and irradiated allogeneic mononuclear cells. Replicate cultures each containing 30-50 memory B cells were set up in several 96 well U-bottom plates. After two weeks the culture supernatants were collected and tested for their capacity to stain C6/36 cells infected with DENV

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

of serotypes 1, 2, 3 or 4 by immunofluorescence analysis and/or to bind to recombinant DENV1-4 E2 proteins by ELISA. Supernatants were tested for their capacity to neutralize DENV infection of either VERO cells or DC-SIGN-transfected Raji cells and to enhance infection of K562 cells. B cell clones were isolated from positive polyclonal cultures as described previously [28]. IgG concentrations in the supernatants of selected clones were determined using an IgG-specific ELISA.

***Example 2. Human mAbs from immortalized B cells recognize Dengue virus proteins and neutralize infection.***

For the viral neutralization and viral enhancement assay, titrated amounts of attenuated DENV of serotypes 1, 2, 3 or 4 were mixed with an equal volume of culture supernatants. Viruses and multiplicity of infection (MOI) used were: rDEN1Δ30 (03JB186-1A+V2) MOI 0.04; rDEN2/4Δ30 (04JBV351-1A-V2) MOI 0.04; rDEN3/4Δ30 (DEN3#107C) MOI 0.02; rDEN4Δ30 (06JBV591-V3+1A1+v2) MOI 0.04. After 1-hour incubation at room temperature the mixture was added to target cells (e.g. VERO cells, DC-SIGN-Raji cells or K562 cells) in 96 well flat bottom plates and incubated at 37°C for 72-96 hours. The cells were then stained with a mouse monoclonal antibody to Dengue virus 1-4 E proteins (clone 4G2), followed by a fluorescein-labeled goat anti mouse Ig and analyzed by FACS. The neutralizing titer is indicated as the concentration of antibody (µg/ml) that gives a 50% reduction of DENV infection.

For identification of the target antigens recognized by the monoclonal antibodies yeasts displaying Dengue virus E protein domains III or domain I-II were stained with the monoclonal antibodies followed by Cy5-labeled goat anti human IgG antibodies and analyzed by FACS. Western blotting experiments were performed using lysates of DENV-infected cells.

Table 3 shows that three different types of antibodies have been identified. They include those that are specific for domain III (DIII) of E protein, those that are specific for domains I-II (DI-II) of E protein and those specific for prM. The antibodies show different degrees of cross-reactivity with the 4 different DENV serotypes and neutralize those serotypes to which they bind.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

Table 3. Target Antigen Specificity of Neutralizing anti-Dengue Virus Antibodies

Antibody	Target Antigen	Dengue Virus Serotypes Neutralized
HMB-DV-1	E, DIII	1,2,3
HMB-DV-2	E, DIII	1,3
HMB-DV-3	prM	1,2,3,4
HMB-DV-4	E, DI-II	1,2,3,4
HMB-DV-5	E, DI-II	1,2,3,4
HMB-DV-6	E, DIII	1,2,3
HMB-DV-7	E, DIII	1,2,3
HMB-DV-8	E	4
HMB-DV-9	E, DIII	2
HMB-DV-10	E, DIII	1,2,3,4
HMB-DV-11	E, DIII	1,2,3,4
HMB-DV-12	E, DI-DII	2
HMB-DV-13	E, DIII	1,2,3,4
HMB-DV-14	E, DIII	2

Table 4 shows the results of virus neutralization assays on VERO cells and DC-SIGN-transfected Raji cells.

Table 4. Neutralization of Dengue Virus (serotypes DENV1-DENV4) by Antibodies

Antibody	Cell type	Neutralization			
		EC <sub>50</sub> values (µg/ml)			
		DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
HMB-DV-1	VERO	0.013	0.577	0.014	> 20
	DC-SIGN-Raji	0.032	5.340	0.055	> 20
HMB-DV-2	VERO	0.006	> 20	0.006	> 20
	DC-SIGN-Raji	0.014	> 20	0.013	> 20
HMB-DV-3	VERO	0.912	1.615	0.120	0.070
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-4	VERO	0.591	0.251	0.809	0.367
	DC-SIGN-Raji	2.250	1.370	0.613	> 20
HMB-DV-5	VERO	0.066	0.034	0.118	0.200
	DC-SIGN-Raji	2.390	0.504	0.348	> 20
HMB-DV-6	VERO	0.008	0.002	0.011	> 20
	DC-SIGN-Raji	0.027	0.440	0.332	> 20
HMB-DV-7	VERO	0.016	0.004	0.020	> 20
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-8	VERO	> 20	> 20	> 20	0.006
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

HMB-DV-9	VERO	> 20	0.002	> 20	> 20
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-10	VERO	> 20	0.084	> 20	0.466
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-11	VERO	> 20	0.048	> 20	0.520
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-12	VERO	ND	0.003	ND	ND
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-13	VERO	0.993	3.326	1.513	> 20
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND
HMB-DV-14	VERO	> 20	0.002	> 20	> 20
	DC-SIGN-Raji	ND	ND	ND	ND

ND: not determined

**Example 3. Neutralizing recombinant anti-Dengue virus antibodies with mutations in the Fc region do not cause enhancement of virus infection on K562 cells.**

Antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue virus infection has been described in the literature. This property could limit the therapeutic effectiveness of anti-dengue virus antibodies for use in clinical situations. Therefore, mRNAs from the immortalized B cell lines expressing antibodies HMB-DV-5, HMB-DV-6 and HMB-DV-8 were isolated, cDNA was synthesized using oligo-dT specific primers, variable regions of heavy and light chain were sequenced and cloned into an expression vector using specific primers. Vectors were transfected into host cells for recombinant expression. In addition to recombinant production of the wild-type IgG1 antibodies, each of the heavy chains was mutated at amino acids 4 and 5 of CH2 domain by substituting an alanine in place of the natural leucine using site-directed mutagenesis thereby creating the LALA variant of each antibody. Both recombinant wild type and mutated antibodies were harvested from the expression cell lines and purified. Both wild-type IgG1 anti-dengue virus antibody and the LALA variant bound to the target protein in comparable manner (data not shown).

Virus neutralization and enhancement was determined as above on VERO cells and K562 cells. Each of the three antibodies has a defined molecular target as well as serotype target (see Table 3). Figure 1 shows that the unmodified recombinant antibodies neutralize target virus infection of VERO cells in a dose-dependent manner (DOTTED LINES). On K562 cells, a cell line that is not efficiently infected by Dengue viruses, the unmodified antibodies show an enhancement of viral infection at concentrations that are generally higher than those required for neutralization (SOLID LINES). The experiment was repeated using the LALA variants of each antibody. Figure 2 shows that each of the LALA variants of the recombinant anti-dengue virus antibodies also neutralized the target virus on VERO cells (DOTTED LINES) in a dose-dependent manner. However, each of the LALA antibodies did not show evidence of antibody-dependent enhancement of infection on K562

**WO 2010/043977****PCT/IB2009/007372**

cells (SOLID LINES). Note, the dose-response is flat on the K562 cells at the concentrations of antibodies used in this experiment and the line appears very close to the X-axis.

All patents and publications referred to herein are expressly incorporated by reference in their entirety.

- 5           It should be noted that there are alternative ways of implementing the present invention and that various modifications can be made without departing from the scope and spirit of the invention. Accordingly, the present embodiments are to be considered as illustrative and not restrictive, and the invention is not to be limited to the details given herein, but may be modified within the scope and equivalents of the appended claims.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

**REFERENCES** (the contents of which are hereby incorporated by reference)

- [1] Lefranc *et al.* (2003) *Dev Comp Immunol.* 27(1):55-77.
- [2] Lefranc *et al.* (1997) *Immunology Today*, 18:509.
- [3] Lefranc (1999) *The Immunologist*, 7:132-136.
- [4] US 4,676,980
- [5] US 4,831,175
- [6] US 5,595,721
- [7] WO00/52031
- [8] WO00/52473
- [9] US 4,766,106
- [10] US 4,179,337
- [11] US 4,495,285
- [12] US 4,609,546
- [13] Knauf *et al.* (1988) *J. Bio. Chem.* 263:15064-15070
- [14] Gabizon *et al.* (1982) *Cancer Research* 42:4734
- [15] Cafiso (1981) *Biochem Biophys Acta* 649:129
- [16] Szoka (1980) *Ann. Rev. Biophys. Eng.* 9:467
- [17] Poznansky *et al.* (1980) *Drug Delivery Systems* (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) pp. 253-315
- [18] Poznansky (1984) *Pharm Revs* 36:277
- [19] Kohler, G. and Milstein, C., 1975, *Nature* 256:495-497.
- [20] Kozbar *et al.* 1983, *Immunology Today* 4:72.
- [21] WO2004/076677
- [22] Chapter 4 of *Kuby Immunology* (4th edition, 2000; ASIN: 0716733315
- [23] Jones *et al.* *Biotechnol Prog* 2003,19(1):163-8
- [24] Cho *et al.* *Cytotechnology* 2001,37:23-30
- [25] Cho *et al.* *Biotechnol Prog* 2003,19:229-32
- [26] US 5,807,715
- [27] US 6,300,104
- [28] Traggiai *et al.* (2004) *Nat Med* 10(8):871-875

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

## CLAIMS

1. A human antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that neutralizes a dengue virus, wherein the antibody does not contribute to antibody-dependent enhancement of dengue virus infection.
- 5 2. A human antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that neutralizes a dengue virus, wherein the antibody comprises a mutation in the Fc region, and wherein the mutation reduces binding of the antibody to an Fc receptor.
3. The antibody of claim **1 or 2**, or an antigen-binding fragment thereof, wherein the Fc region of the antibody comprises a CH2 L4A mutation, a CH2 L5A mutation, or both.
- 10 4. The antibody of claim **1 or 2**, wherein the antibody is a monoclonal antibody or a recombinant antibody.
5. The antibody of claim **1 or 2**, wherein the antibody neutralizes more than one dengue virus of two, three or four different dengue virus serotypes.
6. A pharmaceutical composition comprising two or more human antibodies, or antigen-binding  
15 fragments thereof, wherein the antibodies, or antigen-binding fragments thereof, neutralize dengue virus serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4 by binding at least two distinct epitopes on each dengue virus serotype, and wherein the antibodies do not contribute to antibody-dependent enhancement of dengue virus infection.
7. The composition of claim **6**, comprising three or more human antibodies, or antigen-binding  
20 fragments thereof that neutralize dengue virus serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4.
8. The composition of claim **6**, wherein the antibodies, or antigen-binding fragments thereof, each comprise a mutation in the Fc region that reduces the binding of the antibodies to Fc receptors.
9. The composition of claim **6**, wherein the Fc region of each of the antibodies, or antigen-binding  
25 fragments thereof, comprises a CH2 L4A mutation, a CH2 L5A mutation, or both.
10. The composition of claim **6**, wherein the antibodies, or antigen-binding fragments thereof, are monoclonal antibodies or recombinant antibodies.
11. An antibody, or an antigen binding fragment thereof, comprising at least one complementarity determining region (CDR) sequence having the sequence of any one of SEQ ID NOs: 1-6,

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

17-22, 33-38, 49-54, 67-72, 83-88, 99, 100, 105-110, 121-123, 124, 125, 135-139, 149, 153-158, 169-174, 185-188, or 189, wherein the antibody neutralizes dengue virus infection.

12. The antibody of claim **1, 2 or 11**, or an antigen binding fragment thereof, comprising a heavy chain CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 17, 33, 49, 67, 83, 105, 121, 135, 149, 153, 169, and 185; a heavy chain CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 68, 84, 106, 122, 136, 154, 170, and 186; and a heavy chain CDR3 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 3, 19, 35, 51, 69, 85, 107, 123, 137, 155, 171, and 187, wherein the antibody neutralizes dengue virus infection.
13. The antibody of claim **1, 2 or 11**, or an antigen binding fragment thereof, comprising a light chain CDR1 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 20, 36, 52, 70, 86, 99, 108, 138, 156, 172, and 188; a light chain CDR2 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 21, 37, 53, 71, 87, 109, 124, 157, and 173; and a light chain CDR3 selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 6, 22, 38, 54, 72, 88, 100, 110, 125, 139, 158, 174, and 189, wherein the antibody neutralizes dengue virus infection.
14. The antibody of claim **12**, or an antigen binding fragment thereof, comprising a heavy chain comprising SEQ ID NO: 1 for CDRH1, SEQ ID NO: 2 for CDRH2, SEQ ID NO: 3 for CDRH3; SEQ ID NO: 17 for CDRH1, SEQ ID NO: 18 for CDRH2 and SEQ ID NO: 19 for CDRH3; SEQ ID NO: 33 for CDRH1, SEQ ID NO: 34 for CDRH2 and SEQ ID NO: 35 for CDRH3; SEQ ID NO: 49 for CDRH1, SEQ ID NO: 50 for CDRH2 and SEQ ID NO: 51 for CDRH3; SEQ ID NO: 67 for CDRH1, SEQ ID NO: 68 for CDRH2 and SEQ ID NO: 69 for CDRH3; SEQ ID NO: 83 for CDRH1, SEQ ID NO: 84 for CDRH2 and SEQ ID NO: 85 for CDRH3; SEQ ID NO: 105 for CDRH1, SEQ ID NO: 106 for CDRH2 and SEQ ID NO: 107 for CDRH3; SEQ ID NO: 121 for CDRH1, SEQ ID NO: 122 for CDRH2 and SEQ ID NO: 123 for CDRH3; SEQ ID NO: 135 for CDRH1, SEQ ID NO: 136 for CDRH2 and SEQ ID NO: 137 for CDRH3; SEQ ID NO: 149 for CDRH1, SEQ ID NO: 136 for CDRH2 and SEQ ID NO: 137 for CDRH3; SEQ ID NO: 153 for CDRH1, SEQ ID NO: 154 for CDRH2 and SEQ ID NO: 155 for CDRH3; SEQ ID NO: 169 for CDRH1, SEQ ID NO: 170 for CDRH2 and SEQ ID NO: 171 for CDRH3; and SEQ ID NO: 185 for CDRH1, SEQ ID NO: 186 for CDRH2 and SEQ ID NO: 187 for CDRH3.
15. The antibody of claim **13**, or an antigen binding fragment thereof, comprising a light chain comprising SEQ ID NO: 4 for CDRL1, SEQ ID NO: 5 for CDRL2; SEQ ID NO: 6 for CDRL3;

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

- SEQ ID NO: 20 for CDRL1, SEQ ID NO: 21 for CDRL2; SEQ ID NO: 22 for CDRL3; SEQ ID NO: 36 for CDRL1, SEQ ID NO: 37 for CDRL2; SEQ ID NO: 38 for CDRL3; SEQ ID NO: 52 for CDRL1, SEQ ID NO: 53 for CDRL2; SEQ ID NO: 54 for CDRL3; SEQ ID NO: 70 for CDRL1, SEQ ID NO: 71 for CDRL2; SEQ ID NO: 72 for CDRL3; SEQ ID NO: 86 for CDRL1, SEQ ID NO: 87 for CDRL2; SEQ ID NO: 88 for CDRL3; SEQ ID NO: 99 for CDRL1, SEQ ID NO: 53 for CDRL2; SEQ ID NO: 100 for CDRL3; SEQ ID NO: 108 for CDRL1, SEQ ID NO: 109 for CDRL2; SEQ ID NO: 110 for CDRL3; SEQ ID NO: 70 for CDRL1, SEQ ID NO: 124 for CDRL2; SEQ ID NO: 125 for CDRL3; SEQ ID NO: 138 for CDRL1, SEQ ID NO: 109 for CDRL2; SEQ ID NO: 139 for CDRL3; SEQ ID NO: 156 for CDRL1, SEQ ID NO: 157 for CDRL2; SEQ ID NO: 158 for CDRL3; SEQ ID NO: 172 for CDRL1, SEQ ID NO: 173 for CDRL2; SEQ ID NO: 174 for CDRL3; and SEQ ID NO: 188 for CDRL1, SEQ ID NO: 37 for CDRL2; SEQ ID NO: 189 for CDRL3.
- 5
- 10
16. The antibody of claim **14**, or an antigen binding fragment thereof, comprising a light chain comprising SEQ ID NO: 4 for CDRL1, SEQ ID NO: 5 for CDRL2; SEQ ID NO: 6 for CDRL3; SEQ ID NO: 20 for CDRL1, SEQ ID NO: 21 for CDRL2; SEQ ID NO: 22 for CDRL3; SEQ ID NO: 36 for CDRL1, SEQ ID NO: 37 for CDRL2; SEQ ID NO: 38 for CDRL3; SEQ ID NO: 52 for CDRL1, SEQ ID NO: 53 for CDRL2; SEQ ID NO: 54 for CDRL3; SEQ ID NO: 70 for CDRL1, SEQ ID NO: 71 for CDRL2; SEQ ID NO: 72 for CDRL3; SEQ ID NO: 86 for CDRL1, SEQ ID NO: 87 for CDRL2; SEQ ID NO: 88 for CDRL3; SEQ ID NO: 99 for CDRL1, SEQ ID NO: 53 for CDRL2; SEQ ID NO: 100 for CDRL3; SEQ ID NO: 108 for CDRL1, SEQ ID NO: 109 for CDRL2; SEQ ID NO: 110 for CDRL3; SEQ ID NO: 70 for CDRL1, SEQ ID NO: 124 for CDRL2; SEQ ID NO: 125 for CDRL3; SEQ ID NO: 138 for CDRL1, SEQ ID NO: 109 for CDRL2; SEQ ID NO: 139 for CDRL3; SEQ ID NO: 156 for CDRL1, SEQ ID NO: 157 for CDRL2; SEQ ID NO: 158 for CDRL3; SEQ ID NO: 172 for CDRL1, SEQ ID NO: 173 for CDRL2; SEQ ID NO: 174 for CDRL3; and SEQ ID NO: 188 for CDRL1, SEQ ID NO: 37 for CDRL2; SEQ ID NO: 189 for CDRL3.
- 15
- 20
- 25
17. The antibody of claim **1, 2 or 11**, or an antigen binding fragment thereof, comprising a heavy chain variable region having at least 70% sequence identity to any one of SEQ ID NOs: 13, 29, 45, 61, 65, 79, 95, 117, 131, 145, 151, 165, 181, or 195.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

18. The antibody of claim **1, 2 or 11**, or an antigen binding fragment thereof, comprising a light chain variable region having at least 70% sequence identity to any one of SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 80, 96, 103, 118, 132, 146, 166, 182, or 196.
19. The antibody of claim **1, 2 or 11**, or an antigen binding fragment thereof, wherein the antibody  
5 comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs: 13, 29, 45, 61, 65, 79, 95, 117, 131, 145, 151, 165, 181, or 195, and wherein the antibody comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 80, 96, 103, 118, 132, 146, 166, 182, or 196.
20. An antibody, or an antigen binding fragment thereof, wherein the antibody comprises a heavy  
10 chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 30; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 45 and a light chain  
15 variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 61 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 62; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 65 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 62; or a heavy chain  
20 variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 79 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 80; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 95 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 96; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 95 and a light chain  
25 variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 103; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 117 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 118; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 131 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 132; or a heavy chain  
30 variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 145 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 146; or a heavy chain

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

- variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 151 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 146; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 165 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 166; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 181 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 182; or a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 195 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 196, wherein the antibody neutralizes dengue virus infection.
- 5
- 10 21. The antibody of claim **1, 2, 6, or 11**, wherein the antibody or antibodies are selected from the group consisting of HMB-DV1, HMB-DV2, HMB-DV3, HMB-DV4, HMB-DV5, HMB-DV6, HMB-DV7, HMB-DV8, HMB-DV9, HMB-DV10, HMB-DV11, HMB-DV12, HMB-DV13, and HMB-DV14.
- 15 22. The antibody of any one of the previous claims, or an antigen binding fragment thereof, wherein the antibody is a monoclonal antibody, a single chain antibody, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv or scFv.
23. An antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that binds to the same epitope as the antibody of any one of the previous claims, wherein the antibody or antigen binding fragment thereof neutralizes dengue virus infection.
- 20 24. An antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that cross competes with the antibody of any one of the previous claims, wherein the antibody or antigen binding fragment thereof neutralizes dengue virus infection.
25. A nucleic acid molecule comprising a polynucleotide encoding the antibody, antibodies, or antigen binding fragments thereof, of any one of the above claims.
- 25 26. The nucleic acid molecule of claim **25**, wherein the polynucleotide sequence is at least 70% identical to the nucleic acid sequences of SEQ ID NOs: 7-12, 15, 16, 23-28, 31, 32, 39-44, 47, 48, 55-60, 63, 64, 66, 73-78, 81, 82, 89-94, 97, 98, 101, 102, 104, 111-116, 119, 120, 126-128, 129, 130, 133, 134, 140-143, 144, 147, 148, 150, 152 159-164, 167, 168, 175-180, 183, 184, 190-193, 194, 197 and 198.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

27. A cell expressing the antibody, or an antigen-binding fragment thereof, of any one of claims **1-24**.
28. An immortalised B cell clone expressing the antibody of any one of claims **1-24**.
29. An isolated or purified immunogenic polypeptide comprising an epitope that binds to the antibody of any one of claims **1-24**.
- 5 30. An immunogenic polypeptide comprising the epitope of claim **29**.
31. A pharmaceutical composition comprising at least one antibody of any one of claims **1-5, or 11-24**, or an antigen binding fragment thereof, the nucleic acid of claim **25** or claims **26**, or the immunogenic polypeptide of claim **30**, and a pharmaceutically acceptable diluent or carrier and, optionally, an agent useful for extending the half life of the antibody or antigen binding fragment thereof.
- 10 32. The pharmaceutical composition of any one of claims **6-10**, further comprising a pharmaceutically acceptable diluent or carrier and, optionally, an agent useful for extending the half life of the antibody or antigen binding fragment thereof.
- 15 33. The pharmaceutical composition of claim **31**, comprising a first antibody or antigen binding fragment thereof, specific for a first epitope, and a second antibody or antigen binding fragment thereof, specific for a second epitope.
34. A method of inhibiting dengue virus infection or a dengue virus-related disease comprising the steps of: administering to a subject in need thereof, a therapeutically effective amount of at least one antibody, or antigen-binding fragment thereof, of any one of claims **1-5, or 11-24**, or the composition of any one of claims **6-10, or 31-33**.
- 20 35. The method of claim **34**, additionally comprising the administration of a second therapeutic agent.
36. The method of claim **35**, wherein said second therapeutic agent is an anti-viral agent.
- 25 37. A method of inhibiting dengue virus infection or a dengue virus-related disease comprising the steps of: administering to a subject in need thereof, a therapeutically effective amount of: a first antibody, or antigen-binding fragment thereof, of any one of claims **1-5, or 11-24**, specific for a first epitope, and a second antibody or antigen-binding fragment thereof, specific for a second, different epitope.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

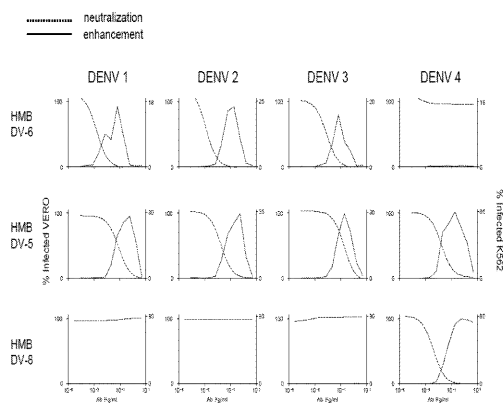
38. A method of treatment of dengue virus infection or a dengue virus-related disease comprising the steps of identifying a patient in need of such treatment and administering to said patient a therapeutically effective amount of a purified, neutralizing, human monoclonal antibody, or antibody fragment of any one of claims **1-5, or 11-24**, or the pharmaceutical composition of any one of claims **6-10, or 31-33**.
39. The method of claim **38**, wherein said treatment comprises the administration of two or more of the antibodies or antigen binding fragment thereof.
40. The method of claim **38**, wherein said treatment comprises the administration of three or more of the antibodies or antigen binding fragment thereof.
41. A method of screening for polypeptides that can induce an immune response against dengue virus, comprising screening polypeptide libraries using the antibody, or antigen binding fragment thereof, of any one of claims **1-5, or 11-24**.
42. A method of monitoring the quality of anti-dengue virus vaccines, comprising the use of the antibody, or antigen binding fragment thereof, of any one of claims **1-5, or 11-24** to check that the antigen of said vaccine contains the specific epitope in the correct conformation.
43. A vaccine comprising an epitope which specifically binds to the antibody, or antigen binding fragment thereof, of any one of claims **1-5, or 11-24**.
44. Use of the antibody of any one of claims **1-24**, or an antigen binding fragment thereof, the nucleic acid of claim **25** or claim **26**, the immunogenic polypeptide of claim **30**, or the pharmaceutical composition of any one of claims **6-10, or 31-33** (i) in the manufacture of a medicament for the treatment of dengue virus infection, (ii) in a vaccine, or (iii) in diagnosis of dengue virus infection.
45. Use of the antibody of any one of claims **1-24**, or an antigen binding fragment thereof, for monitoring the quality of anti- dengue virus vaccines by checking that the antigen of said vaccine contains the specific epitope in the correct conformation.
46. An epitope which specifically binds to the antibody of any one of claims **1-24**, or an antigen binding fragment thereof, for use (i) in therapy, (ii) in the manufacture of a medicament for treating dengue virus infection, (iii) as a vaccine, or (iv) in screening for ligands able to neutralise dengue virus infection.

**(57) Abstract:** The invention relates to antibodies and antigen binding fragments thereof and to cocktails of antibodies and antigen binding fragments that neutralize dengue virus infection without contributing to antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. The invention also relates to immortalized B cells that produce, and to epitopes that bind to, such antibodies and antigen binding fragments. In addition, the invention relates to the use of the antibodies, antigen binding fragments, and epitopes in screening methods as well as in the diagnosis and therapy of dengue virus infection.

WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

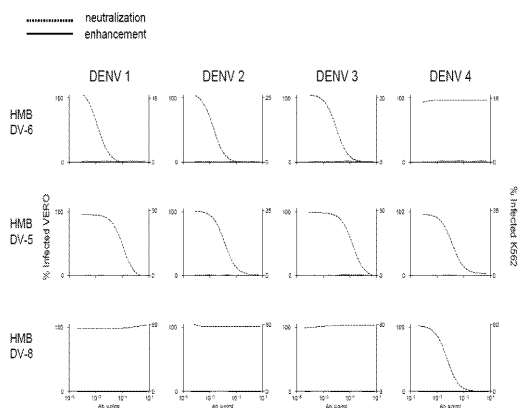
Figure 1. Neutralization and antibody-dependent enhancement of wild-type mAbs



WO 2010/043977

PCT/IB2009/007372

Figure 2. Neutralization and antibody-dependent enhancement of LALA-variant mAbs



【配列表】

2016020334000002.app

专利名称(译)	登革病毒中和抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016020334A</a>	公开(公告)日	2016-02-04
申请号	JP2015112584	申请日	2015-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	生物医学研究所		
申请(专利权)人(译)	学院为研究生物医药		
[标]发明人	アントニオランツァヴェッキア		
发明人	アントニオランツァヴェッキア		
IPC分类号	A61K39/395 C07K16/10 C12N15/09 C07K14/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/12 A61K45/00 A61K35/17 A61P31/14 G01N33/53 G01N33/531 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/1081 C07K2317/21 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/71 C07K2317/76 Y02A50/386		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.S C07K16/10 C12N15/00.A C07K14/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/12 A61K45/00 A61K35/17 A61P31/14 G01N33/53.D G01N33/531.A C12N5/00.102 C12P21/08 A61K39/395.SZN.A C12N15/13 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/BA51 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA94X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA19 4C085/AA14 4C085/BA51 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/DD62 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/BB65 4C087/ZB33 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/104911 2008-10-13 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

甲而无助于登革热病毒感染的抗体依赖性增强，中和登革热病毒感染，抗体和抗原结合片段，以及一个鸡尾酒提供的抗体和抗原结合片段。本发明涉及包括两个或更多的人抗体或抗原结合片段的药物组合物，所述抗体或其抗原结合片段结合到至少两个不同的表位上的登革热病毒血清型登革热病毒血清型DENV-1，DENV-2，DENV-3和并中和DENV-4，该抗体不会导致登革热病毒感染的抗体依赖性增强。此外，产生抗体和抗原结合片段的永生B细胞，以及与抗体和抗原结合片段结合的表位。其中所述抗体或其抗原结合片段包含CH2的L4A突变，CH2的L5A突变或两者的Fc区，其分别降低所述抗体与Fc受体的结合。

(21) 出願番号	特願2015-112584 (P2015-112584)	(71) 出願人	511017287
(22) 出願日	平成27年6月2日 (2015.6.2)		
(62) 分割の表示	特願2011-530592 (P2011-530592)の分割		
原出願日	平成21年10月13日 (2009.10.13)		
(31) 優先権主張番号	61/104, 911		
(32) 優先日	平成20年10月13日 (2008.10.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100157956 弁理士 福井 史生