

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-529096

(P2017-529096A)

(43) 公表日 平成29年10月5日(2017.10.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B064
C07K 16/10 (2006.01)	C07K 16/10	4B065
A01K 67/027 (2006.01)	A01K 67/027	4C076
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C084
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 179 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-524124 (P2017-524124)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月23日 (2015. 7. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年3月17日 (2017. 3. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2015/052139
 (87) 国際公開番号 WO2016/012800
 (87) 国際公開日 平成28年1月28日 (2016. 1. 28)
 (31) 優先権主張番号 1413086.8
 (32) 優先日 平成26年7月23日 (2014. 7. 23)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

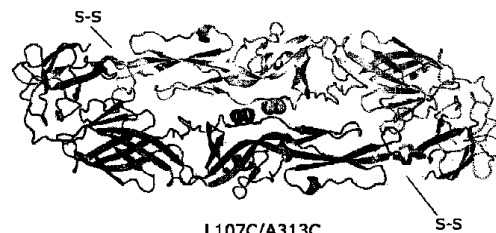
(71) 出願人 507181383
 インペリアル イノベーションズ リミテッド
 イギリス国 エスタブリュ7 2ピージー
 ロンドン、サウス ケンジントン、プリ
 ンセス ゲート 52
 (71) 出願人 517022315
 アンスティテュ パストゥール
 フランス, エフ-75015 パリ,
 28 リュード ドクトル ルー
 (71) 出願人 517022348
 ユニヴェルシテ パリ-シュド
 フランス, 91405 オルセー セデ
 , アヴニユ ジェ. クレマンソー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 Dengue 熱ワクチン及び抗体

(57) 【要約】

Dengue 熱ウイルスエンベロープ二量体エピトープ (EDE) であって、このEDEが、c) Dengue 熱ウイルスエンベロープポリペプチド二量体のポリペプチドに広がる、かつ/またはd) エンベロープタンパク質の二量体上に提示される、かつ/またはc) エンベロープポリペプチド二量体の連続的または非連続的な残基から形成され、この二量体が、DENV-1、DENV-2、DENV-3、及びDENV-4のうちのいずれか1つまたは2つからの、天然及び/または突然変異エンベロープポリペプチドのホモ二量体またはヘテロ二量体である。このEDEは、安定化組換え Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質E外部ドメイン (sE) 二量体であり得、この二量体は、2つのsE単量体間での少なくとも1つのジスルフィド鎖間結合によって共有結合的に安定化される、かつ/または2つのsE単量体間での少なくとも1つのスルフヒドリル反応性架橋剤によって共有結合的に安定化される、かつ/または改変糖類を介して2つのsE単量体を結合することによって共有結合的に安定化される、かつ/または任意にリンカー領域、任意に



L107C/A313C

Figure 32

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

デング熱ウイルスエンベロープ二量体エピトープ (EDE) であって、前記 EDE が、
a) デング熱ウイルスエンベロープポリペプチド二量体のポリペプチドに広がる、かつ
/または

b) エンベロープタンパク質の二量体上に提示される、かつ / または

c) 前記エンベロープポリペプチド二量体の連続的または非連続的な残基から形成され

、
前記二量体が、DENV - 1、DENV - 2、DENV - 3、及び DENV - 4 のうちの
いずれか 1 つまたは 2 つからの、天然及び / または突然変異エンベロープポリペプチド
のホモ二量体またはヘテロ二量体である、デング熱ウイルスエンベロープ二量体エピト
ープ (EDE)。

10

【請求項 2】

任意選択で請求項 1 に記載の、E - 二量体エピトープ (EDE) であって、前記 EDE
が、安定化組換えデング熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E 外部ドメイン (sE) 二
量体であり、前記二量体が、

前記 2 つの sE 単量体間での少なくとも 1 つのジスルフィド鎖間結合によって共有結合
的に安定化される、かつ / または

前記 2 つの sE 単量体間での少なくとも 1 つのスルフィドリル反応性架橋剤によって共
有結合的に安定化される、かつ / または

20

改変糖類を介して前記 2 つの sE 単量体を結合することによって共有結合的に安定化され
る、かつ / または

任意にリンカー領域、任意にグリシンセリンリッチなリンカー領域が前記 sE 配列を分
離しながら、単一ポリペプチド鎖として形成されることによって、共有結合的に安定化さ
れる、かつ / または

前記二量体界面でまたは各単量体のドメイン 1 (D1) / ドメイン 3 (D3) リンカー
において、少なくとも 1 つの sE 単量体のアミノ酸配列中の少なくとも 1 つのアミノ酸残
基を、少なくとも 1 つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって、非共有結合的に
安定化される、E - 二量体エピトープ (EDE)。

30

【請求項 3】

前記組換え sE 単量体が、配列番号 132、配列番号 133、配列番号 134、配列番
号 135、ならびに H27F、H27W、L107C、F108C、H244F、H24
4W、S255C、A259C、T/S262C、T/A265C、L278F、L29
2F、L294N、A313C、及び T315C の中から選択される少なくとも 1 つの突
然変異、ならびに任意に、Q227N、E174N、及び D329N の中から選択される
少なくとも 1 つの突然変異を有する、それらの突然変異体 sE からなる群から選択される
、請求項 1 または請求項 2 に記載の EDE。

【請求項 4】

前記二量体が、各 sE 単量体の 67 位、及び任意に 153 位でグリコシル化される、請
求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の EDE。

40

【請求項 5】

前記 2 つの sE 単量体間での少なくとも 1 つ、2 つ、または 3 つのジスルフィド鎖間結
合によって共有結合的に安定化される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の EDE。

【請求項 6】

請求項 3 に記載の前記突然変異 A259C または S255C をそれぞれ有する突然変異
体 sE のホモ二量体であり、前記残基 259C または 255C がジスルフィド鎖間結合を
介して一緒に結合している、請求項 5 に記載の EDE。

【請求項 7】

請求項 2 に記載の前記突然変異 A259C を有する突然変異体 sE と、請求項 3 に記載
の前記突然変異 S255C を有する突然変異体 sE とのヘテロ二量体であり、前記残基 2

50

59C及び255Cが、ジスルフィド鎖間結合を介して一緒に結合している、請求項5に記載のEDE。

【請求項8】

請求項3に記載の前記突然変異F108C及びT315Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体、または請求項2に記載の前記突然変異L107C及びA313Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体であり、前記残基108C及び315Cまたは前記残基107C及び313Cが、ジスルフィド鎖間結合を介して一緒に結合している、請求項5に記載のEDE。

【請求項9】

請求項3に記載の前記突然変異F108C及びA313Cを有する突然変異体sEと、請求項3に記載の前記突然変異L107C及びT315Cを有する突然変異体sEとのヘテロ二量体であり、前記残基108C及び313Cが、前記2つのsE単量体間でのジスルフィド鎖間結合を介して前記残基315C及び107Cにそれぞれ結合している、請求項5に記載のEDE。

10

【請求項10】

請求項3に記載の前記突然変異A259C、F108C、及びT315Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体、前記突然変異S255C、F108C、及びT315Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体、前記突然変異A259C、L107C、及びA313Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体、ならびに前記突然変異A255C、L107C、及びA313Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体からなる群から選択され、前記残基259C、255C、108C、315C、107C、及び313Cが、ジスルフィド鎖間結合を介して前記残基259C、255C、315C、108C、313C、及び107Cにそれぞれ結合している、請求項5に記載のEDE。

20

【請求項11】

請求項3に記載の前記突然変異A259C、F108C、及びT315Cを有する突然変異体sEと、請求項3に記載の前記突然変異S255C、F108C、及びT315Cを有する突然変異体sEとのヘテロ二量体であり、前記残基259C、108C、及び315Cが、ジスルフィド鎖間結合を介して前記残基255C、315C、及び108Cにそれぞれ結合している、請求項5に記載のEDE。

30

【請求項12】

請求項3に記載の前記突然変異S255C、L107C、及びA313Cを有する突然変異体sEと、請求項3に記載の前記突然変異A259C、L107C、及びA313Cを有する突然変異体sEとのヘテロ二量体であり、前記残基255C、107C、及び313Cが、ジスルフィド鎖間結合を介して前記残基259C、313C、及び107Cにそれぞれ結合している、請求項5に記載のEDE。

【請求項13】

前記sE単量体間での少なくとも1つ、2つ、または3つのスルフヒドリル反応性架橋剤によって共有結合的に安定化される、請求項1～12のいずれか一項に記載のEDE。

【請求項14】

前記スルフヒドリル反応性架橋剤が、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、ビニルスルホン、ハロゲン化アルキル、またはアジリジン化合物、アクリロイル誘導体、アリール化剤、またはチオール-ジスルフィド交換試薬からなる群から選択される、請求項12に記載のEDE。

40

【請求項15】

前記マレイミドスルフヒドリル反応性架橋剤が、BMOE、BMB、BMH、TMEA、BM(PEG)₂、BM(PEG)₃、BMD B、DTME、ならびに好ましくは、BMH、BM(PEG)₂、及びBM(PEG)₃からなる群から選択される、請求項14に記載のEDE。

【請求項16】

50

請求項 3 に記載の前記突然変異 T / S 2 6 2 C または T / A 2 6 5 C をそれぞれ有する突然変異体 s E のホモ二量体であり、前記残基 2 6 2 C または 2 6 5 C が、スルフヒドリル反応性架橋剤を介して一緒に結合している、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 1 7】

請求項 3 に記載の前記突然変異 T / S 2 6 2 C を有する突然変異体 s E と、請求項 3 に記載の前記突然変異 T / A 2 6 5 C を有する突然変異体 s E とのヘテロ二量体であり、前記残基 2 6 2 C 及び 2 6 5 C が、スルフヒドリル反応性架橋剤を介して一緒に結合している、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 1 8】

s E の前記アミノ酸残基 1 ~ 9、2 5 ~ 3 0、2 3 8 ~ 2 8 2、9 6 ~ 1 1 1、及び 3 1 1 ~ 3 1 8 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸残基がシステインに突然変異している、突然変異体 s E と、s E の前記アミノ酸残基 1 ~ 9、2 5 ~ 3 0、2 3 8 ~ 2 8 2、9 6 ~ 1 1 1、及び 3 1 1 ~ 3 1 8 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸残基がシステインに突然変異している、突然変異体 s E とのホモ二量体またはヘテロ二量体であり、前記突然変異したシステイン残基が、スルフヒドリル反応性架橋剤を介して一緒に結合している、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 1 9】

前記組換え s E のうちの 1 つまたは前記 2 つの組換え s E が、H 2 7 F、H 2 7 W、H 2 4 4 F、H 2 4 4 W、及び L 2 7 8 F からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異を有する、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 2 0】

前記組換え s E のうちの 1 つまたは前記 2 つの組換え s E が、L 2 9 2 F 及び L 2 9 4 N からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異を有する、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 2 1】

突然変異体 s E のホモ二量体またはヘテロ二量体であり、

- 一方の s E 単量体が、グリコシル化部位を導入する少なくとも 1 つの突然変異を有し、前記突然変異したアミノ酸残基が、X 官能基を担持する改変糖でグリコシル化され、

- もう一方の s E 単量体が、グリコシル化部位を導入する少なくとも 1 つの突然変異を有し、前記突然変異したアミノ酸残基が、Y 官能基を担持する改変糖でグリコシル化され、

両方の突然変異した残基が、具体的にはクリック化学によって、第 1 の s E 単量体の前記糖の前記 X 官能基をもう一方の s E 単量体の前記糖の前記 Y 官能基と反応させることによって、前記改変糖類を介して一緒に結合している、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 2 2】

前記 E D E が、安定化組換え Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E 外部ドメイン (s E) 二量体、エンベロープタンパク質の二量体、もしくはその抗原部分、または異種骨格タンパク質内に保持された前記エンベロープポリペプチド二量体の連続的もしくは非連続的な残基を含み、任意に、単量体間の共有結合及び/または非共有結合のレベルが増加し、任意に、前記 E D E が改善された E D E である、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 2 3】

前記 E D E が、前記エンベロープタンパク質の二量化を促進するまたは安定化させる条件下で、エンベロープ外部ドメインを含み、任意に、前記エンベロープ外部ドメインが、二量化を促進するために高濃度で維持される、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 2 4】

前記 E D E が、前記 D E N V - 1 もしくは D E N V - 2 ポリペプチド配列の位置 E 4 9

10

20

30

40

50

、K 6 4、Q 7 7、W 1 0 1、V 1 2 2、N 1 3 4、N 1 5 3、T 1 5 5、I 1 6 1、A 1 6 2、P 1 6 9、T 2 0 0、K 2 0 2、E 2 0 3、L 3 0 8、K 3 1 0、Q 3 2 3、W 3 9 1、F 3 9 2 のうちの 1 つ以上、または Dengue 熱ウイルスエンベロープタンパク質の等価残基、

及び / あるいは

前記 D E N V - 2 もしくは D E N V - 4 ポリペプチド配列の位置

A 7 1、C 1 0 5、C 7 4、D 1 5 4、D 2 4 9、D 2 7 1、D 3 0 9、D 3 6 2、D 9 8、E 1 4 8、E 3 1 1、E 4 4、E 7 1、E 8 4、G 1 0 2、G 1 0 4、G 1 0 6、G 1 5 2、G 1 5 6、G 2 8、G 2 9、G 3 7 4、H 1 5 8、H 2 7、I 1 1 3、I 3 0 8、I 4 6、K 2 4 6、K 2 4 7、K 3 1 0、K 3 2 3、K 3 2 5、K 4 7、L 1 1 3、L 4 5、L 8 2、M 2 7 8、N 1 0 3、N 1 5 3、N 3 6 2、N 6 7、N 8 3、Q 2 4 8、Q 2 7 1、Q 3 2 5、Q 7 7、R 2、R 2 4 7、R 3 2 3、R 7 3、R 9 9、S 7 2、S 8 1、T 1 1 5、T 1 5 5、T 3 6 1、T 4 6、T 6 8、T 6 9、T 7 0、T 7 2、V 1 1 3、V 1 1 4、V 2 5 0、V 3 0 9、V 3 2 4、V 9 7、W 1 0 1 のうちの 1 つ以上

10

、
 または Dengue 熱ウイルスエンベロープタンパク質の等価残基、を含み、
 任意に、N 1 5 3 及び / または N 6 7 が、グリコシル化され、
 任意に、前記 E D E が、位置 W 1 0 1 及び少なくとも 1 つの他の位置を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の E D E。

20

【請求項 25】

前記特定残基が、エンベロープタンパク質の天然二量体における前記残基と実質的に同様の空間的配置にある、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 26】

前記 E D E が、ドメイン I I 側上の b ストランド、及びドメイン I 側（前記二量体界面の向かいの）上の「150 ループ」によって形成されたくぼみの中心に置かれた領域を含み、前記 150 ループが残基 148 ~ 159 に広がり、ドメイン I の b ストランド E 0 及び F 0 を接続し、前記 N 1 5 3 グリカンを担当し、これは前記二量体における前記パートナーサブユニットの融合ループを覆い、任意に、前記領域が、前記 b ストランド（前記 N 6 7 グリカンを担当する残基 67 ~ 74）、すぐ上流の前記融合ループ及び残基（残基 97 ~ 106）、ならびに参照サブユニットの i j ループ（残基 246 ~ 249）を含み、前記参照サブユニットが前記融合ループに貢献する前記サブユニットであり、

30

任意に、前記 E D E が、前記第 2 のサブユニットの前記 150 ループ及び前記 N 1 5 3 グリカン鎖をさらに含み、

任意に、一方または両方の領域が、前記天然領域と実質的に同様の空間的配置にある、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 27】

前記 E D E が、ビリオンまたはサブウイルス粒子またはウイルス様粒子の一部として提示される、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 28】

前記 E D E が、一旦、対象、好ましくはヒトに投与されると、抗体を作り出すことができ、前記抗体が、1 種を超える血清型の Dengue 熱ウイルスに結合することができ、任意に、4 種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスに結合することができ、1 種を超える血清型の Dengue 熱ウイルスを中和することができ、任意に、4 種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを中和することができ、

40

かつ前記抗体が、任意に、4 種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを 100 % 中和することができ、任意に、ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られるウイルスを中和することができ、好ましくは、ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られる 4 種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを 100 % 中和することができる、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 29】

50

前記 E D E が安定化されるか、または前記二量体配置において、任意に、前記二量体の内向き面に結合するか、または前記二量体と関連するタグに結合する抗体によってさらに安定化される、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 3 0】

前記 E D E が、単一ポリペプチドとして表され、任意に、前記 2 つのエンベローブ単量体が、リンカーによって分離され、任意に、前記リンカーが、グリシン及び / またはセリンリッチである、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の E D E。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の E D E、またはその免疫原断片をコードする核酸であって、任意に、前記核酸がイントロンを有さず、任意に、前記核酸が、前記 E D E の単離または精製に有用なヌクレオチドをさらに含む、核酸。

10

【請求項 3 2】

請求項 3 1 に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 3 3】

請求項 3 1 に記載の核酸、または請求項 3 2 に記載のベクターを含む宿主細胞であって、任意に、C 6 / 3 6 昆虫細胞、ヒト樹状細胞、CHO 細胞、またはピキア・パストリス細胞である、宿主細胞。

【請求項 3 4】

請求項 3 1 に記載の核酸、または請求項 3 2 に記載のベクター、または請求項 3 3 に記載の宿主細胞によって形質転換される少なくとも 1 つの細胞を含む、非ヒトトランスジェニック動物。

20

【請求項 3 5】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の E D E の合成のための方法であって、

a) 請求項 4 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の 2 つの単一または複数のシステイン突然変異体 s E を、酸化条件下で接触させるステップと、及び / または

b) 2 つの s E 単量体を、請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つ、2 つ、または 3 つのスルフヒドリル反応性架橋剤と接触させるステップと、及び / または

c) 請求項 2 0 に記載のグリコシル化部位を有する 2 つの s E 単量体を、クリック化学によって接触させるステップと、及び / または

30

d) 少なくとも 1 つの s E 単量体の前記アミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸残基を、請求項 1 8 及び 1 9 のいずれか一項に記載のかさ高い側鎖アミノ酸と置換する 2 つの s E 単量体と接触させるステップと、を含む、方法。

【請求項 3 6】

請求項 3 5 に記載のプロセスによって得られる、E D E。

【請求項 3 7】

請求項 1 ~ 3 0 に記載の E D E の産生のためのプロセスであって、以下の段階：

I . 請求項 3 3 に記載の細胞の適切な培地における培養、

II . 前記 E D E の回収、を含み、前記回収が、前記培養培地または前記培養細胞のいずれかからである、プロセス。

40

【請求項 3 8】

感受性のある哺乳動物対象における Dengue 熱ウイルス感染の予防及び / または治療を目的とする免疫原性組成物を調製するための、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の E D E の使用。

【請求項 3 9】

治療有効量の、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の E D E を含む、Dengue 熱ウイルスの免疫原性組成物。

【請求項 4 0】

薬剤として、好ましくは Dengue 熱ウイルス感染を予防及び / または治療するための、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の E D E、または請求項 3 2 に記載の免疫原性組成物

50

。

【請求項 4 1】

動物に免疫性を与えるための、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の E D E、または請求項 3 2 に記載の免疫原性組成物の使用。

【請求項 4 2】

前記二量体に対する中和抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞の調製のための、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の E D E の使用。

【請求項 4 3】

デング熱ウイルス感染に対するワクチン接種で用いるための、デング熱ウイルスの請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の E D E またはその免疫原性断片を示す、組成物。

10

【請求項 4 4】

デング熱ウイルス感染に対するワクチン接種で用いるための、請求項 3 1 に記載の E D E をコードする核酸、もしくはその免疫原性断片、または請求項 3 2 に記載のベクター、または請求項 3 3 に記載の細胞。

【請求項 4 5】

デング熱ウイルス感染に対するワクチン接種で用いるための、

d) 請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載の E D E またはその免疫原性断片、

e) 請求項 3 1 に記載の核酸、

f) 請求項 3 2 に記載のベクター、

g) 請求項 3 3 に記載の細胞

20

のうちの任意の 1 つ以上を含む、組成物。

【請求項 4 6】

a) 請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載の E D E またはその免疫原性断片、

b) 請求項 3 1 に記載の核酸、

c) 請求項 3 2 に記載のベクター、

d) 請求項 3 3 に記載の細胞が、

1 種を超える、任意に 2 種、任意に 3 種、任意に 4 種の血清型のデング熱ウイルスからのものであるか、またはそれらの E D E をコードする、請求項 4 3 及び 4 5 のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 7】

30

a) 請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載の E D E またはその免疫原性断片、

b) 請求項 3 1 に記載の核酸、

c) 請求項 3 2 に記載のベクター、

d) 請求項 3 3 に記載の細胞が、

4 種すべての血清型のデング熱ウイルスを中和する抗体を作り出すことができる単一 E D E であるか、またはそれをコードし、任意に、作り出された前記抗体が、4 種すべての血清型のデング熱ウイルスを完全に中和することができ、任意に、昆虫細胞及びヒト細胞で作られる 4 種すべての血清型のデング熱ウイルスを完全に中和することができる、請求項 4 3 及び 4 5 のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 8】

40

デング熱ウイルスに対するワクチンのために適当な抗原を選択する方法であって、前記方法が、候補抗原に応答する対象において作製された 1 つ以上の抗体の特徴付けを含み、任意に、前記候補抗原が、請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載の E D E と結合することが知られている抗体のパネルに結合することがこれまでに見出されている、方法。

【請求項 4 9】

前記抗体が、前記候補抗原に曝露された対象の分類された単一形質細胞から得られる、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記主要抗体（複数を含む）が、任意に、ウエスタンブロットにおいて、デング熱エンペロープタンパク質を含む直線状エピトープを認識する場合、前記候補抗原がワクチン抗

50

原として適していないと見なされる、請求項 48 及び 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記主要抗体（複数を含む）が、請求項 1～30 のいずれかに記載の EDE に結合する場合、前記候補抗原がワクチン接種で用いるのに適していると思なされる、請求項 48～50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記抗体が、2種以上の異なる血清型の Dengue 熱ウイルスの、請求項 1～30 のいずれかに記載のエンペロープタンパク質または EDE に対する交差反応について評価される、請求項 48～51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

前記候補抗原が、Dengue 熱エンペロープタンパク質の安定化二量体である、請求項 48～52 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

Dengue 熱ウイルスワクチン接種のための患者の必要性を評価するための方法であって、前記方法が、前記対象における抗 EDE 抗体及び抗融合ループ抗体のレベルの同定を含み、前記 EDE が請求項 1～30 のうちのいずれかに記載される通りである、方法。

【請求項 55】

前記患者が、抗 EDE 抗体を有すると判定される場合、ワクチン接種が不要である可能性が高い、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記患者が抗 EDE 抗体を有すると判定される場合、前記患者にブースト投与が供される、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 57】

前記患者が抗 EDE 抗体を有さない場合、全ワクチン接種が必要とされる、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 58】

Dengue 熱ウイルスから保護するためのワクチン接種戦略であって、

a) 4種すべての血清型に対して抗体を作り出すことができる請求項 1～30 のいずれかに記載の EDE、または請求項 43 及び 45～47 のうちのいずれか一項に記載の組成物、または請求項 44 に記載の核酸もしくはベクターの単回投与、任意に、続いて、弱毒化した Dengue 熱ウイルスの投与、または

b) 請求項 1～30 のいずれかに記載の 2種の血清型からの 2つの EDE の投与、続いて、その他の 2種の血清型からの EDE の投与、任意に、続いて、弱毒化した Dengue 熱ウイルスの投与、または

c) 弱毒化した Dengue 熱ウイルスの投与、続いて、4種すべての血清型に対して抗体を作り出すことができる請求項 1～30 のいずれかに記載の EDE の投与、または

d) 4種すべての血清型に対して抗体を作り出すことができる請求項 1～30 のいずれかに記載の EDE の投与、続いて、弱毒化した Dengue 熱ウイルスの投与、または

e) 弱毒化した Dengue 熱ウイルスの投与、続いて、請求項 1～30 のいずれかに記載の 2種の血清型からの 2つの EDE の投与、続いて、その他の 2種の血清型からの EDE の投与、を含む、ワクチン接種戦略。

【請求項 59】

任意に、前記化合物、核酸、ベクター、または組成物が、Dengue 熱ウイルス、任意に、弱毒化した Dengue 熱ウイルス、及び/または Dengue 熱ウイルス様粒子の投与前または投与後の投与のためのものであり、前記 Dengue 熱ウイルスまたは Dengue 熱ウイルス様粒子が 1種以上の血清型の Dengue 熱ウイルスの一群であり得る、Dengue 熱ウイルス感染に対するワクチン接種のためのブースト戦略で用いるための、請求項 43 及び 45～47 に記載の組成物、または請求項 44 に記載の核酸もしくはベクター。

【請求項 60】

請求項 1～20 のいずれか一項に記載の安定化組換え sE 二量体である前記 EDE に対

10

20

30

40

50

する単離された中和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断片が、残基 67 ~ 74、残基 97 ~ 106、残基 307 ~ 314、残基 148 ~ 159、及び残基 243 ~ 251 からなる Dengue 熱ウイルスの糖タンパク質 E 外部ドメインの 5 つのポリペプチドセグメントに結合する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 61】

前記 s E 残基 N 67 グリカンに結合する、請求項 60 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 62】

Dengue 熱ウイルスのピリオン依存性エピトープを単独に認識する、請求項 60 または 61 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 63】

F a b 断片である、請求項 60 ~ 62 のいずれか一項に記載の断片。

【請求項 64】

残基 148 ~ 159、好ましくは前記 s E 残基 N 153 グリカンからなる前記 s E ポリペプチドセグメントにさらに結合する、請求項 60 ~ 63 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 65】

配列番号 5 ~ 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する C D R 領域を含む、請求項 64 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 66】

配列番号 5、6、及び 7 の前記アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 64 に記載の抗体またはその断片。

20

【請求項 67】

配列番号 10 の前記アミノ酸配列、任意に配列番号 8 及び 9 の前記アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む、請求項 66 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 68】

配列番号 17 の前記重鎖可変領域及び配列番号 18 の前記軽鎖可変領域、または配列番号 19 の前記重鎖可変領域及び配列番号 20 の前記軽鎖可変領域を含む、請求項 60 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 69】

前記 s E 残基 K 310 にさらに結合する、請求項 61 ~ 63 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

30

【請求項 70】

配列番号 21 ~ 32 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する C D R 領域を含む、請求項 69 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 71】

配列番号 21、22、及び 23 の前記アミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 24、25、及び 26 の前記アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 70 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 72】

配列番号 27、28、及び 29 の前記アミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに配列番号 30、31、及び 32 の前記アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 70 に記載の抗体またはその断片。

40

【請求項 73】

配列番号 33 の前記重鎖可変領域及び配列番号 34 の前記軽鎖可変領域、または配列番号 35 の前記重鎖可変領域及び配列番号 36 の前記軽鎖可変領域を含む、請求項 69 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 74】

a) 哺乳動物を請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の E D E または請求項 39 に記

50

載の免疫原性組成物と接触させるステップと、

b) 前記哺乳動物由来の1つ以上の血清試料中の前記EDEを対象とする抗体の存在を検出するステップと、

c) 前記哺乳動物から脾臓細胞を採取するステップと、

d) ハイブリドーマ細胞を産生するために、前記脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させるステップと、

e) 前記抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞を特定するステップと、

f) 前記抗体を産生することができる前記ハイブリドーマ細胞を培養するステップと、

g) 任意に、前記抗体を単離するステップと、を含む、請求項60~73のいずれか一項に記載の抗体の産生方法。

【請求項75】

請求項74に記載のプロセスによって得られる、抗体。

【請求項76】

請求項60~73のいずれか一項に記載の抗体を発現することができる、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項77】

1種を超える血清型の Dengue 熱ウイルス、任意に2種の血清型の Dengue 熱ウイルス、任意に3種の血清型の Dengue 熱ウイルス、任意に4種の血清型の Dengue 熱ウイルス、任意にすべての血清型の Dengue 熱ウイルスを中和する、化合物。

【請求項78】

E二量体エピトープ(EDE)に結合する、化合物。

【請求項79】

前記化合物が、ポリペプチド、任意にその抗体または抗原結合部分であり、任意に前記ポリペプチドが切断ポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドがより大きいポリペプチド内である、請求項77または78のいずれかに記載の化合物。

【請求項80】

前記EDEが、

a) Dengue 熱ウイルスエンベロープポリペプチド二量体のポリペプチドに広がる、かつ/または

b) エンベロープタンパク質の二量体上に提示される、かつ/または

c) 前記エンベロープポリペプチド二量体の連続的または非連続的な残基から形成され、

前記二量体が、DENV-1、DENV-2、DENV-3、及びDENV-4のうちのいずれか1つまたは2つからの、天然及び/または突然変異エンベロープポリペプチドのホモ二量体またはヘテロ二量体である、請求項77~79のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項81】

前記EDEが、安定化組換え Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質E外部ドメイン(sE)二量体、エンベロープタンパク質の二量体、もしくはその抗原部分、または異種骨格タンパク質内に保持された前記エンベロープポリペプチド二量体の連続的もしくは非連続的な残基を含み、任意に、単量体間の共有結合及び/または非共有結合のレベルが増加し、任意に、前記EDEが改善されたEDEである、請求項77~80のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項82】

前記EDEがビリオンの一部ではない、請求項77~81のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項83】

前記EDEが、前記エンベロープタンパク質の二量化を促進するまたは安定化させる条件下で、エンベロープ外部ドメインを含み、任意に、前記エンベロープ外部ドメインが、

10

20

30

40

50

二量化を促進するために高濃度で維持される、請求項 77 ~ 82 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 84】

前記 EDE が、安定化した EDE を含み、エンベロップタンパク質の前記二量体 前記エンベロップタンパク質が前記二量体配置において安定性を増加するように操作されている、請求項 77 ~ 83 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 85】

前記安定化した EDE が、

r) 前記単量体が、配列番号 49 の前記 DENV - 1 sE、配列番号 51 の前記 DENV - 2 sE 配列番号 53 の前記 DENV - 3 sE、配列番号 55 の前記 DENV - 4 sE、ならびに H27F、H27W、L107C、F108C、H244F、H244W、S255C、A259C、T/S262C、T/A265C、L278F、L292F、L294N、A313C、及び T315C の中から選択される少なくとも 1 つの突然変異 (置換) を有するその突然変異体 sE からなる群から選択され、任意に、その前記突然変異体 sE が Q227N、E174N、及び D329N の中から選択される少なくとも 1 つの突然変異 (置換)、好ましくは前記 3 つの突然変異 Q227N、E174N、及び D329N をさらに有する、二量体、

s) 前記二量体が、上に定義される 2 つの同一の組換え sE のホモ二量体、または上に定義される 2 つの異なる組換え sE のヘテロ二量体であり得、前記二量体が好ましくは、ホモ二量体であり、例えば、上に定義される DENV - 1 sE と DENV - 2 sE とのヘテロ二量体であり得る、二量体である。それはまた、上に定義される DENV - 1 sE のヘテロ二量体及び DENV - 1 sE の突然変異体 sE であり得る、二量体、

t) 各 sE 単量体の 67 位 (Asn67 グリカン) 及び / または 153 位 (Asn153 グリカン) で、好ましくは各単量体の少なくとも 67 位 (Asn67 グリカン) でグリコシル化される、二量体、

u) 前記 2 つの sE 単量体間での少なくとも 1 つ、2 つ、または 3 つのジスルフィド鎖間結合によって共有結合的に安定化される、二量体、

v) 上に定義される前記突然変異 A259C または S255C をそれぞれ有する突然変異体 sE のホモ二量体であり、前記残基 259C または 255C がジスルフィド鎖間結合を介して一緒に結合している、二量体、

w) 上に定義される前記突然変異 A259C を有する突然変異体 sE と、上に定義される前記突然変異 S255C を有する突然変異体 sE とのヘテロ二量体であり、前記残基 259C 及び 255C が、ジスルフィド鎖間結合を介して一緒に結合している、二量体、

x) 上に定義される前記突然変異 F108C 及び T315C をそれぞれ有する突然変異体 sE のホモ二量体、または上に定義される前記突然変異 L107C 及び A313C をそれぞれ有する突然変異体 sE のホモ二量体であり、前記残基 108C 及び 315C または前記残基 107C 及び 313C が、ジスルフィド鎖間結合を介して一緒に結合している、二量体、

y) 上に定義される前記突然変異 F108C 及び A313C を有する突然変異体 sE と、上に定義される前記突然変異 L107C 及び T315C を有する突然変異体 sE とのヘテロ二量体であり、前記残基 108C 及び 313C が、それぞれ、前記 2 つの sE 単量体間でのジスルフィド鎖間結合を介して前記残基 315C 及び 107C に結合している、二量体、

z) 上に定義される、前記突然変異 A259C、F108C、及び T315C をそれぞれ有する突然変異体 sE のホモ二量体、前記突然変異 S255C、F108C、及び T315C をそれぞれ有する突然変異体 sE のホモ二量体、前記突然変異 A259C、L107C、及び A313C をそれぞれ有する突然変異体 sE のホモ二量体、ならびに前記突然変異 A255C、L107C、及び A313C をそれぞれ有する突然変異体 sE のホモ二量体からなる群から選択され、前記残基 259C、255C、108C、315C、107C、及び 313C が、それぞれ、ジスルフィド鎖間結合を介して前記残基 259C、2

10

20

30

40

50

5 5 C、3 1 5 C、1 0 8 C、3 1 3 C、及び1 0 7 Cに結合している、二量体、

a a) 上に定義される前記突然変異 A 2 5 9 C、F 1 0 8 C、及び T 3 1 5 C を有する突然変異体 s E と、上に定義される前記突然変異 S 2 5 5 C、F 1 0 8 C、及び T 3 1 5 C を有する突然変異体 s E とのヘテロ二量体であり、前記残基 2 5 9 C、1 0 8 C、及び 3 1 5 C が、それぞれ、ジスルフィド鎖間結合を介して前記残基 2 5 5 C、3 1 5 C、及び 1 0 8 C に結合している、二量体、

b b) 上に定義される前記突然変異 S 2 5 5 C、L 1 0 7 C、及び A 3 1 3 C を有する突然変異体 s E と、上に定義される前記突然変異 A 2 5 9 C、L 1 0 7 C、及び A 3 1 3 C を有する突然変異体 s E とのヘテロ二量体であり、前記残基 2 5 5 C、1 0 7 C、及び 3 1 3 C が、それぞれ、ジスルフィド鎖間結合を介して前記残基 2 5 9 C、3 1 3 C、及び 1 0 7 C に結合している、二量体、

c c) 前記 s E 単量体間での少なくとも1つ、2つ、または3つのスルフヒドリル反応性架橋剤（チオール反応性架橋剤とも呼ばれる）によって共有結合的に安定化される、二量体、

d d) 上に定義される前記突然変異 T / S 2 6 2 C または T / A 2 6 5 C をそれぞれ有する突然変異体 s E のホモ二量体であり、前記残基 2 6 2 C または 2 6 5 C が、スルフヒドリル反応性架橋剤によって一緒に結合している、二量体、

e e) 上に定義される前記突然変異 T / S 2 6 2 C を有する突然変異体 s E と、上に定義される前記突然変異 T / A 2 6 5 C を有する突然変異体 s E とのヘテロ二量体であり、前記残基 2 6 2 C 及び 2 6 5 C が、スルフヒドリル反応性架橋剤によって一緒に結合している、二量体、

f f) 突然変異体 s E のホモ二量体またはヘテロ二量体であり、s E の前記アミノ酸残基 1 ~ 9、2 5 ~ 3 0、2 3 8 ~ 2 8 2、9 6 ~ 1 1 1 3 1 1 ~ 3 1 8 のうちの少なくとも1つが、システインに突然変異し（置換され）、s E の前記アミノ酸残基 1 ~ 9、2 5 ~ 3 0、2 3 8 ~ 2 8 2、9 6 ~ 1 1 1 3 1 1 ~ 3 1 8 のうちの少なくとも1つが、システインに突然変異し（置換され）、前記突然変異したシステイン残基が、スルフヒドリル反応性架橋剤によって一緒に結合している、二量体、

g g) 改変糖類を介して前記2つの単量体に結合することによって共有結合的に安定化される、二量体。

h h) 突然変異体 s E のホモ二量体またはヘテロ二量体であり、

- 一方の s E 単量体が、グリコシル化部位を導入する少なくとも1つの突然変異を有し、前記突然変異したアミノ酸残基が、X官能基を担持する改変糖でグリコシル化され、もう一方の s E 単量体が、グリコシル化部位を導入する少なくとも1つの突然変異を有し、前記突然変異したアミノ酸残基が、Y官能基を担持する改変糖でグリコシル化され、両方の突然変異した残基が、具体的にはクリック化学によって、第1の s E 単量体の前記糖の前記 X 官能基をもう一方の s E 単量体の前記糖の前記 Y 官能基と反応させることによって、前記改変糖類を介して一緒に結合している、二量体、

r) 前記二量体界面で前記二量体の空洞を充填させることによって、1つまたは前記2つの単量体、好ましくは前記2つの単量体の前記アミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸を、かさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって非共有結合的に安定化される、二量体、

s) 前記二量体界面でまたは各単量体のドメイン1 (D 1) / ドメイン3 (D 3) リンカーにおいて、空洞を形成する領域内で、少なくとも1つの s E 単量体の前記アミノ酸配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基を、少なくとも1つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって非共有結合的に安定化される。かかる置換が、前記2つの s E 単量体間での疎水性相互作用を増加させることができる、二量体、

t) 上に定義される2つの組換え s E のホモ二量体またはヘテロ二量体、好ましくはホモ二量体であり、前記組換え s E のうちの1つまたは前記2つの組換え s E が、H 2 7 F、H 2 7 W、H 2 4 4 F、H 2 4 4 W、及び L 2 7 8 F からなる群から選択される少なくとも1つの突然変異（置換）を有する、二量体、

10

20

30

40

50

u) 各単量体のドメイン1 (D1) /ドメイン3 (D3) リンカーにおいて、1つまたは前記2つの、好ましくは前記2つの単量体の前記アミノ酸配列中のアミノ酸を、少なくとも1つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって非共有結合的に安定化される、二量体、

v) 上に定義される2つの組換えsEのホモ二量体またはヘテロ二量体、好ましくはホモ二量体であり、前記組換えsEのうちの1つまたは前記2つの組換えsEが、L292F及びL294Nからなる群から選択される少なくとも1つの突然変異(置換)を有する、二量体、のうちの任意の1つ以上である、任意の請求項84に記載の化合物。

【請求項86】

前記EDEが、前記DENV-1またはDENV-2
ポリペプチド配列の位置E49、K64、Q77、W101、V122、N134、N153、T155、I161、A162、P169、T200、K202、E203、L308、K310、Q323、W391、F392のうちの1つ以上、またはデング熱ウイルスエンベロープタンパク質の等価残基、
及び/あるいは

前記DENV-2もしくはDENV-4ポリペプチド配列の位置A71、C105、C74、D154、D249、D271、D309、D362、D98、E148、E311、E44、E71、E84、G102、G104、G106、G152、G156、G28、G29、G374、H158、H27、I113、I308、I46、K246、K247、K310、K323、K325、K47、L113、L45、L82、M278、N103、N153、N362、N67、N83、Q248、Q271、Q325、Q77、R2、R247、R323、R73、R99、S72、S81、T115、T155、T361、T46、T68、T69、T70、T72、V113、V114、V250、V309、V324、V97、W101のうちの1つ以上、

またはデング熱ウイルスエンベロープタンパク質の等価残基、を含み、

任意に、N153及び/またはN67が、グリコシル化され、

任意に、前記EDEが、位置W101及び少なくとも1つの他の位置を含む、請求項77~85のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項87】

前記特定残基が、エンベロープタンパク質の天然二量体における前記残基と実質的に同様の空間的配置にある、請求項77~86のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項88】

前記EDEが、ドメインII側上のbストランド、及び(前記二量体界面の向かいにある)ドメインI側上の「150ループ」によって形成されたくぼみの中心に置かれた領域を含み、前記150ループが残基148~159に広がり、ドメインIのbストランドE0及びF0を接続し、前記N153グリカンを担当し、前記二量体において前記パートナーサブユニットの融合ループを覆い、任意に、前記領域が、前記bストランド(前記N67グリカンを担当する残基67~74)、すぐ上流の前記融合ループ及び残基(残基97~106)、ならびに前記参照サブユニットの前記ijループ(残基246~249)を含み、前記参照サブユニットが前記融合ループに貢献する前記サブユニットであり、

任意に、前記EDEが、前記第2のサブユニットの前記150ループ及び前記N153グリカン鎖をさらに含み、

任意に、一方または両方の領域が、前記天然領域と実質的に同様の空間的配置にある、請求項77~87のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項89】

前記EDEが、ビリオンまたはサブウイルス粒子またはウイルス様粒子の一部として提示される、請求項77~88のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項90】

前記EDEが、一旦、対象、好ましくはヒトに投与されると、抗体を作り出すことができ、前記抗体が、1種を超える血清型のデング熱ウイルスに結合することができ、任意に

10

20

30

40

50

、4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスに結合することができ、1種を超える血清型の Dengue 熱ウイルスを中和することができ、任意に、4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを中和することができ、

かつ前記抗体が、任意に、4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを100%中和することができ、任意に、ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られるウイルスを中和することができ、好ましくは、ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られる4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを100%中和することができる、請求項77～89のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項91】

前記EDEが安定化されるか、または前記二量体配置において、任意に、前記二量体の内向き面に結合するか、または前記二量体と関連するタグに結合する抗体によってさらに安定化される、請求項77～90のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項92】

前記EDEが、単一ポリペプチドとして表され、任意に、前記2つのエンベロープ単量体が、リンカーによって分離され、任意に、前記リンカーが、グリシン及び/またはセリンリッチである、請求項77～91のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項93】

前記EDEが、1種以上の血清型の前記 Dengue 熱ウイルスの、前記エンベロープタンパク質の前記二量体界面で四次構造依存性エピトープを含む、請求項77～92のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項94】

前記化合物が、前記エンベロープタンパク質の二量体の前記N67グリカン鎖、または前記Eタンパク質の二量体の前記N153グリカン鎖のいずれか、または前記エンベロープタンパク質の二量体の前記N67グリカン鎖及び前記N153グリカン鎖の両方を接触させる、請求項77～93のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項95】

前記化合物が抗体である場合、前記CDRH2が前記N67グリカン鎖と相互作用する、請求項77～94のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項96】

前記EDEが、前記ドメインIIIの残基K310を含む、請求項77～95のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項97】

前記化合物が、前記融合ループにのみ結合しない、請求項77～96のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項98】

前記EDEが、ピリオンまたはサブウイルス粒子またはウイルス様粒子の一部として提示される、請求項77～97のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項99】

前記化合物が、変性型である場合、前記エンベロープタンパク質に結合しない、請求項77～98のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項100】

前記化合物が、

a) フリン活性を欠いている細胞中で作製される、及び/または

b) 低pHで、Dengue 熱ウイルスに結合しない、請求項77～99のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項101】

前記化合物が抗体である場合、任意に、前記抗体が、重鎖配列番号1及び軽鎖配列番号37、重鎖配列番号2及び軽鎖配列番号38、重鎖配列番号3及び軽鎖配列番号39、または重鎖配列番号4及び軽鎖配列番号40のうちの任意の1つのタンパク質配列、または重鎖配列番号1及び軽鎖配列番号37、重鎖配列番号2及び軽鎖配列番号38、重鎖配列

50

番号 3 及び軽鎖配列番号 39、または重鎖配列番号 4 及び軽鎖配列番号 40 に対して少なくとも 90% の相同性を有する配列を含む、請求項 77 ~ 100 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 102】

存在する場合、以下の残基が、

配列番号 1 - 52 T、54 E、56 D、57 S、58 A、65 K、66 G、69 T、82 E、84 N、85 S、100 Y、102 N、103 F、104 Y、105 Y 106 Y

、
配列番号 2 - 54 G、55 N、57 N、59 K、62 Q、65 Q、66 G、94 R、98 R、99 F、100 Y、101 Y、102 D、103 S、104 T、106 Y、107 Y、108 P、109 D、110 S、117 D、118 V、

配列番号 3 - 2 V、28 S、31 N、54 D、56 S、57 T、58 R、65 K、66 G、94 R、98 R、99 F、100 Y、101 Y、102 D、103 S、104 T、106 Y、107 Y、108 P、109 D、110 S、117 D、118 V、

配列番号 4 - 2 V、28 T、31 S、54 D、56 S、57 S、58 T、66 G、68 F、69 M、94 R、98 R、99 Y、100 Y、101 Y、102 D、103 S、104 T、106 Y、107 Y、108 P、109 D、110 N、117 D、118 V、

配列番号 37 - 30 S、31 T、32 F、49 Y、50 D、52 S、54 R、66 R、91 R、92 Y、93 N、94 W、

配列番号 38 - 26 S、27 S、30 G、31 G、32 F、33 N、34 Y、52 D、54 T、55 S、56 R、62 S、95 S、96 R、97 G、

配列番号 39 - 51 Y、56 R、57 P、58 S、59 G、96 S、97 R、

配列番号 40 - 51 Y、56 R、57 P、58 S、97 K である、請求項 101 に記載の化合物。

【請求項 103】

前記化合物が、タンパク質、任意に、抗体またはその抗原結合部分であり、前記抗体またはその抗原結合部分が、以下のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上、または 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換、挿入、もしくは欠失を有する、

配列番号 5 もしくは配列番号 8 もしくは配列番号 11 もしくは配列番号 14

及び / または

配列番号 6 もしくは配列番号 9 もしくは配列番号 12 もしくは配列番号 15

及び / または

配列番号 7 もしくは配列番号 10 もしくは配列番号 13 もしくは配列番号 16

及び / または

配列番号 17 もしくは配列番号 20 もしくは配列番号 23 もしくは配列番号 26

及び / または

配列番号 18 もしくは配列番号 21 もしくは配列番号 24 もしくは配列番号 27

及び / または

配列番号 19 もしくは配列番号 22 もしくは配列番号 25 もしくは配列番号 28、のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上を含む、請求項 77 ~ 102 のいずれか一項に記載の化合物

【請求項 104】

前記化合物が、タンパク質、任意に、抗体またはその抗原結合部分であり、前記重鎖の前記 CDR 領域が、以下の酸配列、または 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換、挿入、もしくは欠失を有する、

配列番号 5 及び配列番号 6 及び配列番号 7

または

配列番号 8 もしくは配列番号 9 もしくは配列番号 10

または

配列番号 11 もしくは配列番号 12 もしくは配列番号 13

または

配列番号 14 もしくは配列番号 15 もしくは配列番号 16 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上を含む、請求項 77 ~ 103 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 105】

前記化合物が、タンパク質、任意に、抗体またはその抗原結合部分であり、前記軽鎖の前記 CDR 領域が、以下の配列、または 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換、挿入、もしくは欠失を有する、

配列番号 17 及び配列番号 18 及び配列番号 19

または

配列番号 20 もしくは配列番号 21 もしくは配列番号 22

10

または

配列番号 23 もしくは配列番号 24 もしくは配列番号 25

または

配列番号 26 もしくは配列番号 27 もしくは配列番号 28 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上を含む、請求項 77 ~ 103 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 106】

以下の残基が、存在する場合、

配列番号 6 の残基 3 が T であり、残基 5 が E であり、残基 7 が D であり、残基 8 が S であり、残基 9 が A であり、残基 16 が K であり、残基 17 が G であり、

配列番号 7 の残基 2 が Y であり、残基 4 が N であり、残基 5 が F であり、残基 6 が Y であり、残基 7 が Y であり、残基 8 が Y であり、

20

配列番号 9 の残基 5 が G であり、残基 6 が N であり、残基 10 が K であり、残基 13 が Q であり、残基 16 が Q であり、残基 17 が D であり、

配列番号 10 の残基 5 が D であり、残基 6 が Y であり、残基 8 が D であり、残基 10 が W であり、残基 11 が F であり、残基 12 が P であり、残基 14 が L であり、

配列番号 11 の残基 1 が N であり、

配列番号 12 の残基 5 が D であり、残基 7 が S であり、残基 8 が T であり、残基 9 が R であり、残基 16 が K であり、残基 17 が G であり、

配列番号 13 の残基 4 が R であり、残基 5 が F であり、残基 6 が Y であり、残基 7 が Y であり、残基 8 が D であり、残基 9 が S であり、残基 10 が T であり、残基 12 が Y であり、残基 13 が Y であり、残基 14 が P であり、残基 15 が D であり、残基 16 が S であり、

30

配列番号 14 の残基 1 が S であり、

配列番号 15 の残基 5 が D であり、残基 7 が S であり、残基 8 が S であり、残基 9 が T であり、残基 17 が G であり、

配列番号 16 の残基 4 が R であり、残基 5 が Y であり、残基 6 が Y であり、残基 7 が Y であり、残基 8 が D であり、残基 9 が S であり、残基 10 が T であり、残基 12 が Y であり、残基 13 が Y であり、残基 14 が P であり、残基 15 が D であり、残基 16 が N であり、

配列番号 17 の残基 7 が S であり、残基 8 が T であり、残基 9 が F であり、

40

配列番号 18 の残基 1 が D であり、残基 3 が S であり、残基 5 が R であり、

配列番号 19 の残基 3 が R であり、残基 4 が Y であり、残基 5 が N であり、

配列番号 20 の残基 4 が S であり、残基 5 が S であり、残基 8 が G であり、残基 9 が G であり、残基 10 が F であり、残基 11 が N であり、残基 12 が Y であり、

配列番号 21 の残基 1 が D であり、残基 3 が T であり、残基 4 が S であり、残基 5 が R であり、

配列番号 22 の残基 5 が S であり、残基 6 が R であり、残基 7 が G であり、

配列番号 24 の残基 5 が R であり、残基 6 が P であり、残基 7 が S であり、

配列番号 25 の残基 6 が S であり、残基 7 が R であり、

配列番号 27 の残基 5 が R であり、残基 6 が P であり、残基 7 が S である、請求項 10

50

3 ~ 104 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項107】

前記化合物が、さらなる治療剤またはレポーター部分に接合される、請求項77 ~ 106 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項108】

前記化合物が、1種以上の血清型の Dengue 熱ウイルスを中和する、任意に、1種以上の血清型の Dengue 熱ウイルスを80%または90%または98%または100%中和する、請求項77 ~ 107 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項109】

前記化合物が、すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを中和する、任意に、1種以上の血清型の Dengue 熱ウイルスを80%または90%または98%または100%中和する、任意に、すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを80%または90%または98%または100%中和する、任意に、すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを同じ濃度の化合物で100%中和する、請求項77 ~ 108 のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項110】

前記化合物が、1種以上の血清型の Dengue 熱ウイルスを0.5 μg/ml の IC50 濃度で中和する、任意に、1種以上の血清型の Dengue 熱ウイルスを0.5 μg/ml の IC50 で80%または90%または100%中和する、請求項77 ~ 109 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項111】

前記化合物が、すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを0.5 μg/ml の IC50 濃度で中和する、任意に、すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを80%または90%または98%または100%中和する、請求項77 ~ 110 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項112】

前記化合物がタンパク質、任意に抗体またはその抗原結合部分である場合、前記抗原結合部分が Fv 断片、Fab 様断片（例えば、Fab 断片、Fab' 断片、もしくは F(ab)₂ 断片）、またはドメイン抗体である、請求項77 ~ 111 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項113】

前記化合物が、C6/36 昆虫細胞またはヒト樹状細胞中で作製された Dengue 熱ウイルスを中和する、請求項77 ~ 112 のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項114】

前記化合物が、C6/36 昆虫細胞及びヒト樹状細胞中で作製されたウイルスを同じレベルまで中和する、任意に、前記抗体またはその抗原結合部分が、C6/36 昆虫細胞及びヒト樹状細胞中で作製された Dengue 熱ウイルスを完全に中和する、請求項77 ~ 113 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項115】

前記化合物がモノクローナル抗体である、請求項77 ~ 114 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項116】

前記化合物がポリクローナル抗体またはその抗原結合部分である、請求項77 ~ 114 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項117】

前記化合物が、混合物または抗体、任意に、
 a) モノクローナル抗体もしくはその抗原結合部分の混合物、または
 b) ポリクローナル抗体もしくはその抗原結合部分の混合物、または
 c) 混合物、またはモノクローナル及びポリクローナル抗体もしくはその抗原結合部分、を含む組成物の一部である、請求項77 ~ 114 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項118】

前記化合物が、組換え抗体である、請求項77 ~ 117 のいずれか一項に記載の化合物

50

。

【請求項 1 1 9】

前記化合物が、さらなる薬剤に接合され、任意に、前記さらなる薬剤が治療剤、任意に抗ウイルス剤であるか、または前記さらなる薬剤が安定化剤、任意に、PEGである、請求項 7 7 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 2 0】

前記化合物が、組成物、任意に薬学的組成物の一部であり、任意に、前記組成物が、1種以上のさらなる治療剤、任意に、Fc受容体結合を防ぐ薬剤をさらに含む、請求項 7 7 ~ 1 1 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 2 1】

前記抗体またはその断片または前記化合物が薬学的組成物の一部である、請求項 6 0 ~ 7 3 のいずれかに記載の抗体もしくはその断片、または請求項 7 7 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項 1 2 2】

請求項 6 0 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 7 7 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載の化合物。及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 1 2 3】

前記化合物が、

- a) ヒト細胞株、任意にCHO細胞、または
- b) 哺乳動物、任意にヒト、または
- c) 微生物、または

20

d) 昆虫細胞株から単離または精製される、請求項 6 0 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 7 7 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 2 4】

請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のEDEを含む抗原に应答して対象において作製された抗体またはその断片の特徴付けを含む、デング熱ウイルスの予防または治療で用いるための適当な抗体またはその断片を選択する方法。

【請求項 1 2 5】

前記抗体が、1種以上の血清型のデング熱ウイルス、任意に3種血清型、任意に4種血清型の請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のEDEに結合するかどうかを判定するステップをさらに含む、請求項 1 2 4 に記載の方法。

30

【請求項 1 2 6】

前記抗体が、1種以上の血清型のデング熱ウイルス、任意に2種以上の血清型のデング熱ウイルス、任意に3種血清型、任意に4種血清型からの前記デング熱ウイルスを中和するかどうかを判定するステップをさらに含む、請求項 1 2 4 または 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記抗体が、昆虫細胞、任意にC6/36細胞中で作製されたデング熱ウイルス、及び初代ヒト細胞、任意にCHO細胞中で作製されたデング熱ウイルスを中和するかどうかを判定するステップをさらに含む、請求項 1 2 6 に記載の方法。

40

【請求項 1 2 8】

デング熱ウイルスの予防または治療で用いるための抗体を選択する方法であって、デング熱ウイルスまたは請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のEDEに曝露される対象からの、その変性型で前記エンベロープタンパク質に結合することができない抗体を特定することを含む、方法。

【請求項 1 2 9】

核酸であって、

- a) 請求項 6 0 ~ 7 3 のいずれかに記載の抗体もしくはその断片、またはタンパク質である場合、請求項 7 7 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の化合物、あるいは
- b) 請求項 1 2 4 ~ 1 2 7 のいずれか一項に記載の方法によって特定される抗体、をコ

50

ードし、

任意にイントロンを有さない、核酸。

【請求項 130】

請求項 129 に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 131】

請求項 129 に記載の核酸または請求項 130 に記載のベクターを含み、任意に、C6 / 36 昆虫細胞、ヒト樹状細胞、CHO 細胞、またはピキア・パストリス細胞である、宿主細胞。

【請求項 132】

請求項 129 に記載の核酸、または請求項 130 に記載のベクター、または請求項 131 に記載の宿主細胞によって形質転換される少なくとも一つの細胞を含む、非ヒトトランスジェニック動物。

10

【請求項 133】

a) 請求項 60 ~ 73 のいずれかに記載の抗体もしくはその断片、またはタンパク質である場合、請求項 77 ~ 121 のいずれか一項に記載の化合物、あるいは

b) 請求項 124 ~ 127 のいずれか一項に記載の方法によって特定される抗体、の産生のためのプロセスであって、

以下の段階：

I . 請求項 131 に記載の細胞の適切な培地中の培養

II . 産生された前記抗体または抗原結合部分の回収、を含み、前記回収が前記培養培地または前記培養細胞のいずれかからである、プロセス。

20

【請求項 134】

請求項 60 ~ 73 のいずれかに記載の抗体もしくはその断片、またはタンパク質である場合、請求項 77 ~ 121 のいずれか一項に記載の化合物、あるいは請求項 124 ~ 127 のいずれか一項に記載の方法によって特定される抗体、の産生のためのプロセスであって、以下の段階：

a . 請求項 1 ~ 30 のいずれかに記載の EDE の対象への投与、

b . 前記タンパク質または前記対象の血液からの抗体の回収及び単離、を含む、プロセス。

30

【請求項 135】

薬剤として用いるための、好ましくはデング熱ウイルス感染を予防及び / または治療するための、請求項 60 ~ 73 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 77 ~ 121 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 122 に記載の薬学的組成物。

【請求項 136】

請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の EDE、請求項 60 ~ 73 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 77 ~ 121 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の EDE を含む、またはそれらからなる、診断薬剤。

【請求項 137】

対象におけるデング熱ウイルス感染を診断または観察するためのキットであって、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の EDE、または請求項 60 ~ 73 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 77 ~ 121 のいずれか一項に記載の化合物、及び適切な診断試薬を含む、キット。

40

【請求項 138】

対象におけるデング熱ウイルス感染を診断または観察するための、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の EDE、請求項 60 ~ 73 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 77 ~ 121 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 134 に記載の診断薬剤の使用。

【請求項 139】

50

対象におけるデング熱ウイルス感染を診断するためのインビトロ方法であって、

a) 前記対象からの適切な生体試料を、請求項 60 ~ 73 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 77 ~ 121 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 136 に記載の抗体もしくはその断片を含むまたはそれからなる診断薬剤とインビトロで接触させるステップと、

b) 前記生体試料中のデング熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の存在または不在を判定するステップと、を含み、

前記デング熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の存在は、前記対象がデング熱ウイルス感染を有することを示す、方法。

【請求項 140】

10

対象におけるデング熱ウイルス感染を診断するためのインビトロ方法であって、

a) 前記対象からの適切な生体試料を、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の E D E とインビトロで接触させるステップと、

b) 前記生体試料中の前記二量体を対象とする抗体の存在または不在を判定するステップと、を含み、

前記抗体の存在は、前記対象がデング熱ウイルス感染を有することを示す、方法。

【請求項 141】

対象におけるデング熱ウイルス感染の進行または回帰を観察するためのインビトロ方法であって、

a) 前記対象からの適切な生体試料を、請求項 60 ~ 73 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 77 ~ 121 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 136 に記載の抗体を含むまたはそれからなる診断薬剤とインビトロで接触させるステップと、

20

b) 前記生体試料中のデング熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の量を判定するステップと、

c) ステップ (b) において判定された量を、前記対象において以前に得られたデング熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の量と比較するステップと、を含み、

デング熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の量の有意な増加が前記デング熱ウイルス感染の進行のマーカーを構成し、デング熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の有意な減少が前記デング熱ウイルス感染の回帰のマーカーを構成する、方法。

30

【請求項 142】

対象におけるデング熱の時間発展を予測するためのインビトロ方法であって、

a) 前記対象からの適切な生体試料を、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の E D E とインビトロで接触させるステップと、

b) 前記生体試料中の前記二量体を対象とする抗体を中和する量を判定するステップと、

c) ステップ (b) において判定された量を、前記対象において以前に得られた前記二量体を対象とする抗体を中和する量と比較するステップと、を含み、

前記二量体を対象とする抗体を中和する量の有意な増加が前記疾患の時間発展の好ましい予後のマーカーを構成する、方法。

40

【請求項 143】

デング熱ウイルスの予防注射を受けた対象におけるデング熱ウイルス感染のワクチン接種プロトコルの成功を観察するためのインビトロ方法であって、

a) 前記対象からの適切な生体試料を、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の E D E とインビトロで接触させるステップと、

b) 前記生体試料中の前記二量体を対象とする抗体を中和する量を判定するステップと、

c) ステップ (b) において判定された量を、前記対象において以前に得られた前記二量体を対象とする抗体の量と比較するステップと、を含み、

前記二量体を対象とする抗体を中和する量の有意な増加が前記ワクチン接種プロトコ

50

ルの成功のマーカ-を構成する、方法。

【請求項 1 4 4】

対象における Dengue 熱ウイルス感染を治療または予防する方法であって、請求項 6 0 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の抗体もしくはその断片、または請求項 7 7 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の化合物、または請求項 1 2 4 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法によって特定される抗体もしくはその抗原結合部分、または請求項 1 3 3 または 1 3 4 に記載のプロセスによって作製された抗体、または請求項 1 2 9 に記載の核酸もしくは請求項 1 3 0 に記載のベクターを、前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 1 4 5】

Dengue 熱ウイルス感染の予防または治療で用いるための、請求項 6 0 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 7 7 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 1 2 4 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法によって特定される抗体もしくはその抗原結合部分、または請求項 1 3 3 または 1 3 4 に記載のプロセスによって作製された抗体、または請求項 1 2 9 に記載の核酸もしくは請求項 1 3 0 に記載のベクター。

10

【請求項 1 4 6】

生 Dengue 熱ワクチン試験で用いるための、請求項 6 0 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 7 7 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 1 2 4 ~ 1 2 7 のいずれか一項に記載の方法によって特定される抗体もしくはその抗原結合部分、または請求項 1 3 3 または 1 3 4 に記載のプロセスによって作製された抗体、または請求項 1 2 9 に記載の核酸もしくは請求項 1 3 0 に記載のベクター。

20

【請求項 1 4 7】

Dengue 熱ウイルス感染の治療または予防で用いるための、請求項 6 0 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 7 7 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 1 2 4 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法によって特定される抗体もしくはその抗原結合部分、または請求項 1 3 3 または 1 3 4 に記載のプロセスによって作製された抗体、または請求項 1 2 9 に記載の核酸もしくは請求項 1 3 0 に記載のベクターを含む、組成物。

【請求項 1 4 8】

1 つ以上の薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項 1 4 7 に記載の組成物。

30

【請求項 1 4 9】

1 つ以上の治療剤、任意に 1 つ以上の T 細胞ワクチン、任意にさらなる抗ウイルス剤をさらに含む、請求項 1 4 7 または 1 4 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5 0】

請求項 6 0 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 7 7 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 1 2 4 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法によって特定される抗体もしくはその抗原結合部分、または請求項 1 3 3 または 1 3 4 に記載のプロセスによって作製された抗体、または請求項 1 2 9 に記載の核酸もしくは請求項 1 3 0 に記載のベクターを含む組成物、または請求項 1 4 7 ~ 1 4 8 に記載の組成物で治療、またはその用量の増加を必要とする可能性がある Dengue 熱ウイルス感染を患っている患者を特定するための方法であって、前記対象における抗 E D E 抗体及び抗融合ル-プ抗体のレベルの決定を含み、前記 E D E が請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載される通りである、方法。

40

【請求項 1 5 1】

前記対象が主に抗融合ル-プ抗体を有する場合、前記対象が前記抗体または組成物で治療、任意に高用量でそれを必要とする、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記対象が抗 E D E 抗体がないかまたは特に低レベルの抗 E D E 抗体を有する場合、前記対象が高用量の前記抗体または組成物を必要としていると見なされる、請求項 1 5 0 または 1 5 1 の任意の一項以上に記載の方法。

50

【請求項 153】

請求項 60～73 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 77～121 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 124～128 のいずれか一項に記載の方法によって特定される抗体もしくはその抗原結合部分、または請求項 133 または 134 に記載のプロセスによって作製された抗体、または請求項 129 に記載の核酸もしくは請求項 130 に記載のベクターを含む、組成物、または請求項 147～148 に記載の組成物、を高用量必要とする患者を特定するための手段を含む部品のキットであって、任意に、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の EDE を含み、任意に、マイクロタイタープレート、任意に ELISA 試験を実行するための試薬、任意に棒上の比色試験をさらに含む、キット。

10

【請求項 154】

請求項 41 に記載の予防接種、または請求項 43～47 または 58～59 に記載のワクチン接種を必要とする患者を特定するための手段を含む部品のキットであって、任意に、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の EDE を含み、任意に、マイクロタイタープレート、任意に ELISA 試験を実行するための試薬、任意に棒上の比色試験を含む、キット。

【請求項 155】

請求項 60～73 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、または請求項 77～121 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 124～128 のいずれか一項に記載の方法によって特定される抗体もしくはその抗原結合部分、または請求項 133 または 134 に記載のプロセスによって作製された抗体、または請求項 129 に記載の核酸もしくは請求項 130 に記載のベクター、または請求項 147～148 に記載の組成物のうちの任意の 1 つ以上を含み、さらなる治療剤をさらに含む、部品のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、デング熱ウイルス感染の治療及び予防の分野ならびに関連化合物及び方法に関する。

【発明の概要】

【0002】

デング熱は、毎年ほぼ 4 億人に感染し¹、軽度の疾患（デング熱の発熱）からデング出血熱等の重症例に及ぶ 25% の感染における症状を有する。病原因子は、フラビウイルス属からの 4 つの血清学的に関連したウイルスであり²、これらはデング熱ウイルス血清型 1～4（DENV 1～4）と称される。1 種の血清型による感染は、その血清型に対しては生涯にわたる保護をもたらすが、その他の血清型に対しては生涯にわたる保護をもたらさない。重症疾患は第 1 のまたは一次 DENV 感染中よりも二次感染中に生じる可能性が高いという疫学的証拠がある^{3、4}。二次感染時の疾患の高まり及び 4 種の種々の血清型に対する保護の必要性は、毎年生じると推定される 4 億の感染を防ぐことが緊急に必要とされるワクチンに対して高い基準を設けている^{1、5、6}。

30

【0003】

ウイルス中和抗体及び DENV エンベロープを作り出すことを目的とする開発におけるほとんどの DENV ワクチンは、この労力が主な焦点であり^{8、9}、このエンベロープタンパク質は、受容体結合、その後の受容体媒介性エンドサイトーシスに参与する。エンドソームの酸性環境において、エンベロープタンパク質は、ウイルスエンベロープとエンドソーム膜の間の膜融合反応を触媒し、それによって、ウイルスゲノム RNA を細胞質に放出する。エンベロープタンパク質は、約 500 のアミノ酸長であり、大型の N 末端外部ドメイン及び C 末端で 2 つの膜貫通（TM）らせんを有する。その全体構造は、すべてのフラビウイルスの中で保存され、デング熱群内の最も遠いウイルス間で約 65% のアミノ酸配列同一性を有し、これらのすべては、位置 N 67 及び N 153 で 2 つの保存 N 結合型グリコシル化部位を示す。エンベロープタンパク質（「可溶性 E」については「sE」と称

40

50

される)の外部ドメインの400のアミノ末端残基はクラスIIのウイルス融合タンパク質に特有である。シートリッチな3つのドメイン構造に折り畳み、成熟ピリオン^{8、9}の表面をコーティングするヘッドトウテールホモ二量体^{5~7}を形成する。

【0004】

デング熱ウイルスの血清型2、3、及び4からのエンベローブ糖タンパク質外部ドメインの結晶構造は、デング熱ウイルスの血清型2については受入番号1OAN、1OK8、デング熱ウイルスの血清型3については1UZG、及びデング熱ウイルスの血清型4については3UAJの下で、PDB(タンパク質データバンク)のデータベースで入手可能である。

【0005】

しかしながら、DENV粒子の抗体認識は、ウイルスライフサイクルの異なる段階で示されるウイルスカプシドの多くの著しく異なる組成及び立体構造によって複雑化される^{11、12}。「未成熟」ウイルス粒子は、エンベローブ及びピリオンが1:1の会合で前駆膜タンパク質(prM)の完全相補体を有し、特徴的ながった外観を採用し、それぞれのがった部分はprM/Eタンパク質の三量体で構成されている^{11~15}。

【0006】

フリソ媒介性prM切断後、「成熟」ウイルス粒子は、対称の2、3、及び5倍軸の周りに配置されたエンベローブタンパク質の90個近くパックされた二量体を有する平滑な外見を採用し、エンベローブタンパク質二量体が互いに対して再配置する、34を超えろ温度まで曝露時に「凹凸な」形態へのこれらの成熟粒子の拡大はまた、近年記載されている^{16、17}。早期エンドソームへの内面化後、酸性環境は、エンベローブタンパク質の主要な立体構造変化のきっかけとなり、これは、融合ループを曝露し、次いで、膜融合を誘発するように不可逆的に三量化する^{18、19}。

【0007】

重要かつさらなるレベルの複雑性は、prM切断がしばしば不完全であることであり、これにより切断の度合いを変化させながら、ウイルスの集団をもたらす^{15、20}。高レベルのprMを含むウイルスは、感染ではないが、一方、低レベルのprMを有するウイルスは、依然として感染性であり、さらに、高いprMの非感染粒子が抗体依存性増強による感染に追い込まれ得ることを示した^{21、22}。

【0008】

エピトープは、最もヒト中和抗体の標的物であるかについては、これまでのところ明らかではなく、例えば、deAlwis²⁷は、エピトープが形成のためにウイルスの組み立てを必要とすることを示唆しているが、一方、Rey⁸¹は、エンベローブ二量体自体が標的物であると示唆している。

【0009】

DENV感染の抗体依存性(ADE)の抗体依存性増強は、二次感染時に、疾患の重症度を増加することを前提とする機序のうちの1つである²³。一次感染に形成された抗体は、ウイルスを最適化するが、完全に中和せず、二次感染においてより高いウイルス負荷を推進する骨髄性細胞へのFc受容体媒介性取り込みを促進することが提案されている。ADEは、ほぼすべての抗体の二次中和濃度で見られ得、その認識されるリスクは、DENVにおけるワクチン戦略を企図している。

【0010】

臨床試験において現在試験されている主要なデング熱ワクチン候補は、弱毒生デング熱またはデング熱/黄色病キメラウイルスの四価製剤からなる^{24、25}。許容されない反応原性のないバランスのとれた四価免疫力作り出すことは、困難であることが確認されている。最も進歩したワクチン候補は、最近の第II相臨床試験⁴において予想されたものよりもはるかに低いワクチンの有効性を示し、DENV-2から保護しなかったが、一方、第III相試験において、このワクチンは疾患の発生率を56%低減し(<http://sanofi-pasteur.com/en/articles/the-world-s-first-large-scale-dengue-vaccine-effi>

10

20

30

40

50

cacy-study-successfully-achieved-its-primary-clinical-endpoint.aspx)、Capeding et al (2014) Lancet Published online July 11, 2014 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61060-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61060-6)では、疾患に曝露された集団のほぼ半分にした。このずれは、天然デング熱感染におけるヒト抗体反応及びワクチン接種後を理解する、具体的には、ヒトにおいて発生した最も強力な交差反応性のある抗体によって認識されるエピトープを特定し、疾患からの保護との相関関係を理解する差し迫った必要性を生じる。したがって、ヒトにおいて発生した最も強力な交差反応性のある抗体によって認識されるエピトープを含むデング熱ワクチンを提供することは極めて重要である。

10

【0011】

近年の証拠は、ヒトにおけるデング熱ウイルス(DENV)に特異的な血清Ab反応が、交差反応性のある中和不良のAbの大部分とほんのわずかの血清型に特異的な強力な阻害抗体とからなることを示し²⁷、これらは、エンベロープタンパク質がウイルス粒子上に組み立てられる場合にのみ発現する複合の四級構造エピトープに結合し、有効な免疫反応を刺激するために、無傷ウイルス粒子が必要とされることを意味する。

【0012】

この近年の証拠とは対照的に、本発明の発明者らは、驚くべきことに、強力に中和する交差反応性のある抗体であることが見出されたデング熱ウイルスに感染した患者の分類した単一形質芽球から再配置された重鎖及び軽鎖遺伝子を単離することによって得られたヒト抗体を特定し、特徴付けた。さらに、これらの抗体が結合するエピトープが、エンベロープタンパク質二量体に限定され、完全なウイルスの組み立てを必要しなかったことを見出した。したがって、安定化可溶性タンパク質E二量体を含むサブユニットワクチンは、感染性ビリオンの表面で通常接近することができない不良な免疫原性領域に対して誘発する抗体を避ける、成功したデング熱ワクチンにおける良好な候補である。

20

【0013】

以下に記載の本発明は、新たに特定された抗体及び抗原に関して、化合物、組成物、方法、使用、及びワクチンを提供する。

【0014】

本発明者らは、デング熱感染に罹患している患者から145のヒトモノクローナル抗体を特徴付けた。急性ヒト抗体反応は、2つの主要なエピトープに焦点を置かれることが見出され、これらの1つは融合ループにおいて十分に記載されており、第2の新規のエピトープは無傷ビリオンまたはエンベロープタンパク質の二量体に見出されており、これらはドメインI、II、及びIIIの領域に包含する。このエピトープ、エンベロープ二量体エピトープ、またはEDEと反応する抗体は、低いピコモル範囲において無傷ヒト細胞及び一次ヒト細胞の両方で作られるウイルスを完全に中和することができることが見出された。この新規のエピトープは、デング熱ウイルスによって生じる疾患の治療及び予防について様々な意味合いを持つ。

30

【0015】

本発明は、本発明の異なる態様の様々な実施形態に関して以下に記載されよう。明確にするために、個別の実施形態の文脈に記載される本発明のある特定の特性はまた、1つ以上の実施形態または単一の実施形態において組み合わせても提供されてもよいことが理解される。反対に、簡潔にするために、単一の実施形態の文脈に記載される本発明の様々な特性はまた、個別にまたは任意の適当なサブコンビネーションで提供されてもよい。これらの実施形態のすべての組み合わせは、あたかも各々及びすべての組み合わせが個別に及び明示的に開示されたかのように、本発明によって具体的に包含され、本明細書で開示されている。加えて、すべてのサブコンビネーションはまた、あたかも各々及びすべてのこのようなサブコンビネーションが個別に及び明示的に本明細書で開示されたかのように、本発明によって具体的に包含され、本明細書で開示されている。

40

【0016】

50

それ故に、本発明の第1の態様では、1種を超える血清型の Dengue 熱ウイルスの Dengue 熱ウイルスを中和する化合物が提供される。

【0017】

好ましくは、本化合物は、2種の血清型の Dengue 熱ウイルス、より好ましくは3種の Dengue 熱ウイルス、及び最も好ましくは4種の血清型の Dengue 熱ウイルスの Dengue 熱ウイルスを中和する、すなわち、すべての血清型の Dengue 熱ウイルスは、例えば、DENV-1、DENV-2、DENV-3、及びDENV-4を含む一覧表からの2種以上の血清型の Dengue 熱ウイルスを中和する。

【0018】

化合物とは、1種を超える血清型の Dengue 熱ウイルスを中和することができる任意の化合物を意味する。本化合物は、例えば、小分子、ポリペプチド、またはタンパク質（これらの用語は、本明細書で同義に使用される）であってもよく、これには、糖タンパク質、核酸、炭水化物、脂肪、原子、例えば、金属が含まれる。好ましい実施形態では、本化合物は、ポリペプチド、好ましくは抗体またはその抗原結合部分である。この抗原結合部分は、Fv断片、Fab断片（例えば、Fab断片、Fab'断片、F(ab)₂断片、Fv断片、もしくはscFv断片）、またはドメイン抗体であってもよい。この抗原結合部分は、無傷抗体に存在する線状アミノ酸配列に由来し得るか、または一連の非連続的なアミノ酸を含み得るか、または一連の非連続的なアミノ酸を含み、任意に他のアミノ酸と散在され得、例えば、エピトープとの接触に必要とされる特定のアミノ酸を含み得るが、例えば、場合によっては、例えば異種骨格タンパク質によって置き換えられ得る、天然抗体のフレームワークに必要とされるアミノ酸を含み得ない。本発明に従う抗体は、当業者に公知であろう、ヒト、サル、ウサギ、またはマウス等の哺乳動物に免疫性を与えるステップを含む方法によって、及び/または例えば、ファージディスプレイ選択ステップを含む、インビトロ方法によって得られる。

【0019】

抗体とは、実質的に無傷の抗体分子、ならびにキメラ抗体、ヒト化抗体（少なくとも1つのアミノ酸が非ヒト抗体に対して突然変異である、例えば、天然非ヒト抗体または非ヒト抗体配列から組み立てられた抗体）、一本鎖抗体、二重特異性抗体、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗体重鎖及び/または軽鎖のホモ二量体またはヘテロ二量体、ならびにその抗原結合部分及び誘導体の意味を含む。

【0020】

本化合物がタンパク質である場合には、例えば、抗体またはその断片がヒト対象に投与され、この抗体がヒト抗体またはその断片ではない場合、ヒトにおける免疫原性を低減させるためにヒト化され得る。ヒト化抗体またはその断片を産生するための方法は、当該技術分野で周知である（Vinciklerら、2009）。

【0021】

さらに、本発明に従う抗体またはその断片のバイオアベイラビリティは、中和抗体またはその断片をアルブミン（Coppier et al.ら、2006）または免疫グロブリン（Harmsenら、2005）等の不活性担体に接合することによって改善され得る。

【0022】

抗体という用語はまた、IgG、IgA、IgM、IgD、及びIgEを含む、すべてのクラスの抗体も含む。抗体という用語はまた、任意の定義された抗体及びその抗原結合部分の変異体、融合体、及び誘導体も含む。

【0023】

本化合物は、代替的には、例えば、MILLWARD STEVEN W ET AL : " Design of cyclic peptides that bind protein surfaces with antibody-like affinity ", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 2, no. 9, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 625-634, XP002616292, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHI

10

20

30

40

50

NGTON, DC, US ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/CB7001126、HEINIS CHRISTIAN ET AL: "Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides" NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 5, no. 7, July 2009 (2009-07), pages 502-507, XP007913181に記載されるように、環状ペプチド、例えば、多環状ペプチド、例えば、二環状ペプチドであり得る。例えば、第WO2009098450号も参照されたい。必要とされる結合特性を有する二環状ペプチドは、例えば、ファージ提示法によって選択され得る。

【0024】

中和するとは、今までに感染していない細胞を感染させるウイルスの能力を低減させることを意味する。

【0025】

当業者は、化合物の能力を中和するウイルスを観察するために適当な技術を十分承知しているであろう。かかる方法の一例は、実施例3に詳述されており、1種以上の血清型の Dengue 熱ウイルスが潜在性のある宿主細胞集団を感染させることができ、アッセイ下での化合物をウイルスと混合させ、次いで、混合物を潜在性のある宿主細胞でインキュベートする。化合物の中和能力、すなわち、感染を予防する化合物の能力の基準を得る、感染した細胞数がアッセイされる。ある特定の例では、化合物、例えば、抗体またはその抗原結合部分を中和する可能性は、感染した病巣の数の低減が対照（化合物なし）と比較する場合に、フォーカス低減中和試験（FRNT）を用いて判定され得る²²。簡潔に言えば、本化合物をウイルスと混合し、37℃で1時間インキュベートする。次いで、混合物をベロ細胞（アフリカミドリザルからの腎臓上皮細胞株）に移し、3日間インキュベートする。フォーカス形成アッセイは、抗 E mAb（4G2）を用いて行われ、続いて、HRP 共役されたウサギ抗マウス IgG を用いて行うことができる。この反応は、DAB 基質の添加によって可視化することができる。フォーカス低減の割合は、各化合物について計算される。50%のFRNT値は、SPSS パッケージからのプロビットプログラムを用いて、低減率対化合物の濃度のグラフから決定され得る。典型的には、このアッセイは、試験化合物の不在下で、例えば、コンフルエントな細胞、例えばちょうどコンフルエントな細胞を含む96ウェルプレートウェル中で約100の病巣が存在するように行われ得る。

【0026】

。例えばフォーカス低減中和試験（FRNT）、ブランク低減中和試験（PRNT、WHO 文書 http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/who_ivb_07.07_eng.pdf を参照、FRNT、フローサイトメトリーを用いたマウス及びサル等のインビボでの技術のような、他のかかる例は、当業者には周知であろう例えば、FRNT及びフローサイトメトリー方法の例については図30を参照のこと。

【0027】

一実施形態では、本化合物は、ウイルスを少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%、及び最も好ましくは100%中和する。さらに好ましい実施形態では、本化合物は、すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%、及び最も好ましくは98%、99%、または100%中和する。このウイルスは、昆虫細胞によってまたはヒト癌細胞株（典型的には、以下にさらに論じられるように、高い pr-M 含有ウイルスを産生すると見なされる）において、またはあるいは、ヒト初代細胞、例えば初代ヒト樹状細胞において、またはフリンを過剰発現する細胞株（低 pr-M 含有ウイルスを作製すると見なされる）において産生され得る。

【0028】

特定のレベルまで中和するとは、所与の濃度の化合物に対して特定のレベルまで中和することを意味することを含む。所与の化合物の適切な濃度は、実際の化合物に応じて異なり得ることが理解されよう。例えば、上記のアッセイにおいて使用される、例えば、所与

10

20

30

40

50

の化合物の濃度は、100 mM、10 mM、1 mM、100 μ M、10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、もしくは1 nM；または0.01 μ g/ml、0.02 μ g/ml、0.04 μ g/ml、0.05 μ g/ml、0.06 μ g/ml、0.075 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.25 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.75 μ g/ml、1 μ g/ml、1.25 μ g/ml、1.5 μ g/ml、1.75 μ g/ml、2 μ g/ml、2.25 μ g/ml、2.5 μ g/ml、2.75 μ g/ml、3 μ g/ml、3.25 μ g/ml、3.5 μ g/ml、3.75 μ g/ml、4 μ g/ml、4.25 μ g/ml、4.5 μ g/ml、4.75 μ g/ml、5 μ g/ml、5.25 μ g/ml、5.5 μ g/ml、5.75 μ g/ml、6 μ g/ml、6.5 μ g/ml、7 μ g/ml、7.5 μ g/ml、8 μ g/ml、8.5 μ g/ml、9 μ g/ml、9.5 μ g/ml、もしくは10 μ g/ml以下、または0.01 μ g/ml未満であり得る。典型的には、化合物、例えば抗体の濃度は、例えば、1 μ g/ml未満であり得る。

10

【0029】

例えば、化合物（例えば抗体）は、0.1 μ g/mlの化合物濃度で1種以上の血清型のウイルスを80%中和させ得、1 μ g/mlの化合物濃度で1種以上の血清型のウイルスを少なくとも98%、例えば100%中和させ得る。好ましくは、本化合物（例えば抗体）は、0.05 μ g/mlの濃度で1種以上の血清型のウイルスを80%中和するか、または0.5 μ g/mlの濃度で1種以上の血清型のウイルスを少なくとも98%、例えば100%中和する。

20

【0030】

化合物の所与の濃度に対して観察された中和のレベルがアッセイにおけるウイルス粒子の数によって異なり得ることも理解されよう。例えば、化合物の所与の濃度については、アッセイにおけるウイルス粒子の数が2倍である場合、中和のレベルは、（所与の宿主細胞集団に対して）低減し得ることが予測され得る。アッセイにおけるウイルス粒子の数は、典型的には、試験化合物の不在下で、例えば、96ウェルマイクロタイタープレートウェル中で、例えばコンフルエントな細胞、例えばちょうどコンフルエントな細胞を用いておよそ100フォーカスを提供するようなものである。

【0031】

例えば、一実施形態では、本化合物は、ウイルス濃度が、試験化合物の不在下で、例えば、96ウェルマイクロタイタープレートウェル中で、例えばコンフルエントな細胞、例えばちょうどコンフルエントな細胞を用いておよそ100フォーカスを提供するのに十分である場合に、1 μ g/mlまたは0.05 μ g/mlもしくはそれ以下の濃度で1種以上の血清型のウイルスを少なくとも80%のレベルまで、または100%のレベルまで中和する。

30

【0032】

ウイルスによって感染され得るアッセイにおける細胞の数はまた、見かけレベルの中和反応に影響し得る。例えば、少数の細胞は、大きな細胞集団よりも1細胞当たり表される、より大きな感染率を示し得る。したがって、化合物、ウイルス、及び宿主細胞数の比率はまた、重要であり得る。アッセイにおいて使用される細胞は、重要であり得る。アッセイは、マイクロタイタープレート中で、例えば96ウェルマイクロタイタープレート中で行われ得る。細胞は、マイクロタイタープレート中で、例えば96ウェルマイクロタイタープレート中で、容器中でコンフルエント、例えば、ちょうどコンフルエントであり得る。

40

【0033】

好ましくは、本化合物は、昆虫細胞、例えばC6/36昆虫細胞、またはヒト腫瘍細胞株（典型的には、高いpr-M含有ウイルスを産生し得る）及びヒト細胞、例えば初代ヒト細胞、例えば初代ヒト樹状細胞、またはフリンを過剰発現する細胞（低いpr-M含有ウイルスを作製すると見なされる）の両方において作られるウイルスを中和することができる。異なる細胞型におけるウイルス粒子、サブウイルス粒子、またはウイルス様粒子の産生は、当業者に公知であろう。例えば

50

【0034】

化合物のウイルスを中和する能力は、上述のように、実施例において試験することができる。一実施形態では、本化合物は、初代ヒト細胞、例えば 初代ヒト樹状細胞、または昆虫細胞で作られるウイルスを中和することができる。別の実施形態では、本化合物は、初代ヒト細胞及び昆虫細胞で作られるウイルスを同じレベルまで中和することができる。同じレベルまでとは、所与の濃度の化合物及び/または所与の濃度のウイルス及び/または所与の数の宿主細胞については、本化合物に起因する中和反応のレベルは、昆虫細胞及び初代ヒト細胞の両方で作られるウイルスにとっては有意に異ならないか、または本化合物に起因する中和反応のレベルは、昆虫細胞及び初代ヒト細胞の両方からのウイルスにおいて、特定の閾値を超える、例えば 80% 超、90%、95%、または 98% の中和反応であるという意味を含む。例えば、所与の濃度のウイルス粒子、及び所与の数の潜在性のある宿主細胞については、50% FRNT は、昆虫細胞及び初代ヒト細胞で作られたウイルスについては同じであり（有意に異ならない）、例えば、0.05 µg/ml 以下、または 0.5 µg/ml 以下、または 1 µg/ml 以下、または 5 µg/ml 以下である。好ましい実施形態では、本化合物は、初代ヒト細胞及び昆虫細胞で作られた、好ましくは 2 種の血清型、好ましくは 3 種の血清型、より好ましくは 4 種の血清型、またはすべての血清型、1 種を超える血清型の Dengue 熱ウイルスを中和することができる。最も好ましい実施形態では、本化合物は、昆虫細胞及び初代ヒト細胞の両方で作られたすべての血清型の Dengue 熱ウイルスを完全に（すなわち 100%）中和することができる。例えば、本化合物は、上で論じられるように、0.05 µg/ml の化合物濃度で約 100 フォーカスを得るのに十分なウイルス濃度で初代ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られるウイルスを 100% 中和することができる。初代ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られるとは、初代ヒト細胞（例えば）中で独立して作られるウイルス、同じ手順で、初代ヒト細胞及び昆虫細胞の両方を用いて産生されているウイルス粒子の特定の集団よりも昆虫細胞中で独立して作られるウイルス及びを意味することを含む。

10

20

【0035】

本発明において特定される交差反応性のある高度に中和する化合物は、ウイルス形成を独立して、エンベロープタンパク質の無傷ウイルス及び二量体の両方において見出される特定のエピトープに結合することが見出された。それ故に、本発明の化合物は、この特定のエピトープに結合するそれらの能力に関して定義され得る。

30

【0036】

それ故に、本発明のさらなる態様では、Dengue 熱ウイルスエンベロープ二量体エピトープ（EDE）に結合する化合物が提供される。EDE とは、本明細書に定義される任意の EDE という意味を含む。

【0037】

エンベロープ二量体エピトープ（EDE）に結合する化合物とは、1 種以上の血清型の Dengue 熱ウイルスの EDE に結合することができる任意の化合物を意味する。本化合物は、小分子、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂肪、原子、例えば、金属であり得る。好ましい実施形態では、本化合物は、ポリペプチド、好ましくは抗体またはその抗原結合部分である。本化合物についての選好は、前述された通りである。

40

【0038】

4 種の血清型の Dengue 熱ウイルスがある。それ故に、本化合物が 1 種の血清型の Dengue 熱ウイルスの EDE に結合し得ることが理解されよう。好ましい実施形態では、本化合物は、1 種を超える血清型の Dengue 熱ウイルスの EDE に結合し、上記の、2 種の血清型の Dengue 熱ウイルス、または 3 種の血清型の Dengue 熱ウイルス、または 4 種の血清型の Dengue 熱ウイルスに結合する、すなわち、すべての血清型の Dengue 熱ウイルスであると見なされるであろう。

【0039】

「結合する」とは、本発明の化合物とエピトープまたは分子または巨大分子または化合物との間の非共有結合のあらゆる形態の意味を含み、当該技術分野で通例の方法によって

50

評価されるEDEへの結合のあらゆる有意な度合いの意味を含む。好ましい実施形態では、本化合物は、EDEに選択的に結合する。EDEに選択的に結合するとは、本化合物がEDE以外の Dengue 熱ウイルスまたはエンベロープタンパク質に結合しない、またはそれらに有意に結合しないという意味を含む。また、本化合物が、あるもの以外の別の化合物または分子または巨大分子に結合しない、またはそれらに有意に結合しないという意味も含み、本化合物がEDEに結合するかどうかを決定するEDEを提示することは、十分に当業者の技量内にあるであろう。例えば、当業者に公知であるような、ELISAタイプのアッセイを使用してもよい。本化合物がEDEと結合するかどうか判定するための方法のある非限定的な例は、Dengue 熱ウイルスのうちの1種以上、好ましくはすべての血清型の無傷ウイルス、及び/またはDengue 熱ウイルスのうちの1種以上、好ましくはすべての血清型のエンベロープ二量体、及び/または本明細書に記載の定義のうちのいずれかに従うEDE、例えば安定化エンベロープ二量体、または異種骨格内に保持されるエンベロープタンパク質からの残基を含むEDEであり、偽物の非感染の上清は、固体支持体、例えば、抗EAb(4G2)でコーティングしたMAXISORP免疫プレート(NUNC)上に別々に捕捉される。次いで、捕捉ウェルを、本化合物、例えば、抗体またはその抗原結合部分、例えば、ヒトモノクローナル抗体、例えば、1ug/mlのヒトmAbでインキュベートし、続いて、レポーターに共役した二次抗体(化合物と結合する)、例えばALP共役抗ヒトIgGでインキュベートした。この反応を、適切な基質、例えばPNPP基質の添加によって可視化し、NaOHで停止する。ALP/PNPPについては、吸光度は、405nmで測定する。

10

20

【0040】

EDEに結合する化合物とは、感染していない上清を含むウェルに結合する背景のレベルを上回る任意の度合いまで、ウイルスまたはEDE、例えば安定化した可溶性タンパク質E二量体を含むウェルに結合する任意の化合物の意味を含む。好ましくは、ウイルスまたはEDE、例えば安定化した可溶性タンパク質E二量体に対して得られた結合のレベルは、感染していない上清ウェルへの結合の背景レベルの2倍、好ましくは4倍、好ましくは6倍、より好ましくは10倍である。この化合物がEDE以外の部位でウイルスまたはエンベロープタンパク質に結合するかどうか判定するために、変性または単量体または組換えエンベロープタンパク質に結合する化合物の能力を評価してもよい。この化合物が有意なレベルまで変性または単量体または組換えエンベロープタンパク質に結合する場合、EDE以外の部位でウイルスまたはエンベロープタンパク質に結合すると見なされる。この化合物が任意の他の分子または巨大分子または化合物以外のEDEに選択的に結合するかどうかを判定するために、EDEに結合する化合物の能力は、上述の方法を用いて、分子または巨大分子または化合物に結合する化合物の能力と比較することができる。化合物は、別の分子または巨大分子または化合物、例えば、変性または単量体エンベロープタンパク質に結合するよりも有意に広い範囲までEDEに結合する場合、例えば、この化合物が別の分子、巨大分子、または化合物、例えば、変性または単量体または組換えエンベロープタンパク質に結合するよりも少なくとも2倍、4倍、6倍、8倍、または10倍大きな親和性を有するEDEに結合する場合、EDEに選択的に結合する。

30

【0041】

EDEは、エンベロープタンパク質の二量体に広がる無傷ウイルス粒子上、または2つのポリペプチドに広がるエンベロープタンパク質の遊離二量体、例えば可溶性エンベロープタンパク質の遊離二量体上に形成されると見なされるエピトープである。エンベロープタンパク質配列は、図29中、ならびに配列番号29、31、33、及び35に詳述されている。

40

【0042】

好ましい実施形態では、本発明の化合物は、無傷ウイルスまたは遊離エンベロープ二量体(すなわち、エンベロープポリペプチド単量体の2倍の分子量を有する)、または上述及び以下にさらに論じられるような他の構造上のいずれかでEDEに結合し、単量体エンベロープタンパク質または変性エンベロープタンパク質に結合しない。一実施形態では、

50

本化合物が単量体エンベロープタンパク質または変性エンベロープタンパク質に結合する場合、それは有用な化合物と見なされず、本発明の化合物ではない。したがって、化合物が本発明のこの実施形態の化合物であるかどうかを特定する1つの非限定的な方法は、例えばウエスタンブロットでは変性エンベロープタンパク質、及び/または、例えばELISAでは組換え(単量体)エンベロープタンパク質、ならびに例えばELISAでは無傷ウイルス粒子、及び/または、エンベロープタンパク質の二量体(例えば可溶性エンベロープタンパク質の二量体)に結合するその能力について、例えば、化合物、例えば抗体またはその抗原結合部分をアッセイすることによるものである。本発明の好ましい化合物は、無傷ウイルスまたは非変性二量体に結合すると見なされるが、変性または単量体エンベロープタンパク質に結合しない(または有意により少ない程度に)と見なされる。結合の度合いは、上述のように評価され得る。

10

【0043】

融合ループに結合するが、EDEに結合しない化合物は、本発明の化合物であると思なされない。融合ループは、上述のまたは古典的な融合ループエピトープ(FL)を定義する101Wの内外の制限的な残基セットである。融合ループでは、残基101-WNGG-104は、二量体界面の向かいにあるドメインIIIに向かってW101側鎖を突出する歪んだらせん回転を作る。化合物がエンベロープ単量体または変性エンベロープタンパク質に結合する(例えば上述のように判定される)場合、この抗体がエンベロープポリペプチドの異なる部分(融合ループ領域において突然変異されるエンベロープポリペプチドに結合することによって確認され得る)に代わりに結合し得ることが可能であるが、融合ループに結合すると見なされ得る。

20

【0044】

別の実施形態では、融合ループに結合する化合物は、エンベロープタンパク質における以下の残基、特に、DENV-1:E49、Q77、I161、T200、W391、またはF392のうちの任意の1つ以上で突然変異によって影響を受けない(または有意に影響を受けない)ものである。

【0045】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物は、変性EDE、または変性エンベロープタンパク質に結合しない。

【0046】

一実施形態では、EDEは、デング熱ウイルスエンベロープポリペプチド二量体、例えば可溶性エンベロープポリペプチド二量体のポリペプチドに広がると見なされる。特定の一実施形態では、EDEは、ドメインI、II、及びIIIの領域のエンベロープポリペプチド二量体を含む。EDEが1種以上の血清型のデング熱ウイルスエンベロープタンパク質の二量体界面で四次構造依存性のエピトープを含むことが理解されよう。

30

【0047】

異なるデング熱血清型からのエンベロープタンパク質がハイブリッド二量体を形成する、二量化し得ることが理解されよう。したがって、一実施形態では、本化合物が結合するEDEは、異なるデング熱血清型由来のエンベロープ単量体で作られ、したがって、EDEは、ホモ二量体またはヘテロ二量体を含み得る。

40

【0048】

エンベロープタンパク質の二量体が無傷ビリオンまたはウイルス様粒子に見出されるように、EDEが、ビリオンまたはサブウイルス粒子またはウイルス様粒子の一部として化合物に提示され得ることも理解されよう。EDEがビリオンまたはサブウイルス粒子またはウイルス様粒子の一部として提示される場合に、本発明の化合物は、無傷ビリオンまたはサブウイルス粒子またはウイルス様粒子に結合するが、単量体または変性エンベロープタンパク質に結合しないものである。

【0049】

あるいは、EDEは、ビリオンの一部としてではない化合物に提示され得、例えば、2つのエンベロープタンパク質の二量体から形成されるEDEは、遊離二量体として化合物

50

に提示され得る。それ故に、一実施形態では、本発明の化合物は、E D E がエンベロープまたは可溶性エンベロープ (s E) タンパク質の遊離二量体である場合に、E D E に結合する化合物である。別の実施形態では、本発明の化合物は、E D E がエンベロープまたは s E タンパク質の安定化二量体である場合に、E D E に結合する化合物である。

【0050】

遊離二量体は、タンパク質の二量化を安定化させる成分を含む組成物の一部として提示され得る。例えば、タンパク質会合を促進すると見なされる特定の緩衝液成分を、使用してもよい。あるいは、エンベロープタンパク質は、二量体形成を促進する高濃度で提示され得る (実施例7を参照のこと)。

【0051】

エンベロープ二量体を安定化される外部薬剤に加えて、エンベロープタンパク質は、二量体配置において増加した安定性を有するように操作され得る。例えば、二量体は、

- 2つのエンベロープまたは s E 単量体間での少なくとも1つの、任意に2、3、4、5、6、7、8、9つ、または10もしくはそれ以上のジスルフィド鎖間結合によって共有結合的に安定化され得る、かつ/または、

- 2つの s E 単量体間での少なくとも1つの、任意に2、3、4、5、6、7、8、9つ、または10もしくはそれ以上のスルフヒドリル反応性架橋剤によって共有結合的に安定化され得る、かつ/または、

- 改変糖類を介して2つのエンベロープまたは s E 単量体を結合することによって共有結合的に安定化され得る、及び/または、

- 二量体界面でまたは各単量体のドメイン1 (D 1) /ドメイン3 (D 3) リンカーにおいて、少なくとも1つのエンベロープまたは s E 単量体のアミノ酸配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基を、少なくとも1つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって、非共有結合的に安定化され得る。

【0052】

デング熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E 外部ドメイン (s E ; 可溶性エンベロープポリペプチド/糖タンパク質) は、デング熱ウイルスの血清型1、2、及び4のエンベロープ糖タンパク質 E の1~395のアミノ酸断片、及びデング熱ウイルスの血清型3のエンベロープ糖タンパク質 E の1~393のアミノ酸断片を指す。

【0053】

好ましい実施形態では、本化合物は、E D E に結合し、この E D E は s E の安定化二量体であり、組換えデング熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E 外部ドメイン (組換え s E) 単量体は、配列番号132の D E N V - 1 s E、配列番号133の D E N V - 2 s E、配列番号134の D E N V - 3 s E、配列番号135の D E N V - 4 s E、ならびに H 2 7 F、H 2 7 W、L 1 0 7 C、F 1 0 8 C、H 2 4 4 F、H 2 4 4 W、S 2 5 5 C、A 2 5 9 C、T / S 2 6 2 C、T / A 2 6 5 C、L 2 7 8 F、L 2 9 2 F、L 2 9 4 N、A 3 1 3 C (D E N 3 では S 3 1 3 C)、及び T 3 1 5 C の中から選択される少なくとも1つの突然変異 (置換) を有するその突然変異体 s E からなる群から選択される。これらの突然変異は、下述のように、二量体配置において増加した安定性に貢献すると見なされる。

【0054】

任意に、その当該突然変異体 s E は、さらに、Q 2 2 7 N、E 1 7 4 N、及び D 3 2 9 N の中から選択される少なくとも1つの突然変異 (置換)、好ましくは3つの突然変異 Q 2 2 7 N、E 1 7 4 N、及び D 3 2 9 N を有する。これらの突然変異は、適切でない免疫原性領域を覆い、対象において、本発明の安定化組換え s E 二量体が4種すべてのデング熱ウイルス血清型を対象とする中和抗体を優先的に引き起こすことが可能であると見なされる。

【0055】

突然変異を誘発する s E 二量体の上述の変異誘発は、架橋によって安定化を提供するための二量体の接触でのシステイン突然変異を含む、その免疫原性を妨げないが、より高い

10

20

30

40

50

二量体親和性を提供する突然変異を導入する、かつ/あるいはクリック化学によって、及び/または二量体界面でもしくは各単量体のドメイン1(D1)/ドメイン3(D3)リンカーにおいて、空洞の形成を可能にするために、少なくとも1つのsE単量体のアミノ酸配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基を、少なくとも1つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって、二量体における隣接糖類間での化学的架橋を可能にする新しいグリコシル化を導入する。

【0056】

特に特定されない限り、このアミノ酸残基位置は、図15中に示されるsEアミノ酸配列アライメントに従って番号付けされる。

【0057】

配列番号132のDENV-1 sE、配列番号133のDENV-2 sE、配列番号134のDENV-3 sE、配列番号135のDENV-4 sEをコードする核酸配列は、それぞれ、配列番号136、137、138、及び139として示される。

【0058】

本明細書に使用される場合、「組換え」という用語は、本発明のデング熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質E外部ドメイン、抗体、またはその抗体断片を産生するための遺伝子操作方法(クローニング、増幅)の使用を指す。

【0059】

二量体は、上に定義される2つの同一の組換えsEのホモ二量体、または上に定義される2つの異なる組換えsEのヘテロ二量体であり得、この二量体は、好ましくはホモ二量体である。

【0060】

例として、それは、上に定義されるDENV-1 sEとDENV-2 sEとのヘテロ二量体であり得る。それはまた、上に定義されるDENV-1 sEとDENV-1 sEの突然変異体sEとのヘテロ二量体であり得る。

【0061】

一実施形態では、本化合物は、EDEに結合し、EDEは、sEの安定化二量体であり、エンベロープまたは組換えsEの安定化二量体は、2つのsE単量体間での少なくとも1つ、2つ、または3つのジスルフィド鎖間結合によって共有結合的に安定化される。

【0062】

有利には、当該安定化二量体は、単一鎖間ジスルフィド結合をもたらす、二量体の2倍の分子軸によって位置付けられる単一のシステイン突然変異体sE、または2倍の分子軸から離れて複数の(例えば、2つの)ジスルフィド結合を作製し得る複数の(例えば、二重の)システイン突然変異体sEを含む。当該ジスルフィド結合は、酸性条件下で、例えば、DMSO溶液(O. Khakhshoora, 2009)を用いてまたはCdCl₂もしくはCuSO₄等の酸化剤を用いて合成され得る。したがって、当該安定化二量体は、二量体の(ほぼ)2倍の分子軸によって各単量体の一方のアミノ酸残基がシステインと置換される、単量体から成り得る。当該安定化二量体はまた、二量体の2倍の分子軸から離れた各単量体の2つのアミノ酸残基がシステインと置換される、単量体からも成り得る。当該安定化二量体はまた、二量体の2倍の分子軸から離れた各単量体の3つのアミノ酸残基がシステインと置換される、単量体からも成り得る。

【0063】

かかる配置が、FLE領域への接近を制限し得、そのために、実施例17においてさらに論じられるように、抗FLE反応を作り出す分子の能力を低減するように、1種を超える鎖間ジスルフィド結合があり得ることが望ましいものであり得る。

【0064】

別の好ましい実施形態では、本化合物は、EDEに結合し、EDEは、sEの安定化二量体であり、エンベロープまたは組換えsEの安定化二量体は、上に定義される突然変異A259CまたはS255Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体であり、残基259Cまたは255Cはジスルフィド鎖間結合によって一緒に結合している。

10

20

30

40

50

【0065】

別の好ましい実施形態では、EDEが組換えsEの安定化二量体を含む場合に、安定化組換えsE二量体は、上に定義される突然変異A259Cを有する突然変異体sEと、上に定義される突然変異S255Cを有する突然変異体sEとのヘテロ二量体であり、残基259C及び255Cはジスルフィド鎖間結合によって一緒に結合している。

【0066】

別の好ましい実施形態では、EDEが組換えsEの安定化二量体を含む場合に、安定化組換えsE二量体は、上に定義される突然変異F108C及びT315Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体、または上に定義される突然変異L107C及びA313Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体であり、残基108C及び315Cまたは残基107C及び313Cはジスルフィド鎖間結合によって一緒に結合している。

10

【0067】

一実施形態では、本化合物は、EDEに結合し、このEDEは、sEの安定化二量体であり、エンベロープまたは組換えsEの安定化二量体は、上に定義される突然変異F108C及びA313Cを有する突然変異体sEと、上に定義される突然変異L107C及びT315Cを有する突然変異体sEとのヘテロ二量体であり、残基108C及び313Cは2つのsE単量体間でのジスルフィド鎖間結合によって残基315C及び107Cにそれぞれ結合している。

【0068】

別の好ましい実施形態では、EDEは、組換えsEの安定化二量体を含み、安定化組換えsE二量体は、上に定義される、突然変異A259C、F108C、及びT315Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体、突然変異S255C、F108C、及びT315Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体、突然変異A259C、L107C、及びA313Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体、ならびに突然変異A255C、L107C、及びA313Cをそれぞれ有する突然変異体sEのホモ二量体からなる群から選択され、残基259C、255C、108C、315C、107C、及び313Cが、ジスルフィド鎖間結合によって残基259C、255C、315C、108C、313C、及び107Cにそれぞれ結合している。

20

【0069】

別の好ましい実施形態では、本化合物は、EDEに結合し、EDEは、組換えsEの安定化二量体を含み、安定化組換えsE二量体は、上に定義される突然変異A259C、F108C、及びT315Cを有する突然変異体sEと、上に定義される突然変異S255C、F108C、及びT315Cを有する突然変異体sEとのヘテロ二量体であり、残基259C、108C、及び315Cは、ジスルフィド鎖間結合によって残基255C、315C、及び108Cにそれぞれ結合している。

30

【0070】

別の好ましい実施形態では、EDEは、組換えsEの安定化二量体を含み、安定化組換えsE二量体は、上に定義される突然変異S255C、L107C、及びA313Cを有する突然変異体sEと、上に定義される突然変異A259C、L107C、及びA313Cを有する突然変異体sEとのヘテロ二量体であり、残基255C、107C、及び313Cは、ジスルフィド鎖間結合によって残基259C、313C、及び107Cにそれぞれ結合している。

40

【0071】

ジスルフィド結合による安定化と同様に、安定化はまた、スルフヒドリル反応性架橋剤によっても達成され得ることを理解されよう。それ故に、一実施形態では、EDEは、組換えsEの安定化二量体を含み、本発明の安定化組換えsE二量体は、sE単量体間での少なくとも1つ、2つ、または3つのスルフヒドリル反応性架橋剤（チオール反応性架橋剤とも呼ばれる）によって共有結合的に安定化される。

【0072】

タンパク質の化学的架橋は、当該技術分野で公知である（概要については、Hemap

50

r a b h a , 2 0 1 2 を参照のこと)。

【 0 0 7 3 】

当然ながら、s E 二量体は、2 つの異なる面を有し、一方は、抗体が結合する細胞外培地に曝露され、もう一方は、ウイルス膜に曝露される。

【 0 0 7 4 】

有利には、当該安定化組換え s E 二量体は、ウイルス膜に曝露される s E の面に存在する候補アミノ酸残基を含み、それ故に、エピトープの部分ではない。各単量体の各候補アミノ酸残基の一方は、システインに突然変異(置換)され、適切な長さのスルフヒドリル反応性架橋剤の標的物である遊離スルフヒドリル基を産生する。

【 0 0 7 5 】

Thr / Ser 2 6 2 及び Thr / Ala 2 6 5 は、候補残基である。二量体の文脈においてそれらの間の距離は、それぞれ、1 2 及び 2 2 である。さらに、これらの残基(Thr / Ser 2 6 2、Thr / Ala 2 6 5)は、完全に保存されない。故に、それらは点突然変異に耐性があり得る。

【 0 0 7 6 】

好ましい実施形態では、本化合物は、E D E に結合し、E D E は、組換え s E の安定化二量体を含み、安定化組換え s E 二量体は、上に定義される突然変異 T / S 2 6 2 C または T / A 2 6 5 C をそれぞれ有する突然変異体 s E のホモ二量体であり、残基 2 6 2 C または 2 6 5 C は、スルフヒドリル反応性架橋剤によって一緒に結合している。

【 0 0 7 7 】

E D E が組換え s E の安定化二量体を含む別の好ましい実施形態では、安定化組換え s E 二量体は、上に定義される突然変異 T / S 2 6 2 C を有する突然変異体 s E と、上に定義される突然変異 T / A 2 6 5 C を有する突然変異体 s E とのヘテロ二量体であり、残基 2 6 2 C 及び 2 6 5 C は、スルフヒドリル反応性架橋剤によって一緒に結合している。

【 0 0 7 8 】

エピトープの一部であると思われず、架橋され得る組換え s E の領域は、s E の残基 1 ~ 9 から成る領域 A、s E の残基 2 5 ~ 3 0 から成る領域 B、s E の残基 2 3 8 ~ 2 8 2 から成る領域 C、s E の残基 9 6 ~ 1 1 1 から成る領域 D、及び s E の残基 3 1 1 ~ 3 1 8 から成る領域 E である。単量体のこれらの 5 つの領域(A ~ E)の残基のうちいずれかは、組換え s E 二量体において他の単量体の他の残基の 2 5 ~ 3 0 未満であり、それ故に、これらの残基は架橋され得る。

【 0 0 7 9 】

有利には、各単量体のこれらの 5 つの領域における候補アミノ酸残基のうち 1 つまたはいくつかは、システインに突然変異(置換)され、上に定義される適切な長さのスルフヒドリル反応性架橋剤の標的物である遊離スルフヒドリル基を産生する。

【 0 0 8 0 】

別の実施形態では、本化合物は、E D E に結合し、E D E は、組換え s E の安定化二量体を含み、安定化組換え s E 二量体は、突然変異体 s E のホモ二量体またはヘテロ二量体であり、s E のアミノ酸残基 1 ~ 9、2 5 ~ 3 0、2 3 8 ~ 2 8 2、9 6 ~ 1 1 1、3 1 1 ~ 3 1 8 のうちの少なくとも 1 つは、システインに突然変異(置換)され、突然変異したシステイン残基は、スルフヒドリル反応性架橋剤によって一緒に結合している。

【 0 0 8 1 】

スルフヒドリル反応性架橋剤は、好ましくは、同一または非同一の反応基を含むホモ二官能性試薬であり、2 つの単量体間での分子間架橋の構築を可能にする。ホモ二官能性架橋剤は、スパーサーアームのいずれかの末端で同一の反応基を有し、一般に、それらは、1 ステップの反応手順において使用され得る。本発明のスルフヒドリル反応性架橋剤は、マレイミド、ハロアセチル(好ましくは、プロモ-またはヨード-アセチル)、ピリジジルスルフィド、ビニルスルホン、ハロゲン化アルキル、またはアジリジン化合物、アクリロイル誘導体、アリール化剤、またはチオール-ジルスルフィド交換試薬(Hermanson, 2010、Hemaprabha, 2012)、例えばビス(メタンチオスフホネ

10

20

30

40

50

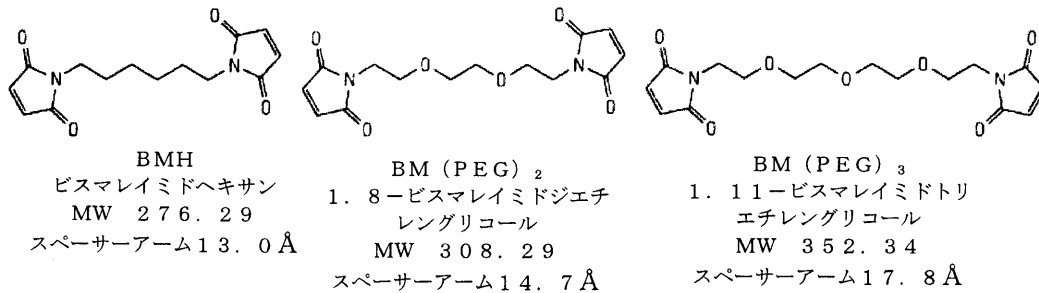
ート) (Habertzら、2006) であり得る。

【0082】

異なる長さのスペーサーを有する、本発明に従うマレイミドホモ二官能性スルフィドリル反応性架橋剤の例としては、BMOE (1, 2 - ビス - マレイミドエタン)、BMB (1, 4 - ビス - マレイミドブタン)、BMH (1, 6 - ビス - マレイミドヘキサン)、TMEA (トリス - (2 - マレイミドエチル) アミン)、BM(PEG)₂ (1, 8 - ビスマレイミドジエチレングリコール)、BM(PEG)₃ (1, 11 - ビスマレイミドトリエチレングリコール)、BMDB (1, 4 - ビスマレイミジル - 2, 3 - ジヒドロキシブタン)、DTME (ジチオ - ビス - マレイミドエタン)、ならびに好ましくはBMH、BM(PEG)₂、及びBM(PEG)₃が挙げられる。

10

【化1】



20

【0083】

スルフィドリル基によるマレイミド基の特異的反応は、架橋反応による構造シフトの度合いを最小限に抑えるために、軽度の緩衝及びpH条件下で行われる。好ましくは、反応混合物のpHは、6.5 ~ 7.5であり、可逆ではない安定したチオール - エーテル結合の形成をもたらす(この結合は、還元剤で切断され得ない)。

【0084】

ジスルフィド結合及びスルフィドリル反応性架橋剤を介した安定化に加えて、安定化は、改変糖類による2つの単量体の結合によって得られ得ることが理解されよう。この目的を達成するために、グリコシル化部位は、それらに挿入され、クリック化学によってそれらを連結するために、改変糖類と反応させる。

30

【0085】

この実施形態に従って、本化合物は、EDEに結合し、EDEは、組換えsEの安定化二量体を含み、安定化組換えsE二量体は、突然変異体sEのホモ二量体またはヘテロ二量体であり、

- 一方のsE単量体が、グリコシル化部位を導入する少なくとも1つの突然変異を有し、突然変異したアミノ酸残基が、X官能基を担持する改変糖でグリコシル化され、

- もう一方のsE単量体が、グリコシル化部位を導入する少なくとも1つの突然変異を有し、突然変異したアミノ酸残基が、Y官能基を担持する改変糖でグリコシル化され、

両方の突然変異した残基が、具体的にはクリック化学によって、第1のsE単量体の糖のX官能基をもう一方のsE単量体の糖のY官能基と反応させることによって、改変糖類を介して一緒に結合している。

40

【0086】

X官能基とは、Y官能基と反応し、クリック化学によって共有結合を形成することができる糖によって運ばれる化学基を意味し、当該Y官能基は、好ましくはアジド官能基である。

【0087】

Y官能基とは、X官能基と反応し、クリック化学によって共有結合を形成することができる糖によって運ばれる化学基を意味し、当該X官能基は、好ましくは末端アルキン官能基である。

【0088】

50

改変糖類は、Laughlinら、2007によって記載されるように、sE単量体において合成され、導入され、Speerら、2003によって記載されるように、一緒に結合され得る。

【0089】

二量体を安定化させる上述の共有結合方法に加えて、非共有結合手段もまた使用してもよい。それ故に、EDEが組換えsEの安定化二量体を含む別の実施形態では、この二量体は、二量体界面で当該二量体の空洞を充填させることによって、1つまたは2つの単量体、好ましくは2つの単量体のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸を、かさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって非共有結合的に安定化される。この実施形態に従って、組換えsE二量体の四元立体構造に特有の空洞は、単量体において操作された疎水性置換によって特定され、充填される。

10

【0090】

この実施形態に従って、安定化組換えsE二量体は、二量体界面でまたは各単量体のドメイン1(D1)/ドメイン3(D3)リンカーにおいて、空洞を形成する領域内で、少なくとも1つのsE単量体のアミノ酸配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基を、少なくとも1つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって非共有結合的に安定化される。かかる置換は、2つのsE単量体間での疎水性相互作用を増加させることができる。

【0091】

EDEが組換えsEの安定化二量体を含む好ましい実施形態では、安定化組換えsE二量体は、上に定義される2つの組換えsEのホモ二量体またはヘテロ二量体、好ましくはホモ二量体であり、組換えsEのうちの1つまたは2つの組換えsEが、H27F、H27W、H244F、H244W、及びL278Fからなる群から選択される少なくとも1つの突然変異(置換)を有する。突然変異H27F、H27W、H244F、H244W、及びL278Fは、組換えsE二量体のF279周辺の空洞を安定化させ、二量体界面を強化し、ビリオン中のF279の立体構造を模倣することを可能にする。

20

【0092】

二量体を非共有結合的に安定化させる他の手段は、例えば、各単量体のドメイン1(D1)/ドメイン3(D3)リンカーにおいて、1つまたは2つの、好ましくは2つの単量体のアミノ酸配列中のアミノ酸を、少なくとも1つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによる非共有結合性安定化を含む。

30

【0093】

好ましい実施形態では、本化合物は、EDEに結合し、このEDEは組換えsEの安定化二量体を含み、安定化組換えsE二量体は、上に定義される2つの組換えsEのホモ二量体またはヘテロ二量体、好ましくはホモ二量体であり、組換えsEのうちの1つまたは2つの組換えsEが、L292F及びL294Nからなる群から選択される少なくとも1つの突然変異(置換)を有する。この突然変異L292F、L294Nは、sE二量体立体構造におけるD1~D3リンカーの安定化を可能にすると見なされる。

【0094】

EDEが操作によって二量体配置において安定化される好ましい実施形態では、上述のような操作は、二量体の全体の3D構造の変化をもたらさないか、または全体の3D構造を実質的に変化せず、天然の二量体における残基は、操作された二量体に空間的に対応する。天然二量体が操作された二量体に空間的に対応する場合、このことは、操作された二量体(またはその部分、例えば、VDRを特徴付ける際の特に重要な残基、例えば、表2中に示される及び/または以下にさらに論じられる残基に反映させること)の3Dモデルが天然二量体の3Dモデルに重ね合わされる場合に、天然二量体における骨格原子の空間的位置を特徴付ける配位が、操作された二量体の類似した骨格原子を特徴付ける配位とは約10オングストローム未満異なることを意味する。骨格原子は、ペプチド骨格を形成するアミノ酸の骨格原子であるか、または3D折り畳みパターンは、すなわち、側鎖原子のいくつかまたはすべての位置が同様に有意に変化しない場合があるが、側鎖原子を含まない。3D構造は、VDEの免疫原性であるかどうかの鍵であり、したがって、好ましい実

40

50

施形態では、操作は、減少した免疫原性を有する二量体をもたらさない。一実施形態では、操作は、異なる3D立体構造を有する二量体をもたらさない。好ましくは、操作は、増加した免疫原性を有する二量体をもたらす。かかるアプローチは、参照^{8 4}において使用されている。それ故に、一実施形態では、本化合物は、上述のような操作されたEDEに結合する。

【0095】

天然二量体の3Dモデルは、例えば、上述の受入番号1OAN、1OK8、1UZG、及び3UAJの下で、タンパク質データバンクにおいて入手可能な、デング熱ウイルス血清型、例えば、血清型2、3、及び4からのエンベロップ糖タンパク質外部ドメインにおける結晶構造に関する情報を使用するために形成され得る。

10

【0096】

特定の突然変異または修飾が3D構造を変化させるまたは実質的に変化させるかどうかは、EDEに結合することが知られている本明細書に記載の抗体が操作されたバージョンのEDEに依然として結合することができるかどうかを観察することを含む、異なる技術によって評価され得る。

【0097】

当業者は、例えば、潜在的な安定化させる修飾の特定に役立つようなコンピュータプログラムを使用することができる

【0098】

EDEの免疫原性における操作の効果は、操作された及び操作されていないEDEを投与される場合に対象における抗体反応を比較することによって、または既知の抗EDE抗体への結合を比較することによって評価され得る。

20

【0099】

あるいは、改変されたエンベロップタンパク質は、デング熱ウイルスにおいて発現され、ウイルスを中和する化合物の能力が評価され得る。

【0100】

安定化したEDEを提示するために、それぞれのEDE（骨格タンパク質と称される）に類似の三次元構造を有する非EDE異種タンパク質は、改変タンパク質がEDEを保持することができる適切な残基を含有するように改変することができる。それ故に、一実施形態では、本化合物はEDEに結合し、このEDEは、エピトープ骨格タンパク質の一部として提示される。エピトープ骨格タンパク質は、異種の「受容体」骨格タンパク質に融合されるエピトープ配列を含むキメラタンパク質である。エピトープ骨格の設計は、例えば、エピトープが異種骨格タンパク質に融合される場合に、エピトープの天然構造及び立体構造を保存する様式でコンピュータ的に行われる。かかる骨格タンパク質の使用は、当該技術分野で公知であり、かかる方法及び技術は、第WO 2011/050168号及び参照^{5 4}、^{8 2}、^{8 3}に記載されており、当業者はそこに記載の方法に従い、それらを本発明に適用することができる。

30

【0101】

したがって、一実施形態では、EDEは、エピトープ骨格タンパク質の一部を含み、この骨格タンパク質は、エンベロップ二量体エピトープに共有結合している異種骨格タンパク質を含む。骨格タンパク質は、本化合物がタンパク質、任意に抗体またはその抗原結合部分である場合に、かかる残基と化合物の間、例えば化合物の接触残基間の相互作用を促進するために適切な空間的配向においてEDEの接触残基を保持するという点で、本発明のEDEを作製するのに有用である。接触残基は、別の分子のアミノ酸と直接または間接的に相互作用する（例えば、塩橋を通して直接的または間接的にイオン結合を形成する）分子に存在する任意のアミノ酸である。少なくともDENV-1において、EDEに結合する化合物において潜在的に重要であると見なされているエンベロップタンパク質の残基は、表2中に詳細されており、骨格タンパク質は、全二量体を示し得るか、または上の選択された残基のみ示し得る。天然二量体またはその一部の3Dモデルは、例えば、上述の受入番号1OAN、1OK8、1UZG、及び3UAJの下で、タンパク質データバンク

40

50

において入手可能な、デング熱ウイルス血清型、例えば、血清型 2、3、及び 4 からのエンベロープ糖タンパク質外部ドメインにおける結晶構造に関する情報を使用するために形成され得る。

【0102】

突然変異分析は、本発明において特定される抗体への結合において重要である DENV 1 及び DENV 2 の特定の残基を示した。これらの残基は、

DENV 1 : E 4 9、K 6 4、Q 7 7、W 1 0 1、V 1 2 2、N 1 3 4、N 1 5 3、T 1 5 5、I 1 6 1、A 1 6 2、P 1 6 9、T 2 0 0、K 2 0 2、E 2 0 3、L 3 0 8、K 3 1 0、Q 3 2 3、W 3 9 1、F 3 9 2、

DENV 2 : Q 7 7、W 1 0 1、N 1 5 3、T 1 5 5、K 3 1 0 である。

10

【0103】

これらの残基のすべては、結合、及び Q 7 7、W 1 0 1、N 1 5 3、T 1 5 5、K 3 1 0 に重要であると見なされる。

【0104】

したがって、一実施形態では、化合物は、EDE に結合し、EDE は骨格タンパク質の一部であり、この骨格タンパク質は、デング熱ウイルスエンベロープタンパク質の E 4 9、K 6 4、Q 7 7、W 1 0 1、V 1 2 2、N 1 3 4、N 1 5 3、T 1 5 5、I 1 6 1、A 1 6 2、P 1 6 9、T 2 0 0、K 2 0 2、E 2 0 3、L 3 0 8、K 3 1 0、Q 3 2 3、W 3 9 1、F 3 9 2 のうちの 1 つ以上に対応する少なくとも残基、またはデング熱ウイルスエンベロープタンパク質、具体的には DENV - 1 及び DENV - 2 に同等の残基を保持する。ある特定の残基は、より重要であると見なされ、したがって、EDE のさらなる実施形態は、デング熱ウイルスエンベロープタンパク質の Q 7 7、W 1 0 1、N 1 5 3、T 1 5 5、K 3 1 0 に対応する少なくとも 1 つ以上の残基、またはデング熱ウイルスエンベロープタンパク質、具体的には DENV - 1 及び DENV - 2 に同等の残基を保持する骨格タンパク質を含む。

20

【0105】

エピトープに接触するのに重要であると見なされるエンベロープタンパク質の残基は、図 3 1 中に示され、例えば、

B 7 抗体は、残基 N 6 7、T 6 8、T 6 9、T 7 0、E 7 1、S 7 2、R 7 3、L 8 2、V 9 7、D 9 8、R 9 9、W 1 0 1、G 1 0 2、N 1 0 3、G 1 0 4、I 1 1 3、G 1 5 2、N 1 5 3、D 1 5 4、T 1 5 5、G 1 5 6、K 2 4 6、K 2 4 7、Q 2 4 8、D 2 4 9 で DENV 2 EDE に接触すると見なされており、

30

A 1 1 抗体は、残基 N 6 7、T 6 8、T 6 9、T 7 0、E 7 1、S 7 2、R 7 3、C 7 4、E 8 4、V 9 7、D 9 8、R 9 9、G 1 0 2、N 1 0 3、G 1 0 4、C 1 0 5、V 1 1 4、N 1 5 3、D 1 5 4、T 1 5 5、G 1 5 6、H 1 5 8、K 2 4 6、K 2 4 7、Q 2 4 8、D 2 4 9、V 2 5 0 で DENV 2 EDE に接触すると見なされており、

C 1 0 抗体は、残基 R 2、H 2 7、G 2 8、E 4 4、L 4 5、I 4 6、K 4 7、N 6 7、T 6 8、T 6 9、T 7 0、E 7 1、S 7 2、R 7 3、C 7 4、Q 7 7、S 8 1、L 8 2、N 8 3、E 8 4、V 9 7、R 9 9、W 1 0 1、G 1 0 2、N 1 0 3、G 1 0 4、C 1 0 5、G 1 0 6、L 1 1 3、T 1 1 5、K 2 4 6、K 2 4 7、Q 2 4 8、Q 2 7 1、V 3 0 9、K 3 1 0、R 3 2 3、Q 3 2 5、D 3 6 2 で DENV 2 EDE に接触すると見なされており、

40

C 1 0 抗体は、残基 R 2、H 2 7、G 2 8、G 2 9、E 4 4、L 4 5、T 4 6、N 6 7、T 6 9、T 7 0、A 7 1、T 7 2、R 7 3、C 7 4、Q 7 7、V 9 7、R 9 9、W 1 0 1、G 1 0 2、N 1 0 3、G 1 0 4、C 1 0 5、G 1 0 6、V 1 1 3、R 2 4 7、Q 2 4 8、D 2 4 9、D 2 7 1、M 2 7 8、D 3 0 9、K 3 1 0、V 3 2 4、K 3 2 3、K 3 2 5、T 3 6 1、N 3 6 2 で DENV 4 EDE に接触すると見なされており、

C 8 抗体は、残基 N 6 7、T 6 8、T 6 9、T 7 0、E 7 1、S 7 2、R 7 3、C 7 4、Q 7 7、N 8 3、E 8 4、V 9 7、D 9 8、R 9 9、W 1 0 1、G 1 0 2、N 1 0 3、G 1 0 4、C 1 0 5、G 1 0 6、L 1 1 3、E 1 4 8、H 1 5 8、K 2 4 6、K 2 4 7、

50

Q 2 4 8、D 2 4 9、I 3 0 8、K 3 1 0、E 3 1 1、R 3 2 3、D 3 6 2、G 3 7 4 で D E N V 2 E D E に接触すると見なされている。

【0106】

それ故に、化合物、具体的には D E N V 2 及び D E N V 4 への結合において重要であると見なされているエンベロープタンパク質の残基は、

A 7 1、C 1 0 5、C 7 4、D 1 5 4、D 2 4 9、D 2 7 1、D 3 0 9、D 3 6 2、D 9 8、E 1 4 8、E 3 1 1、E 4 4、E 7 1、E 8 4、G 1 0 2、G 1 0 4 G 1 0 6、G 1 5 2、G 1 5 6、G 2 8、G 2 9、G 3 7 4、H 1 5 8、H 2 7、I 1 1 3、I 3 0 8、I 4 6、K 2 4 6、K 2 4 7、K 3 1 0、K 3 2 3、K 3 2 5 K 4 7、L 1 1 3、L 4 5、L 8 2、M 2 7 8、N 1 0 3、N 1 5 3、N 3 6 2、N 6 7、N 8 3、Q 2 4 8、Q 2 7 1、Q 3 2 5、Q 7 7、R 2、R 2 4 7、R 3 2 3、R 7 3、R 9 9、S 7 2、S 8 1、T 1 1 5、T 1 5 5、T 3 6 1、T 4 6、T 6 8、T 6 9、T 7 0、T 7 2、V 1 1 3、V 1 1 4、V 2 5 0、V 3 0 9、V 3 2 4、V 9 7、W 1 0 1 であるが、

または Dengue 熱ウイルスエンベロープタンパク質の同等残基である。

【0107】

骨格タンパク質は、

Dengue 熱ウイルスエンベロープタンパク質の E 4 9、K 6 4、Q 7 7、W 1 0 1、V 1 2 2、N 1 3 4、N 1 5 3、T 1 5 5、I 1 6 1、A 1 6 2、P 1 6 9、T 2 0 0、K 2 0 2、E 2 0 3、L 3 0 8、K 3 1 0、Q 3 2 3、W 3 9 1、F 3 9 2、A 7 1、C 1 0 5、C 7 4、D 1 5 4、D 2 4 9、D 2 7 1、D 3 0 9、D 3 6 2、D 9 8、E 1 4 8、E 3 1 1、E 4 4、E 7 1、E 8 4、G 1 0 2、G 1 0 4 G 1 0 6、G 1 5 2、G 1 5 6、G 2 8、G 2 9、G 3 7 4、H 1 5 8、H 2 7、I 1 1 3、I 3 0 8、I 4 6、K 2 4 6、K 2 4 7、K 3 2 3、K 3 2 5 K 4 7、L 1 1 3、L 4 5、L 8 2、M 2 7 8、N 1 0 3、N 3 6 2、N 6 7、N 8 3、Q 2 4 8、Q 2 7 1、Q 3 2 5、R 2、R 2 4 7、R 3 2 3、R 7 3、R 9 9、S 7 2、S 8 1、T 1 1 5、T 3 6 1、T 4 6、T 6 8、T 6 9、T 7 0、T 7 2、V 1 1 3、V 1 1 4、V 2 5 0、V 3 0 9 V 3 2 4、V 9 7、またはその同等残基の、一連の残基の両方から選択される 1 つ以上の残基を示し得るか、またはこれらのうちの少なくとも 1 つ以上、例えば、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは 10、またはそのすべてを示し得る。

【0108】

加えて、骨格タンパク質は、前述のように、二量体配置の安定性を増加させると見なされている残基：H 2 7 F、H 2 7 W、L 1 0 7 C、F 1 0 8 C、H 2 4 4 F、H 2 4 4 W、S 2 5 5 C、A 2 5 9 C、T / S 2 6 2 C、T / A 2 6 5 C、L 2 7 8 F、L 2 9 2 F、L 2 9 4 N、A 3 1 3 C、及び T 3 1 5 C のセットのうちの任意の 1 つ以上またはそのすべてを示し得る。

【0109】

骨格タンパク質は、二量体、または二量体の断片を保持し得、免疫原性に必須であると見なされている上記の改変のうちのいずれかを含み得、及び / または増加した二量体の安定性、例えば増加したジスルフィド結合をもたらし得る。

【0110】

さらに、この骨格は、改善された E D E が示されるような骨格であり得る。一実施形態では、本化合物は、したがって、改善された E D E に結合する。例えば、以下及び実施例 2 及び 5 に記載されるように、Dengue 熱感染を有する患者は、有用な抗体であると見なされる V D E に向けて進められる抗体、または有用であると見なされない融合ループ（抗 F L 抗体）に向かって配向される抗体のいずれかを有する傾向がある。それ故に、骨格は、E D E のみが提示されるように、かつ、化合物、例えば、F L に作り出される、抗体またはその抗原結合部分の可能性を排除するような方法で提示されるように操作され得る。したがって、ある好ましい実施形態では、E D E は、任意に骨格タンパク質に組み込むことによって、抗体を F L ではなく、E D E に作り出すことができる。

【0111】

10

20

30

40

50

骨格タンパク質とは無関係に、エンベロープタンパク質は、改善されたE D Eが生成されるように操作され得る。上述のように、抗F L抗体によって認識することができず、かかる抗体を作り出すことができないE D Eは、改善されたE D Eであると見なされる。これは、エンベロープタンパク質において1つ以上の突然変異、欠失、もしくは挿入によって、またハイブリッドタンパク質を生成することによって達成され得、特異的エピトープは、抗F L抗体を作り出し得るいかなる抗原も用いることなく、骨格タンパク質に融合される。

【0112】

一実施形態では、エンベロープタンパク質は、NまたはO結合型グリカン配列を添加することによって、(ウイルスの内側に突出する)二量体の内部表面を改変し、それをより少ない免疫原性にするによって操作される。

10

【0113】

二量体に新しい表面をつける広範囲の変異原性は、残基の突然変異及び/またはグリカンの添加によって非E D準最適反応の生成をさらに低減するのに有用であり得る。

【0114】

一例として、L 278 F突然変異は、k 1ループを再形成し、ビリオン様の立体構造を模倣すると見なされる。

【0115】

コアE D Eエピトープのモデリング及び最適化はまた、所望のE D E反応を誘発するために最適な配列を生成し、結合抗体及び中和抗体を提供するためにも有用であり得る。

20

【0116】

E D Eが、増加した二量体の安定性に影響を及ぼす骨格内に保持される天然のエンベロープタンパク質であり得ることが理解されよう。E D Eはまた、いかなる骨格とも無関係に二量体の安定性を増加するように操作され得る。この2つは、一実施形態では、E D Eは、異種骨格タンパク質内に保持されたエンベロープタンパク質が二量体配置において改善された安定性を有するように操作される二量体を含むように組み合わせられ得る。あるいは、エンベロープタンパク質は、タンパク質の関連部分のみが存在するように操作され得、これが異種骨格タンパク質において保持され得る。

【0117】

二量体立体構造は、例えば、2つのエンベロープポリペプチドドメインを含む単一のポリペプチド鎖として表される2つのエンベロープ単量体間に、長いリンカー、例えばグリシン-セリンリッチなライナーを作製することによって安定化させてもよい。あるいはまたは加えて、二量体構造は、二量体の内部に面する表面または二量体と関連するタグに結合する任意の抗体(例えば)によって安定化させてもよい。

30

【0118】

エンベロープタンパク質、s E、s E二量体、またはエンベロープタンパク質二量体への任意の言及はまた、その範囲内に、骨格タンパク質または構造も含み、E D Eを作製し、適当なE D Eを示すために、特定の立体構造において保持される特定の残基を含む。

【0119】

エンベロープヌクレオチド配列は、このエンベロープタンパク質が突然変異、挿入、または欠失のうちのいずれか1つ以上を有するように操作され得る。ヌクレオチド配列は、特定のエンベロープタンパク質(またはその部分)の天然配列に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%相同性を有するようなものであり得る。

40

【0120】

さらなる実施形態では、エンベロープタンパク質は、別の血清型の Dengue 熱ウイルスからのエンベロープタンパク質(またはその部分(複数を含む)、例えば、少なくとも8、9、または10の連続的なアミノ酸のうち1つ以上の部分)に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%相同性を有するように操作され得る。好ましい実施形態では、エンベロープタンパク質は、すべての血清型の Dengue 熱

50

ウイルスからの2つの異なるエンベロープタンパク質（またはその部分（複数を含む）、例えば、少なくとも8、9、または10の連続的なアミノ酸のうちの一つ以上の部分）、より好ましくは4つの異なるエンベロープタンパク質（またはその部分（複数を含む）、例えば、少なくとも8、9、または10の連続的なアミノ酸のうちの一つ以上の部分）、最も好ましくはすべてのエンベロープタンパク質（またはその部分（複数を含む）、例えば、少なくとも8、9、または10の連続的なアミノ酸のうちの一つ以上の部分）に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%相同性を有するように操作され得る。

【0121】

上記のように、エンベロープタンパク質は、実際には、天然エンベロープタンパク質に対して非常に低い相同性を有するように操作され得るが、EDEの完全性及び立体構造が維持されるか、またはEDEが改善される、例えば、抗FL抗体を育てることができないような方法で改変される。それ故に、配列相同性のレベルは、必ずしも、3D構造相同性または機能的相同性を表示しない。例えば、EDEを含む構造をコードする特定の配列は、実際には、天然エンベロープタンパク質に対して非常に低いレベルの相同性を有し得るが、それでもなお、本発明の有用な化合物と見なされ得る。例えば、タンパク質は、天然エンベロープタンパク質に対して10%、20%、30%、40%、50%、または60%相同性を有し得、この構造をコードするヌクレオチド配列は、天然エンベロープ配列に対応して低い配列同一性を有し得る。

【0122】

好ましい実施形態では、EDEを含むエンベロープタンパク質または構造は、デング熱ウイルスエンベロープタンパク質（またはその部分（複数を含む）、例えば、少なくとも8、9、または10の連続的なアミノ酸のうちの一つ以上の部分）に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%相同性、またはすべての血清型のデング熱ウイルスからの2つの異なるエンベロープタンパク質（またはその部分（複数を含む）、例えば、少なくとも8、9、または10の連続的なアミノ酸のうちの一つ以上の部分）、より好ましくは4つの異なるエンベロープタンパク質、最も好ましくはすべてのエンベロープタンパク質に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%相同性を有するか、またはEDEを含むタンパク質または構造は、1種以上の血清型のデング熱ウイルスの天然エンベロープタンパク質に対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、または60%相同性を有し、このタンパク質は、E49、K64、Q77、W101、V122、N134、N153、T155、I161、A162、P169、T200、K202、E203、L308、K310、Q323、W391、F392、またはデング熱ウイルスエンベロープタンパク質の同等残基のうちの一つ以上、または任意にこれらのすべてを含む。

【0123】

これらの残基のいくつかは、その他よりも重要であると見なされ、したがって、EDEのさらなる実施形態では、EDEを含むエンベロープタンパク質または構造は、Q77、W101、N153、T155、K310、またはデング熱ウイルスエンベロープタンパク質の同等残基のうちの一つ以上、または任意にこれらのすべてを含む。

【0124】

エンベロープタンパク質の残基E49、K64、Q77、W101、V122、N134、N153、T155、I161、A162、P169、T200、K202、E203、L308、K310、Q323、W391、F392、またはデング熱ウイルスタンパク質の同等残基は、EDEへの化合物の結合に必要とされると見なされる。それ故に、一実施形態では、EDEを含むエンベロープタンパク質または構造は、これらの残基のうちの一つ以上、またはこれらの全てを含む。

【0125】

抗FL抗体は、ほとんどの場合、アラニン走査分析において突然変異した残基の中から残基W101のみを必要とするように思われ（実施例2）、他の残基のうちの一つ以上の

10

20

30

40

50

突然変異によって影響を受けないが、一方、抗E D E抗体は、はるかに大きなエピトープを必要とし、抗F L抗体が必要とするように残基W 1 0 1の存在を必要とするが、多くの他の残基での突然変異によって影響を受ける。したがって、一実施形態では、E D Eは、エンベロープ二量体エピトープにおいて残基W 1 0 1及び位置E 4 9、K 6 4、Q 7 7、W 1 0 1、V 1 2 2、N 1 3 4、N 1 5 3、T 1 5 5、I 1 6 1、A 1 6 2、P 1 6 9、T 2 0 0、K 2 0 2、E 2 0 3、L 3 0 8、K 3 1 0、Q 3 2 3、W 3 9 1、F 3 9 2、または同等残基のうちの少なくとも1つ以上が本化合物の結合に必要である、エピトープとして定義される。

【0126】

特定の一実施形態では、エンベロープ二量体エピトープは、ドメインI I Iの残基K 3 1 0を含む。

10

【0127】

一実施形態では、E D Eは、例えば、各エンベロープ、例えば、s E、単量体の位置6 7 (A s n 6 7グリカン)で及び/または位置1 5 3 (A s n 1 5 3グリカン)で、好ましくは各単量体の少なくとも位置6 7 (A s n 6 7グリカン)でグリコシル化される。

【0128】

ある実施形態に従って、本発明の化合物は、エンベロープタンパク質二量体のN 6 7グリカン鎖またはエンベロープタンパク質二量体のN 1 5 3グリカン鎖に接触する。本化合物は、エンベロープタンパク質二量体のN 6 7及びN 1 5 3グリカン鎖の両方に接触することができるものと理解されよう。

20

【0129】

特定の例では、本化合物は、C D R H 2がエンベロープタンパク質のN 6 7グリカン鎖と相互作用する抗体である。

【0130】

一実施形態では、本化合物は、1種以上の血清型のデング熱ウイルス、存在する場合、好ましくはすべての血清型のデング熱ウイルスエンベロープタンパク質、例えば、D E N V - 2またはD E N V - 4におけるA 7 1、C 1 0 5、C 7 4、D 1 5 4、D 2 4 9、D 2 7 1、D 3 0 9、D 3 6 2、D 9 8、E 1 4 8、E 3 1 1、E 4 4、E 7 1、E 8 4、G 1 0 2、G 1 0 4 G 1 0 6、G 1 5 2、G 1 5 6、G 2 8、G 2 9、G 3 7 4、H 1 5 8、H 2 7、I 1 1 3、I 3 0 8、I 4 6、K 2 4 6、K 2 4 7、K 3 1 0、K 3 2 3、K 3 2 5 K 4 7、L 1 1 3、L 4 5、L 8 2、M 2 7 8、N 1 0 3、N 1 5 3、N 3 6 2、N 6 7、N 8 3、Q 2 4 8、Q 2 7 1、Q 3 2 5、Q 7 7、R 2、R 2 4 7、R 3 2 3、R 7 3、R 9 9、S 7 2、S 8 1、T 1 1 5、T 1 5 5、T 3 6 1、T 4 6、T 6 8、T 6 9、T 7 0、T 7 2、V 1 1 3、V 1 1 4、V 2 5 0、V 3 0 9 V 3 2 4、V 9 7、W 1 0 1のうちの任意の1つ以上でE D Eに接触する。

30

【0131】

一実施形態では、エンベロープ二量体エピトープは、ドメインI I側上のbストランド、及び(二量体界面の向かいにある)ドメインI側上の「1 5 0ループ」(例えば、図2 9を参照のこと)によって形成されたくぼみの中心に置かれた領域を含み、1 5 0ループが残基1 4 8 ~ 1 5 9に広がり、ドメインIのbストランドE 0及びF 0を接続し、N 1 5 3グリカンを担持し、これは二量体におけるパートナーサブユニットの融合ループを覆う。1 5 0ループは、配列番号1 4 8の1 5 0ループのD e n v - 1 Q H Q V G N E T T E H G、配列番号1 1 4 9の1 5 0ループのD e n v 2 E H A V G N D T G K H G、配列番号1 5 0の1 5 0ループのD e n v 3 Q H Q V G N E T Q G、配列番号1 5 1の1 5 0ループのD e n v 4 T H A V G N D I P N H Gを含むと見なされる。

40

【0132】

場合によっては、エンベロープ二量体エピトープは、ドメインI Iのエンベロープタンパク質を含み、任意に、ドメインI Iの以下の特性、b鎖(残基6 7 ~ 7 4)、すぐ上流の融合ループ及び残基(残基9 7 ~ 1 0 6)、ならびにi jループ(残基2 4 6 ~ 2 4 9)、ならびに残基2 4 3 ~ 2 5 1及び残基3 0 7 ~ 3 1 4のうちの任意の1つ以上をさら

50

に含む。

【0133】

一実施形態では、EDEは、残基67~74、残基97~106、残基148~159、残基243~251、及び残基307~314からなる5つのポリペプチドセグメントのデング熱ウイルス糖タンパク質E外部ドメイン(sE)を含む。

【0134】

それ故に、一実施形態では、本発明はまた、化合物、例えば、上に定義される安定化組換えsE二量体に対する単離中和抗体またはその抗原結合断片も提供し、当該抗体またはその断片は、残基67~74、残基97~106、残基148-159、残基243~251、及び残基307~314からなる5つのポリペプチドセグメントのデング熱ウイルス糖タンパク質E外部ドメイン(sE)に結合する。

10

【0135】

ポリペプチドセグメントまたはアミノ酸残基に対する本発明に従うその抗体断片の結合の特徴付けは、例えば、以下の実施例に記載される結晶化試験によって行われ得る。

【0136】

好ましくは、EDEへの結合に加えて、本化合物は、ウイルスを中和することができる。好ましい実施形態では、本化合物は、すべての血清型のデング熱ウイルスを、好ましくは少なくとも90%または少なくとも98%、例えば100%中和することができ、好ましくは昆虫細胞及びヒト細胞の両方で作られるすべての血清型のデング熱ウイルスを少なくとも90%または少なくとも98%、例えば100%中和する。中和反応及び中和アッセイ技術についての選好は、前述された通りである。

20

【0137】

一実施形態では、EDEは、完全長エンベロープタンパク質の二量体を含む。別の実施形態では、EDEは、エンベロープ外部ドメイン(sE)の二量体を含む。さらなる実施形態では、エンベロープタンパク質は、エンベロープタンパク質の外部ドメインの(上で論じられるように、約)400のアミノ末端残基を含む。例えば、図28を参照のこと。上記の完全長エンベロープタンパク質の二量体の安定性についての選好はまた、エンベロープタンパク質の切断型外部ドメインにも適用する。したがって、エンベロープタンパク質の外部ドメインの二量体は、操作を通して安定化され得るか、または骨格タンパク質に組み込むことによって安定化され得るか、またはハイブリッド二量体を含み得る。

30

【0138】

さらなる実施形態では、本発明の化合物は、酸性pHでインキュベートされる、デング熱ウイルスまたはビリオンまたはサブウイルス粒子またはウイルス様粒子に結合しないであろうものである。酸性pHは、エンベロープタンパク質が三量体配置を不可逆的に導入するようにする。本発明者らは、本発明の化合物が低いpHでウイルス粒子に結合しないことを見出した(実施例4を参照のこと)。したがって、一実施形態では、化合物、例えば、抗体またはその抗原結合部分は、酸性pHでインキュベートされる、デング熱ウイルスまたはビリオンまたはサブウイルス粒子またはウイルス様粒子に結合しない。酸性pHとは、7より低い任意のpH、好ましくはpH5.5を意味する。

【0139】

したがって、当業者は、特定の化合物が本発明のこの実施形態に従う本発明の化合物であるかどうか、本化合物が、a) フリン活性を欠いている細胞で作られるビリオンもしくはサブウイルス粒子もしくはウイルス様粒子、b) 高い割合のp r Mタンパク質を有するビリオンもしくはサブウイルス粒子もしくはウイルス様粒子、及び/またはc) 酸性条件下でインキュベートされるビリオンもしくはサブウイルス粒子もしくはウイルス様粒子、のうちの1つ以上に結合することができないかどうかを単に特定することによって容易に特定することができる。

40

【0140】

上述のビリオン、サブウイルス粒子、またはウイルス様粒子に対する本化合物の結合能力をアッセイするための方法は、EDEに結合する本化合物の能力をアッセイすることに

50

関しては前述に提供され、実施例 4 に詳述されており、概して、本化合物が結合することができるかどうかをアッセイするために、特定のビリオンまたはウイルス様粒子に対して E L I S A を単に含む。本化合物は、天然 E D E またはビリオンまたはウイルス様粒子に結合するか、または有意に結合する場合、ならびに a) フリン活性を欠いている細胞で作られる、b) 高い割合の p r M タンパク質を有する、及び / または c) 酸性条件下でインキュベートされる、ビリオンまたはサブウイルス粒子またはウイルス様粒子に結合しない場合、有用であると見なされる。

【 0 1 4 1 】

本発明は、特定の化合物をさらに含む。例えば、一実施形態では、本化合物は、重鎖配列番号 1 及び軽鎖配列番号 3 7、重鎖配列番号 2 及び軽鎖配列番号 3 8、重鎖配列番号 3 及び軽鎖配列番号 3 9、または重鎖配列番号 4 及び軽鎖配列番号 4 0 の配列を含む抗体である。本発明はまた、これらの抗体の切断及び突然変異も含み、そのため、本化合物はその抗原結合部分であることが理解されよう。上記の配列に対して少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % 相同性の配列相同性を有する抗体は、本発明に含まれる。抗体の特定の配列である軽鎖及び重鎖は、配列番号 1 ~ 4、3 7 ~ 1 4 1、1 4 1 ~ 1 4 7、例えば、図 2 9 に与えられる。

【 0 1 4 2 】

さらなる実施形態では、本化合物は抗体であり、重鎖配列番号 1 と軽鎖配列番号 3 7、3 8、3 9、もしくは 4 0 のいずれか、重鎖配列番号 2 と軽鎖配列番号 3 7、3 8、3 9、もしくは 4 0 のいずれか、重鎖配列番号 3 と軽鎖配列番号 3 7、3 8、3 9、もしくは 4 0 のいずれか、または重鎖配列番号 4 と軽鎖配列番号 3 7、3 8、3 9、もしくは 4 0 のいずれかを含む。

【 0 1 4 3 】

具体的な重鎖及び軽鎖の特定の残基は、E D E に結合するために重要であると見なされる。それ故に、一実施形態では、配列相同性が上の配列に対して少なくとも 9 0 % である場合、存在する場合、以下の残基は、

配列番号 1 - T 5 2、E 5 4、D 5 6、S 5 7、A 5 8、K 6 5、G 6 6、T 6 9、E 8 2、N 8 4、S 8 5、Y 1 0 0、N 1 0 2、F 1 0 3、Y 1 0 4、Y 1 0 5、Y 1 0 6、

配列番号 2 - G 5 5 4、N 5 5、N 5 7、K 5 9、Q 6 2、Q 6 5、G 6 6、R 9 4、R 9 8、F 9 9、Y 1 0 0、Y 1 0 1、D 1 0 2、S 1 0 3、T 1 0 4、Y 1 0 6、Y 1 0 7、P 1 0 8、D 1 0 9、S 1 1 0、D 1 1 7、V 1 1 8、

配列番号 3 - V 2、S 2 8、N 3 1、D 5 4、S 5 6、T 5 7、R 5 8、K 6 5、G 6 6、R 9 4、R 9 8、F 9 9、Y 1 0 0、Y 1 0 1、D 1 0 2、S 1 0 3、T 1 0 4、Y 1 0 6、Y 1 0 7、P 1 0 8、D 1 0 9、S 1 1 0、D 1 1 7、V 1 1 8、

配列番号 4 - V 2、T 2 8、S 3 1、D 5 4、S 5 6、S 5 7、T 5 8、G 6 6、F 6 8、M 6 9、R 9 4、R 9 8、Y 9 9、Y 1 0 0、Y 1 0 1、D 1 0 2、S 1 0 3、T 1 0 4、Y 1 0 6、Y 1 0 7、P 1 0 8、D 1 0 9、N 1 1 0、D 1 1 7、V 1 1 8、

配列番号 3 7 - S 3 0、T 3 1、F 3 2、Y 4 9、D 5 0、S 5 2、R 5 4、R 6 6、R 9 1、Y 9 2、N 9 3、W 9 4、

配列番号 3 8 - S 2 6、S 2 7、G 3 0、G 3 1、F 3 2、N 3 3、Y 3 4、D 5 2、T 5 4、S 5 5、R 5 6、S 6 2、S 9 5、R 9 6、G 9 7、

配列番号 3 9 - Y 5 1、R 5 6、P 5 7、S 5 8、G 5 9、S 9 6、R 9 7、

配列番号 4 0 - Y 5 1、R 5 6、P 5 7、S 5 8、K 9 7 である。

【 0 1 4 4 】

抗体は、軽鎖及び重鎖から成り、各軽鎖及び重鎖内には、3 つの可変領域がある。これらの領域のそれぞれの最も可変の部分は、相補性決定領域であり、抗原結合及び認識には最も不可欠であると見なされる。したがって、一実施形態では、本化合物は、以下のアミノ酸置換、挿入、または欠失を有さない、1 つまたは 2 つアミノ酸置換、挿入、または欠失を有する以下のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上を含む：

配列番号 5 もしくは配列番号 8 もしくは配列番号 11 もしくは配列番号 14
 及び / または
 配列番号 6 もしくは配列番号 9 もしくは配列番号 12 もしくは配列番号 15
 及び / または
 配列番号 7 もしくは配列番号 10 もしくは配列番号 13 もしくは配列番号 16
 及び / または
 配列番号 17 もしくは配列番号 20 もしくは配列番号 23 もしくは配列番号 26
 及び / または
 配列番号 18 もしくは配列番号 21 もしくは配列番号 24 もしくは配列番号 27
 及び / または
 配列番号 19 もしくは配列番号 22 もしくは配列番号 25 もしくは配列番号 28。

10

【0145】

特定の化合物は、アミノ酸置換、挿入、または欠失を有さない、1つまたは2つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有する以下の配列を含んでもよい。

重鎖：

配列番号 5 及び配列番号 6 及び配列番号 7
 または
 配列番号 8 及び配列番号 9 及び配列番号 10
 または
 配列番号 11 及び配列番号 12 及び配列番号 13
 または
 配列番号 14 及び配列番号 15 及び配列番号 16
 ならびに / あるいは

20

軽鎖：

配列番号 17 及び配列番号 18 及び配列番号 19
 または
 配列番号 20 及び配列番号 21 及び配列番号 22
 または
 配列番号 23 及び配列番号 24 及び配列番号 25
 または
 配列番号 26 及び配列番号 27 及び配列番号 28。

30

【0146】

好ましい実施形態では、特定の化合物は、アミノ酸置換、挿入、または欠失を有さない、1つまたは2つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有する以下の配列を含んでもよい。

重鎖配列番号 5 及び配列番号 6 及び配列番号 7 と軽鎖配列番号 17 及び配列番号 18 及び配列番号 19

または

重鎖配列番号 8 及び配列番号 9 及び配列番号 10 と軽鎖配列番号 20 及び配列番号 21 及び配列番号 22

40

または

重鎖配列番号 11 及び配列番号 12 及び配列番号 13 と軽鎖配列番号 23 及び配列番号 24 及び配列番号 25

または

重鎖配列番号 14 及び配列番号 15 及び配列番号 16 と軽鎖配列番号 26 及び配列番号 27 及び配列番号 28

または

重鎖配列番号 11、12、及び 13 と、任意に軽鎖配列番号 25、任意にアミノ酸配列の配列番号 23 及び 24

または

50

重鎖配列番号 14、15、及び 16 と、任意に軽鎖配列番号 28、任意にアミノ酸配列の配列番号 26 及び 27

または

重鎖配列番号 3 と、任意に軽鎖配列番号 25、好ましくは配列番号 140 の軽鎖可変領域

または

配列番号 4 の重鎖可変領域と、任意に軽鎖配列番号 28、好ましくは配列番号 141 の軽鎖可変領域。

【0147】

さらなる実施形態では、上の配列の特定の残基は、抗原結合に重要であると見なされる。したがって、この実施形態では、存在する場合、以下の残基は、

配列番号 6 の残基 3 が T であり、残基 5 が E であり、残基 7 が D であり、残基 8 が S であり、残基 9 が A であり、残基 16 が K であり、残基 17 が G であり、

配列番号 7 の残基 2 が Y であり、残基 4 が N であり、残基 5 が F であり、残基 6 が Y であり、残基 7 が Y であり、残基 8 が Y であり、

配列番号 9 の残基 5 が G であり、残基 6 が N であり、残基 10 が K であり、残基 13 が Q であり、残基 16 が Q であり、残基 17 が D であり、

配列番号 10 の残基 5 が D であり、残基 6 が Y であり、残基 8 が D であり、残基 10 が W であり、残基 11 が F であり、残基 12 が P であり、残基 14 が L であり、

配列番号 11 の残基 1 が N であり、

配列番号 12 の残基 5 が D であり、残基 7 が S であり、残基 8 が T であり、残基 9 が R であり、残基 16 が K であり、残基 17 が G であり、

配列番号 13 の残基 4 が R であり、残基 5 が F であり、残基 6 が Y であり、残基 7 が Y であり、残基 8 が D であり、残基 9 が S であり、残基 10 が T であり、残基 12 が Y であり、残基 13 が Y であり、残基 14 が P であり、残基 15 が D であり、残基 16 が S であり、

配列番号 14 の残基 1 が S であり、

配列番号 15 の残基 5 が D であり、残基 7 が S であり、残基 8 が S であり、残基 9 が T であり、残基 17 が G または H であり、

配列番号 16 の残基 4 が R であり、残基 5 が Y であり、残基 6 が Y であり、残基 7 が Y であり、残基 8 が D であり、残基 9 が S であり、残基 10 が T であり、残基 12 が Y であり、残基 13 が Y であり、残基 14 が P であり、残基 15 が D であり、残基 16 が N であり、

配列番号 17 の残基 7 が S であり、残基 8 が T であり、残基 9 が F であり、

配列番号 18 の残基 1 が D であり、残基 3 が S であり、残基 5 が R であり、

配列番号 19 の残基 3 が R であり、残基 4 が Y であり、残基 5 が N であり、

配列番号 20 の残基 4 が S であり、残基 5 が S であり、残基 8 が G であり、残基 9 が G であり、残基 10 が F であり、残基 11 が N であり、残基 12 が Y であり、

配列番号 21 の残基 1 が D であり、残基 3 が T であり、残基 4 が S であり、残基 5 が R であり、

配列番号 22 の残基 5 が S であり、残基 6 が R であり、残基 7 が G であり、

配列番号 24 の残基 5 が R であり、残基 6 が P であり、残基 7 が S であり、

配列番号 25 の残基 6 が S であり、残基 7 が R であり、

配列番号 27 の残基 5 が R であり、残基 6 が P であり、残基 7 が S である。

【0148】

タンパク質骨格における抗原性 E D E の提示に関して上述のように、本化合物、例えばタンパク質、例えば抗体はまた、例えばタンパク質骨格内に保持される、より大きな構造の一部であってもよい。この骨格についての選好は、前述された通りである。例えば、一実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、より大きなポリペプチド内にある。

【0149】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態では、上の実施形態のうちのいずれかに記載のEDEに結合する化合物はまた、デング熱ウイルスを、好ましくは少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%または98%、及び最も好ましくは100%中和する。さらに好ましい実施形態では、本化合物は、すべての血清型のデング熱ウイルスを、少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%または98%、及び最も好ましくは100%中和する。化合物、ウイルスまたはサブウイルスまたはウイルス様粒子、及び宿主細胞の濃度を含む、中和反応についての選好は、本発明の第1の態様では、前述された通りである。

【0150】

本発明の第1の態様に関しては、EDEに結合することができる化合物が、昆虫細胞、例えばC6/36昆虫細胞、及びヒト細胞、例えば初代ヒト細胞、例えば樹状細胞の両方で作られるウイルスを中和することができる場合、好ましい。好ましくは、本化合物は、上で論じられるように、昆虫細胞、例えばC6/36昆虫細胞、及びヒト細胞、例えば初代ヒト細胞、例えば樹状細胞の両方で作られるデング熱ウイルスを、同じレベルまで中和する。化合物のウイルスを中和する能力は、上述のように、実施例において試験することができる。最も好ましい実施形態では、本化合物は、昆虫細胞及びヒト細胞の両方で作られるすべての血清型のデング熱ウイルスを完全に（すなわち100%）中和することができる。

10

【0151】

好ましい実施形態では、本化合物は、抗体またはその抗原結合部分である。抗原結合部分は、Fv部分、Fab様断片（例えば、Fab断片、Fab'断片、またはF(ab)₂断片）、またはドメイン抗体であってもよい。

20

【0152】

一実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、モノクローナル抗体であるか、または、モノクローナル抗体由来である。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、ポリクローナル抗体であるか、または、ポリクローナル抗体由来である。さらなる実施形態では、本化合物は、

a) モノクローナル抗体もしくはその抗原結合部分の混合物、

b) ポリクローナル抗体もしくはその抗原結合部分の混合物、または

c) モノクローナル及びポリクローナル抗体もしくはその抗原結合部分の混合物、例えば、モノクローナル抗体対ポリクローナル抗体もしくはその抗原結合部分の比率は、10:1、8:1、6:1、4:1、2:1、1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、または1:10である、抗体またはその抗原結合部分の混合物を含む組成物である。

30

【0153】

本化合物は、組換えタンパク質、例えば、組換え抗体またはその抗原結合部分であってもよいことが理解されよう。本化合物はまた、合成的に作製されてもよい。本化合物は、組換え的及び合成的に産生された組み合わせであってもよい。

【0154】

本発明はまた、かかる化合物、例えばタンパク質、例えば、抗体またはその抗原結合部分を作製する手段も含む。

40

【0155】

したがって、本化合物が組換え手段によって産生され得る、例えば本化合物、例えばポリペプチド、例えば、抗体またはその抗原結合部分が、

a) ヒト細胞株、任意にCHO細胞、または

b) 哺乳動物、任意にヒト、または

c) 微生物、または

d) 昆虫細胞株、を含む、様々な生物から産生及び単離または精製され得ることも理解されよう。

【0156】

単離または精製されるとは、この薬剤は、その自然環境から除去され、この薬剤が精製

50

される程度に反映しないことを意味する。

【0157】

したがって、本発明は、ヒト細胞株、任意にCHO細胞、または哺乳動物、任意にヒト、または微生物、または昆虫細胞株を含む、様々な生物からの本発明の化合物の単離または精製を含む。

【0158】

本化合物が、ポリペプチド、例えば、抗体またはその抗原結合部分であるか、または例えば、タンパク質骨格に含まれる場合には、この化合物は、核酸によってコードされてもよい。核酸とは、一本または二本鎖の及びすべてのそれらの様々な形態でDNA及びRNAの両方の意味を含む。したがって、本発明は、本発明のタンパク質性化合物のうちのいずれかをコードする核酸を含む。具体的には、配列番号41～48が本発明に含まれる。前に言及した可能性のうちのいずれかを網羅する配列、例えば、以下のうちのいずれかをコードする一部分を含む核酸配列であるような、サイレント突然変異をもたらし得る突然変異由来のまたはそれを含む配列番号41～48を含む任意の配列が含まれる：

配列番号1、または配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

配列番号2、または配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

配列番号3、または配列番号3に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

配列番号4、または配列番号4に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

配列番号37、または配列番号37に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

配列番号38、または配列番号38に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

配列番号39、または配列番号39に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

配列番号40、または配列番号40に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

残基がT52、E54、D56、S57、A58、K65、G66、T69、E82、N84、S85、Y100、N102、F103、Y104、Y105、Y106である、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

残基がG554、N55、N57、K59、Q62、Q65、G66、R94、R98、F99、Y100、Y101、D102、S103、T104、Y106、Y107、P108、D109、S110、D117、V118である、配列番号2に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

残基がV2、S28、N31、D54、S56、T57、R58、K65、G66、R94、R98、F99、Y100、Y101、D102、S103、T104、Y106、Y107、P108、D109、S110、D117、V118である、配列番号3に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

残基がV2、T28、S31、D54、S56、S57、T58、G66、F68、M69、R94、R98、Y99、Y100、Y101、D102、S103、T104、Y106、Y107、P108、D109、N110、D117、V118である、配列番号4に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

残基がS30、T31、F32、Y49、D50、S52、R54、R66、R91、Y92、N93、W94である、配列番号37に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

残基がS26、S27、G30、G31、F32、N33、Y34、D52、T54、S55、R56、S62、S95、R96、G97である、配列番号38に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

残基がY51、R56、P57、S58、G59、S96、R97である、配列番号39に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

残基がY51、R56、P57、S58、K97である、配列番号40に対して少なくとも90%の同一性を有する配列、

配列番号5、または配列番号5と比較して1つまたは2つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらし配列、

配列番号6、または任意に、残基3がTであり、残基5がEであり、残基7がDであり

10

20

30

40

50

、残基 8 が S であり、残基 9 が A であり、残基 16 が K であり、残基 17 が G である、配列番号 6 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 7、または任意に、残基 2 が Y であり、残基 4 が N であり、残基 5 が F であり、残基 6 が Y であり、残基 7 が Y であり、残基 8 が Y である、配列番号 7 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 8、または配列番号 8 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 9、または任意に、残基 5 が G であり、残基 6 が N であり、残基 10 が K であり、残基 13 が Q であり、残基 16 が Q であり、残基 17 が D である、配列番号 9 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

10

配列番号 10、または任意に、残基 5 が D であり、残基 6 が Y であり、残基 8 が D であり、残基 10 が W であり、残基 11 が F であり、残基 12 が P であり、残基 14 が L である、配列番号 10 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 11、または任意に、残基 1 が N である、配列番号 11 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 12、または任意に、残基 5 が D であり、残基 7 が S であり、残基 8 が T であり、残基 9 が R であり、残基 16 が K であり、残基 17 が G である、配列番号 12 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

20

配列番号 13、または任意に、残基 4 が R であり、残基 5 が F であり、残基 6 が Y であり、残基 7 が Y であり、残基 8 が D であり、残基 9 が S であり、残基 10 が T であり、残基 12 が Y であり、残基 13 が Y であり、残基 14 が P であり、残基 15 が D であり、残基 16 が S である、配列番号 13 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 14、または任意に、残基 1 が S である、配列番号 14 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 15、または任意に、残基 5 が D であり、残基 7 が S であり、残基 8 が S であり、残基 9 が T であり、残基 17 が G または H である、配列番号 15 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

30

配列番号 16、または任意に、残基 4 が R であり、残基 5 が Y であり、残基 6 が Y であり、残基 7 が Y であり、残基 8 が D であり、残基 9 が S であり、残基 10 が T であり、残基 12 が Y であり、残基 13 が Y であり、残基 14 が P であり、残基 15 が D であり、残基 16 が N である、配列番号 16 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 17、または任意に、残基 7 が S であり、残基 8 が T であり、残基 9 が F である、配列番号 17 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

40

配列番号 18、または任意に、残基 1 が D であり、残基 3 が S であり、残基 5 が R である、配列番号 18 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 19、または任意に、残基 3 が R であり、残基 4 が Y であり、残基 5 が N である、配列番号 19 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 20、または任意に、残基 4 が S であり、残基 5 が S であり、残基 8 が G であり、残基 9 が G であり、残基 10 が F であり、残基 11 が N であり、残基 12 が Y である、配列番号 20 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

50

配列番号 2 1、または任意に、残基 1 が D であり、残基 3 が T であり、残基 4 が S であり、残基 5 が R である、配列番号 2 1 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 2 2、または任意に、残基 5 が S であり、残基 6 が R であり、残基 7 が G である、配列番号 2 2 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 2 3、または配列番号 2 3 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 2 4、または任意に、残基 5 が R であり、残基 6 が P であり、残基 7 が S である、配列番号 2 4 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 2 5、または任意に、残基 6 が S であり、残基 7 が R である、配列番号 2 5 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 2 6、または配列番号 2 6 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

配列番号 2 7、または任意に、残基 5 が R であり、残基 6 が P であり、残基 7 が S である、配列番号 2 7 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列、

ならびに

配列番号 2 8、または配列番号 2 8 と比較して 1 つまたは 2 つのアミノ酸置換、挿入、または欠失を有するポリペプチドをもたらす配列。

【 0 1 5 9 】

核酸は、イントロンを含んでも、含まなくてもよい。核酸はまた、その後の翻訳ポリペプチドの精製を可能にするために修飾されてもよく、例えば、目的とするポリペプチドのオープンリーディングフレームは、その後の精製を可能にするためにタグ、例えば m y c タグまたは h i s タグを組み込むように修飾されてもよい。

【 0 1 6 0 】

核酸はまた、例えば、最終ポリペプチド配列に影響を及ぼすことなく、翻訳されるべき生物によってより良好に翻訳されるように最適化されたコドンに修飾されてもよい。

【 0 1 6 1 】

本開示の核酸は、当業者に周知の多くの方法、例えば、古典的な変異誘発、化学的処理、制限消化、ライゲーション、及び P C R を用いて産生または修飾され得る。

【 0 1 6 2 】

本発明の核酸は、ベクターに組み込まれてもよい。それ故に、本発明はまた、核酸を含むベクターを含んでもよい。ベクターとは、核酸の増幅のクローニングのための、または標的生物への挿入のためのビヒクルを意味し、例えば、ベクターは、標的生物に、例えば標的生物のゲノムに本発明の核酸を標的とするために使用される、プラスミドであっても、核酸であってもよい。ベクターは、本発明の核酸によってコードされるポリペプチドの発現のために必要とされるヌクレオチド配列をさらに含んでもよく、例えば、プロモーター配列または終止配列は、本発明の核酸に動作可能に連結されてもよく、レポーター遺伝子、例えば抗生物質抵抗性カセットを含んでもよい。ベクターは、一本鎖であっても、二本鎖であってもよく、線状であっても、環状であってもよい。一実施形態では、ベクターはプラスミドである。

【 0 1 6 3 】

上述の E D E に結合することができる化合物を提供することに加えて、本発明のさらなる態様はまた、以下に定義される E D E 化合物を提供する。本発明はまた、核酸またはベクターを含む宿主細胞に加えて、本発明の E D E 化合物をコードする核酸またはベクターを提供する。例えば、上述の核酸及びベクターについての選好はまた、当業者には明らかであるような、本発明の本態様に関連してもよい。それ故に、本発明は、以下に定義され

10

20

30

40

50

る E D E 化合物、そのような E D E 化合物をコードする核酸、または当該核酸を含むベクター、または当該核酸もしくはベクターを含む宿主細胞を提供する。

【 0 1 6 4 】

E D E 化合物は、エンベロープ依存性エピトープとして上述のエピトープを提供するよう意図されている。E D E 化合物は、本発明の 1 つ以上の E D E に特異的な抗体、例えば、上で論じられるように、または実施例において例証されるように、好ましい中和抗体に特異的に結合してもよい。E D E 化合物は、典型的には、ポリペプチドであるか、またはポリペプチドを含む。一実施形態では、E D E 化合物は、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの 4 0 0 アミノ末端残基である。本明細書で使用される「4 0 0 アミノ末端残基」とは、約 4 0 0 アミノ末端残基、例えば、上述の及び当業者には明らかであろう、3 5 0 ~ 4 5 0 残基、3 2 0 ~ 4 7 0 残基、または 3 3 0 ~ 4 8 0 残基（もしくはその組み合わせ）、例えば 3 8 0 ~ 4 2 0 残基、例えば 3 9 0 ~ 4 1 0 残基、例えば 3 9 5 または 3 9 3 残基が含まれる。エンベロープタンパク質は、D E N V - 1、D E N V - 2、D E N V - 3 及び D E N V - 3、及び D E N V - 4、（配列番号 2 9、3 1、3 3、または 3 5）からのエンベロープタンパク質、または配列番号 2 9、3 1、3 3、または 3 5 の配列に少なくとも 9 0 % の相同性を有するタンパク質のうちのいずれかであってもよい。この二量体は、ホモ二量体またはヘテロ二量体であってもよい。好ましい実施形態では、この二量体は、無傷ウイルス粒子、またはサブウイルス粒子、またはウイルス様粒子に組み込まれないが、むしろ、例えば、単量体エンベロープポリペプチドの分子量の 2 倍の分子量を有する遊離二量体である。例えば、タンパク質骨格の一部として、本明細書に記載の E D E または E D E 化合物、例えば、操作されたエンベロープタンパク質のうちのいずれかの形態が、ウイルス、ウイルス様粒子、またはサブウイルス粒子の一部として潜在的に提示されてもよいことが理解されよう。

10

20

【 0 1 6 5 】

別の実施形態では、E D E 化合物は、二量体配置において増加した安定性を有するように操作されている、例えば、二量体間の共有及び/または非共有結合の増加したレベルを有するように操作されている、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの（約）4 0 0 アミノ末端残基を含む。

30

【 0 1 6 6 】

好ましい実施形態では、E D E 化合物は、本発明の上述の態様に従って、安定化組換え Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E 外部ドメイン（組換え s E）二量体であり、例えば、安定化組換え Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E 外部ドメイン（組換え s E）二量体であり、この二量体は、

- 2 つの s E 単量体間での少なくとも 1 つのジスルフィド鎖間結合によって共有結合的に安定化される、かつ/または

- 2 つの s E 単量体間での少なくとも 1 つのスルフィドリル反応性架橋剤によって共有結合的に安定化される、かつ/または

- 改変糖類を介して 2 つの s E 単量体を結合することによって共有結合的に安定化される、かつ/または

- 二量体界面でまたは各単量体のドメイン 1（D 1）/ドメイン 3（D 3）リンカーにおいて、少なくとも 1 つの s E 単量体のアミノ酸配列中の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を、少なくとも 1 つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって、非共有結合的に安定化される。

40

【 0 1 6 7 】

Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E 外部ドメイン（s E）は、Dengue 熱ウイルスの血清型 1、2、及び 4 のエンベロープ糖タンパク質 E の 1 ~ 3 9 5 のアミノ酸断片、及び Dengue 熱ウイルスの血清型 3 のエンベロープ糖タンパク質 E の 1 ~ 3 9 3 のアミノ酸断片を指す。

50

【 0 1 6 8 】

それ故に、上述の、E D E化合物は、安定化二量体であり、

- a) 単量体が、配列番号132のDENV-1 s E、配列番号133のDENV-2 s E、配列番号134のDENV-3 s E、配列番号135のDENV-4 s E、
 ならびにH27F、H27W、L107C、F108C、H244F、H244W、S255C、A259C、T/S262C、T/A265C、L278F、L292F、L294N、A313C、及びT315Cの中から選択される少なくとも1つの突然変異(置換)を有するその突然変異体s Eからなる群から選択され、任意に、その当該突然変異体s EがQ227N、E174N、及びD329Nの中から選択される少なくとも1つの突然変異(置換)、好ましくは3つの突然変異Q227N、E174N、及びD329Nをさらに有する、二量体、 10
- b) 二量体が、上に定義される2つの同一の組換えs Eのホモ二量体、または上に定義される2つの異なる組換えs Eのヘテロ二量体であり得、この二量体が好ましくは、ホモ二量体であり、例えば、上に定義されるDENV-1 s EとDENV-2 s Eとのヘテロ二量体であり得る、二量体。それはまた、上に定義されるDENV-1 s Eのヘテロ二量体及びDENV-1 s Eの突然変異体s Eであり得、
- c) 各s E単量体の67位(A s n 67グリカン)及び/または153位(A s n 153グリカン)で、好ましくは各単量体の少なくとも67位(A s n 67グリカン)でグリコシル化される、二量体、
- d) 2つのs E単量体間での少なくとも1つ、2つ、または3つのジスルフィド鎖間結合によって共有結合的に安定化される、二量体、 20
- e) 上に定義される突然変異A259CまたはS255Cをそれぞれ有する突然変異体s Eのホモ二量体であり、これらの残基259Cまたは255Cがジスルフィド鎖間結合を介して一緒に結合している、二量体、
- f) 上に定義される突然変異A259Cを有する突然変異体s Eと、上に定義される突然変異S255Cを有する突然変異体s Eとのヘテロ二量体であり、残基259C及び255Cが、ジスルフィド鎖間結合を介して一緒に結合している、二量体、
- g) 上に定義される突然変異F108C及びT315Cをそれぞれ有する突然変異体s Eのホモ二量体、または上に定義される突然変異L107C及びA313Cをそれぞれ有する突然変異体s Eのホモ二量体であり、残基108C及び315Cまたは残基107C
 及び313Cが、ジスルフィド鎖間結合を介して一緒に結合している、二量体、 30
- h) 上に定義される突然変異F108C及びA313Cを有する突然変異体s Eと、上に定義される突然変異L107C及びT315Cを有する突然変異体s Eとのヘテロ二量体であり、残基108C及び313Cが、それぞれ、2つのs E単量体間でのジスルフィド鎖間結合を介して残基315C及び107Cに結合している、二量体、
- i) 上に定義される、突然変異A259C、F108C、及びT315Cをそれぞれ有する突然変異体s Eのホモ二量体、突然変異S255C、F108C、及びT315Cをそれぞれ有する突然変異体s Eのホモ二量体、突然変異A259C、L107C、及びA313Cをそれぞれ有する突然変異体s Eのホモ二量体、ならびに突然変異A255C、
 L107C、及びA313Cをそれぞれ有する突然変異体s Eのホモ二量体からなる群から
 選択され、残基259C、255C、108C、315C、107C、及び313Cが、それぞれ、ジスルフィド鎖間結合を介して残基259C、255C、315C、108C、
 313C、及び107Cに結合している、二量体、 40
- j) 上に定義される突然変異A259C、F108C、及びT315Cを有する突然変異体s Eと、上に定義される突然変異S255C、F108C、及びT315Cを有する突然変異体s Eとのヘテロ二量体であり、残基259C、108C、及び315Cが、それぞれ、ジスルフィド鎖間結合を介して残基255C、315C、及び108Cに結合している、二量体、
- k) 上に定義される突然変異S255C、L107C、及びA313Cを有する突然変異体s Eと、上に定義される突然変異A259C、L107C、及びA313Cを有する 50

突然変異体 s E とのヘテロ二量体であり、残基 2 5 5 C、1 0 7 C、及び 3 1 3 C が、それぞれ、ジスルフィド鎖間結合を介して残基 2 5 9 C、3 1 3 C、及び 1 0 7 C に結合している、二量体、

l) s E 単量体間での少なくとも 1 つ、2 つ、または 3 つのスルフィドリル反応性架橋剤 (チオール反応性架橋剤とも呼ばれる) によって共有結合的に安定化される、二量体、

m) 上に定義される突然変異 T / S 2 6 2 C または T / A 2 6 5 C をそれぞれ有する突然変異体 s E のホモ二量体であり、残基 2 6 2 C または 2 6 5 C が、スルフィドリル反応性架橋剤によって一緒に結合している、二量体、

n) 上に定義される突然変異 T / S 2 6 2 C を有する突然変異体 s E と、上に定義される突然変異 T / A 2 6 5 C を有する突然変異体 s E とのヘテロ二量体であり、残基 2 6 2 C 及び 2 6 5 C が、スルフィドリル反応性架橋剤によって一緒に結合している、二量体、

o) 突然変異体 s E のホモ二量体またはヘテロ二量体であり、s E のアミノ酸残基 1 ~ 9、2 5 ~ 3 0、2 3 8 ~ 2 8 2、9 6 ~ 1 1 1 3 1 1 ~ 3 1 8 のうちの少なくとも 1 つが、システインに突然変異し (置換され)、s E のアミノ酸残基 1 ~ 9、2 5 ~ 3 0、2 3 8 ~ 2 8 2、9 6 ~ 1 1 1 3 1 1 ~ 3 1 8 のうちの少なくとも 1 つが、システインに突然変異し (置換され)、突然変異したシステイン残基が、スルフィドリル反応性架橋剤によって一緒に結合している、二量体、

p) 改変糖類を介して 2 つの単量体に結合することによって共有結合的に安定化される、二量体。

q) 突然変異体 s E のホモ二量体またはヘテロ二量体であり、

- 一方の s E 単量体が、グリコシル化部位を導入する少なくとも 1 つの突然変異を有し、突然変異したアミノ酸残基が、X 官能基を担持する改変糖でグリコシル化され、もう一方の s E 単量体が、グリコシル化部位を導入する少なくとも 1 つの突然変異を有し、突然変異したアミノ酸残基が、Y 官能基を担持する改変糖でグリコシル化され、両方の突然変異した残基が、具体的にはクリック化学によって、第 1 の s E 単量体の糖の X 官能基をもう一方の s E 単量体の糖の Y 官能基と反応させることによって、改変糖類を介して一緒に結合している、二量体。X 官能基とは、Y 官能基と反応し、クリック化学によって共有結合を形成することができる糖によって担持される化学基を意味し、当該 Y 官能基は、好ましくはアジド官能基である。Y 官能基とは、X 官能基と反応し、クリック化学によって共有結合を形成することができる糖によって担持される化学基を意味し、当該 X 官能基は、好ましくは末端アルキン官能基である。

r) 二量体界面で二量体の空洞を充填させることによって、1 つまたは 2 つの単量体、好ましくは 2 つの単量体のアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸を、かさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって非共有結合的に安定化される、二量体、

s) 二量体界面でまたは各単量体のドメイン 1 (D 1) / ドメイン 3 (D 3) リンカーにおいて、空洞を形成する領域内で、少なくとも 1 つの s E 単量体のアミノ酸配列中の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を、少なくとも 1 つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって非共有結合的に安定化される。かかる置換が、2 つの s E 単量体間での疎水性相互作用を増加させることができる、二量体、

t) 上に定義される 2 つの組換え s E のホモ二量体またはヘテロ二量体、好ましくはホモ二量体であり、組換え s E のうちの 1 つまたは 2 つの組換え s E が、H 2 7 F、H 2 7 W、H 2 4 4 F、H 2 4 4 W、及び L 2 7 8 F からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異 (置換) を有する、二量体、

u) 各単量体のドメイン 1 (D 1) / ドメイン 3 (D 3) リンカーにおいて、1 つまたは 2 つの、好ましくは 2 つの単量体のアミノ酸配列中のアミノ酸を、少なくとも 1 つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって非共有結合的に安定化される、二量体、

v) 上に定義される 2 つの組換え s E のホモ二量体またはヘテロ二量体、好ましくはホモ二量体であり、組換え s E のうちの 1 つまたは 2 つの組換え s E が、L 2 9 2 F 及び L 2 9 4 N からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異 (置換) を有する、二量体、のうちの任意の 1 つ以上であり得る。

10

20

30

40

50

【0169】

さらに別の実施形態では、EDE化合物は、ウイルス、ウイルス様粒子、またはサブウイルス粒子内の天然に存在するエンベロープ二量体を超える改善されたエピトープを提示する。改善されたエピトープとは、無傷ウイルス粒子に天然に提示された改善されてあらゆるエピトープを超えるという意味を含む。改善されたとは、天然無傷 Dengue 熱ウイルス粒子よりもより有益な免疫反応を引き起こすことができるという意味を含む。例えば、上の a) ~ v) に記載される修飾を介して、二量体配置において増加した安定性を有する EDE 化合物は、改善されたエピトープであると見なされる。EDE は、他の方法により改善されてもよく、例えば、EDE 化合物は、FL が、それ自体で、化合物、例えばポリペプチド、例えば抗体またはその抗原部分によって認識されることができないように操作されているか、または骨格に挿入されている EDE であってもよく、例えば、EDE は、FL が、融合ループの直接的隣接からの単離において抗体によって認識することができない、すなわち誘導ループは、四次組織から独立している文脈において認識することができないように操作される。

10

【0170】

別の実施形態では、EDE 化合物は、例えば、上述の、二量体間での共有及び/または非共有結合のレベルを増加させることによって二量体配置を保存する異種タンパク質骨格に組み込まれる。さらに、VDE 化合物は、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400 アミノ末端残基の一部にのみ提示し得る異種タンパク質骨格を含んでもよく、この一部は、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400 アミノ末端残基の連続的な一部であるか、またはこの一部は、上述の、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400 アミノ末端残基の厳選した非連続的残基を含む。

20

【0171】

例えば、一実施形態では、EDE 化合物は、位置 E 49、K 64、Q 77、W 101、V 122、N 134、N 153、T 155、I 161、A 162、P 169、T 200、K 202、E 203、L 308、K 310、Q 323、W 391、F 392、A 71、C 105、C 74、D 154、D 249、D 271、D 309、D 362、D 98、E 148、E 311、E 44、E 71、E 84、G 102、G 104、G 106、G 152、G 156、G 28、G 29、G 374、H 158、H 27、I 113、I 308、I 46、K 246、K 247、K 310、K 323、K 325、K 47、L 113、L 45、L 82、M 278、N 103、N 153、N 362、N 67、N 83、Q 248、Q 271、Q 325、Q 77、R 2、R 247、R 323、R 73、R 99、S 72、S 81、T 115、T 155、T 361、T 46、T 68、T 69、T 70、T 72、V 113、V 114、V 250、V 309、V 324、V 97、W 101 のうちの1つ以上、またはエンベロープタンパク質の天然二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400 アミノ末端残基に採用する残基と実質的に同様の空間的配置にある Dengue 熱ウイルスエンベロープポリペプチドの等価残基を含む。これらの残基は、天然に存在するエンベロープタンパク質内にあってもよく、または代替の実施形態では、それらは、適切な配置において骨格タンパク質内に保持される。好ましい実施形態では、EDE 化合物は、上述の位置 W 101 及び少なくとも1つの他の残基を含む。さらに好ましい実施形態では、EDE 化合物は、上記の残基のすべてを含む。一実施形態では、EDE 化合物は、N 153 グリカンを含む。代替の実施形態では、EDE は、N 153 グリカンを含まない。

30

40

【0172】

さらに好ましい実施形態では、EDE 化合物は、1種を超える血清型の Dengue 熱ウイルスにわたってアミノ酸及び空間的位置の両方において観察される残基、好ましくは、すべての血清型の Dengue 熱ウイルス、つまり、4種の血清型の Dengue 熱ウイルスにわたってア

50

ミノ酸及び空間的位置の両方において観察される残基を含む。

【0173】

EDE化合物は、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基を含んでもよく、これは、二量体配置において増加した安定性を有し、また、上述のタンパク質骨格内に保持されるように操作される。

【0174】

本発明者らは、エンベロープ二量体の特定の領域が本発明の化合物、例えば抗体またはその抗原結合部分との接触には重要であることが分かっている。したがって、いくつかの実施形態では、VDE化合物は、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの400アミノ末端残基の特定の抗原部分を含む。

【0175】

EDE化合物は、抗原性には必要であると見なされる領域を含む、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基の特定の残基を含む特定の断片であってもよい。この断片はまた、特定の立体構造を維持するように操作されてもよく、またはタンパク質骨格内に保持されてもよく、または操作され、かつタンパク質骨格内に保持されてもよい。

【0176】

例えば、一実施形態では、EDE化合物は、ドメインII側上のbストランド、及び(二量体界面の向かいにある)ドメインI側上の「150ループ」によって形成されたくぼみの中心に置かれた領域を含み、150ループが残基148~159に広がり、ドメインIのbストランドE0及びF0を接続し、N153グリカンを担当し、これは二量体におけるパートナーサブユニットの融合ループを覆う。一実施形態では、この領域は、参照サブユニットのドメインIIの3つのポリペプチドセグメントを含み、これはエピトープへのFLに貢献するサブユニットとして定義される。これらの3つのセグメントは、bストランド(N67グリカンを担当する残基67~74)、すぐ上流の融合ループ及び残基(残基97~106)、ならびにijループ(残基246~249)である。

【0177】

別の実施形態では、上述の領域(参照サブユニットのドメインIIの3つのポリペプチドセグメントを含む領域)に加えて、EDE化合物は、150ループ及び第2のサブユニットのN153グリカン鎖をさらに含む。

【0178】

EDE化合物のさらなる実施形態は、特定の残基K310において、上述の領域(参照サブユニットのドメインIIの3つのポリペプチドセグメントを含む領域)、ならびに150ループ及び第2のサブユニットのドメインIIIのAストランドを含む。本発明者らは、本明細書で定義される有用な化合物のサブユニットがEDEに結合する際に、第2のサブユニットの150ループに障害を来すことが分かっている。それ故に、一実施形態では、150ループは、エンベロープタンパク質の天然二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの400アミノ末端残基において見出される天然配置にあってもよいか、または別の実施形態では、150ループは、150ループが本発明の化合物のうちの1つに結合する際に採用する不規則な配置にあってもよい。

【0179】

N67グリカンが樹状細胞のデング熱感染には特に重要であると見なされる。それ故に、本明細書に記載されるように、正しいエピトープ環境においてこの残基を含むEDE化合物は、好ましい実施形態であると思なされる。

【0180】

好ましい実施形態では、EDE化合物は、一旦対象、好ましくはヒトに投与されると、抗体を作り出すように、これらの抗体は、好ましくは、4種すべての血清型のデング熱ウ

10

20

30

40

50

ウイルスに結合することができ、任意に、4種すべての血清型のデング熱ウイルスを中和することができ、好ましくは、4種すべての血清型のデング熱ウイルスを100%中和することができ、任意に、ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られるウイルスを中和することができ、好ましくは、ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られる4種すべての血清型のデング熱ウイルスを100%中和することができる。

【0181】

VDE化合物は、当業者に公知であるように、例えば、実施例において示されるように、本明細書で提供される高親和性/中和抗体のうちの1つ以上に対して開発された、抗イデオタイプ抗体（もしくはその断片、または上で論じられるように、結合特異性を共有する分子）であってもよい。

10

【0182】

本発明はまた、本発明の安定化組換えsE二量体であるEDEの合成のための方法も提供し、この方法は、

a) 上に定義される単一または複数のシステイン突然変異体sEを、酸化条件下で接触させるステップ、及び/または

b) 2つのsE単量体を、上に定義される少なくとも1つ、2つ、または3つのスルフヒドリル反応性架橋剤と接触させるステップ、及び/または

c) 上に定義されるグリコシル化部位を有する2つのsE単量体を、クリック化学によって接触させるステップ、及び/または

d) 少なくとも1つのsE単量体のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基を、上に定義されるかさ高い側鎖アミノ酸と置換する2つのsE単量体と接触させるステップ、のうちの少なくとも1つを含む。

20

【0183】

本発明はまた、上に定義される方法によって得られる安定化組換えsE二量体も提供する。

【0184】

本発明に従って安定化組換えsE二量体の適切な形成を確実にするために、以下に記載の抗体に対する親和性は、（共有結合的及び非共有結合的に安定化した二量体については）ELISAによって、または（共有結合的に安定化した二量体については）表面プラズモン共鳴によって測定され得る。

30

【0185】

本発明はまた、本発明の核酸または本発明のベクター、例えば、EDE化合物または本発明の化合物をコードする核酸の一部を含む核酸またはベクターのうちのいずれかを含む宿主細胞も含む。例えば、本発明は、ベクター、例えばプラスミドを含む、異種タンパク質の発現に有用であることが知られている任意の宿主細胞、例えば、C6/36昆虫細胞、ヒト樹状細胞、CHO細胞、または微生物、例えば、ピキア・パストリス細胞を含む。宿主細胞はまた、任意に、ゲノム、例えば、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、レトロウイルス、シンドビスウイルス、ワクシニアウイルス、または任意の他のDNAもしくはRNAウイルスベクターへの本発明の核酸を標的とするためのウイルスベクターの使用によって宿主細胞のゲノムに組み込まれている、本発明の核酸を含んでもよい。

40

【0186】

本発明は、本発明の核酸または本発明のベクター、または本発明の宿主細胞によって、例えば、VDE化合物または本発明の化合物をコードする核酸の一部を含む核酸またはベクターによって形質転換される少なくとも1つの細胞を含む非ヒトトランスジェニック動物をさらに含む。

【0187】

本発明の化合物、好ましくはポリペプチド、好ましくは抗体もしくはその抗原結合部分、または本発明のEDE化合物の産生のためのプロセスが、本明細書に提供される。このプロセスは、以下の段階：

50

i i) 本発明の宿主細胞の適切な培地における培養、

i i) 当該化合物、好ましくは産生された抗体またはその抗原結合部分、または当該 E D E 化合物の回収、を含み、当該回収は培養培地または当該培養細胞のいずれかからである。

【 0 1 8 8 】

ポリペプチドの精製または単離については、例えば、本化合物がポリペプチドである、または E D E 化合物がポリペプチドである場合に、当業者であれば、精製に役立つヌクレオチドを含む、例えば、エピトープタグの親和性タグを含むようにヌクレオチドコーディング配列を容易に操作し得ることを理解されよう。それ故に、一実施形態では、本発明の化合物または E D E 化合物の産生のためのプロセスは、本化合物もしくは E D E 化合物をコードするヌクレオチド配列を含み、本化合物もしくは E D E 化合物、または本化合物もしくは E D E 化合物をコードするヌクレオチド配列を含むベクターの精製に有用な一部分をコードするヌクレオチドをさらに含み、本化合物もしくは E D E 化合物の精製に有用な一部分をコードするヌクレオチドをさらに含む、宿主細胞の培養を含む。

10

【 0 1 8 9 】

本化合物が、ポリペプチド、例えば抗体またはその抗原結合部分であり、同様に、組換え手段によって作製される場合に、ポリペプチド産生は、対象への上の実施形態のいずれかに定義される E D E、任意に上に定義される E D E 化合物の投与によって引き起こされ得ることが理解されよう。E D E (任意に E D E 化合物)の投与後、天然宿主反応は、対象の血液から回収され得る抗体を産生し得る。好ましくは、E D E は、無傷ウイルス、ウイルス様粒子、またはサブウイルス粒子の一部として提示されない。好ましくは、E D E は、上で論じられるエンベロープポリペプチド二量体、または上もしくは下で論じられるその他の E D E 化合物である。

20

【 0 1 9 0 】

例えば、本発明は、本発明の化合物の産生方法を提供し、本化合物は本発明の抗体であり、この方法は、

a) 哺乳動物を本発明の安定化組換え s E 二量体または本発明の免疫原性組成物と接触させるステップと、

b) 当該哺乳動物由来の 1 つ以上の血清試料中の当該 s E を対象とする抗体の存在を検出するステップと、

30

c) 哺乳動物から脾臓細胞を採取するステップと、

d) ハイブリドーマ細胞を産生するために、脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させるステップと、

e) 抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞を特定するステップと、

f) 抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞を培養するステップと、

g) 任意に、当該抗体を単離するステップと、を含む。

【 0 1 9 1 】

本発明はまた、上に定義される方法のうちのいずれかによって得られる抗体も提供する。

【 0 1 9 2 】

本発明はまた、上に定義される方法によって得られるハイブリドーマ細胞も提供する。

40

【 0 1 9 3 】

本発明はまた、上に定義される当該二量体を対象とする中和抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞の調製のための本発明の安定化組換え s E 二量体の使用も提供する。

【 0 1 9 4 】

好ましい実施形態では、本 E D E または E D E 化合物は、高度に交差反応性があり強力に中和する抗体を作り出すことができると既に判断されているようなものである。実施例 (実施例 1 ~ 6) において特定される抗体は、デング熱ウイルスの自然感染において無傷ウイルスに作り出された。より特異的かつ改善された抗体は、本発明の E D E 化合物であ

50

り得る、特異的なE D E抗原の投与によって作り出すことができると思なされる。例えば、自然感染では、何人かの患者は、抗E D E抗体を作り出さず、その代わりに、あまり有用でないと見なされ、あまり交差反応性がなく、あまり中和しない抗F L抗体を産生した。E D E抗原の投与は、有用な抗E D E抗体を作り出す可能性がより高いと思なされる。上述のように、いくつかの実施形態では、本E D EまたはE D E化合物は、二量体配置において増加した安定性を有するように操作され、これは、対象内で作られる抗V D E抗体の機会を増すと見なされる。加えて、いくつかの実施形態では、本E D EまたはE D E化合物は、例えば、エンベロープタンパク質内でそれ自身が突然変異、または改善されたエピトープを提示するための骨格タンパク質の使用によって、例えば、抗F L抗体が作られる可能性が低いように融合ループを隠すことによって操作されている。すべての血清型の Dengue 熱ウイルスに共通しているE D EまたはE D E化合物の投与は、高度に交差反応性があり強力に中和する抗体を作り出す可能性が高い。これらの抗体は、対象から回収され、さらなる分析のために使用され得るか、または Dengue 熱の治療もしくは Dengue 熱臨床試験において使用され得る。

10

20

30

40

50

【0195】

したがって、一実施形態は、本化合物がポリペプチド、または抗体もしくはその抗原結合部分である、本発明に従う化合物の産生のためのプロセスを提供し、当該プロセスは以下の段階：

- a. 対象への、前述の実施形態のうちのいずれかにおいて定義されるエンベロープ二量体エピトープまたはE D E化合物の投与、
- b. 対象の血液からの当該抗体またはその抗原結合部分の回収及び単離、を含む。

【0196】

対象にE D EまたはE D E化合物を投与することを含む、本発明の、化合物、例えば、抗体またはその抗原結合部分を産生する上記の方法はまた、ワクチンのために適当な抗原を選択する方法の一部としても使用することができることを理解されよう。現行のワクチンは、弱毒化したバージョンの4種すべての血清型の Dengue 熱を利用しており、特に効果的ではない。そのようなワクチンはまた、有用ではない抗F L抗体の産生を引き起こすこともできよう。好ましいワクチンは、すべての血清型の Dengue 熱ウイルスに対して免疫反応を引き起こすことができる単一の抗原を含み得、この免疫反応は、すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを中和することができる、すなわち、4種の血清型の Dengue 熱ウイルスであると見なされる。

【0197】

本発明の発明者らは、高度に交差反応性があり強力に中和する抗体、ならびにそれらが結合する特定のエピトープ(E D E)を初めて特定した。それ故に、ワクチンにおけるこのエピトープの使用は、現行のワクチン戦略より好ましい可能性が高い。

【0198】

それ故に、本発明は、 Dengue 熱ウイルスに対するワクチンのために適当な抗原を選択する方法を提供し、当該方法が、当該抗原に応答する対象において作製された1つ以上の抗体の特徴付けを含み、任意に、当該抗原が、前述の実施形態のいずれかに定義されるエンベロープ二量体エピトープと結合することが知られている抗体のパネルに結合することがこれまでに見出されている。

【0199】

Dengue 熱抗原を投与されている対象における高度に交差反応性があり強力に中和する抗体の特定は、ワクチンに有用である可能性が高い抗原を示している。一実施形態では、この抗原は、無傷ウイルスの一部として提示されない。好ましい実施形態では、この抗原は、任意に骨格タンパク質の一部として、上述の実施形態のうちのいずれかに定義されるE D E化合物、好ましくはエンベロープタンパク質の二量体、好ましくは安定化した二量体である。好ましい実施形態では、この抗原は、例えば実施例において特定される、E D Eに結合することができる高度に交差反応性があり強力に中和する抗体、例えば、本発明の抗体に結合することができることが既に判断されているようなものである。

【0200】

高度に有用な抗体と結合することができることが知られているそのような抗原を投与することによって、対象において抗原に応答して作られる抗体が特徴付けられ得る。そのような抗原は、対象内にそのような有用な抗体の産生をもたらし、そのため、ワクチン組成物で用いるための適当な候補抗原である可能性が高い。特徴付けとは、これらの抗体が、例えば、線状または変性または組換えエンベロープタンパク質に結合する抗体の能力、例えば、ウエスタンブロットまたはELISAにおいてエンベロープタンパク質に結合する能力、及びエンベロープタンパク質の二量体、または前述の実施形態において上述のEDEもしくはEDE化合物に結合する抗体の能力を判定することによって、融合ループと結合すると見なされるかどうかを判定するという意味を含む。4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスに結合する抗体の能力はまた、4種すべての Dengue 熱ウイルスを中和する抗体の能力を評価し得るように、評価され得る。抗体の中和能力を判定するための方法は、前述されている。ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られた Dengue 熱ウイルスを中和する抗体の能力はまた、上述の及び実施例において記載されるように、判定され得る。

10

【0201】

一実施形態では、抗原が、主に抗FL抗体を作り出す場合、ワクチンとして有用であると見なされない。例えば、抗原は、FLに対して作り出された抗体とEDEに対して作り出された抗体の比率が、1:2、1:4、1:5、1:10、1:50、1:100、1:500、1:1000以下である場合、有用であると見なされる。抗FL抗体及び抗EDE抗体の相対量は、当業者に公知の方法、例えばELISAに基づいた技術を用いることによって判定され得る。抗原は、1種を超える血清型の Dengue 熱ウイルス、好ましくは4種すべての Dengue 熱ウイルスのEDEと結合することができる抗体を作り出す場合、有用であると見なされる。抗原は、1種を超える血清型の Dengue 熱ウイルスを中和することができる、好ましくは、4種すべての Dengue 熱ウイルスを、好ましくは100%中和することができる抗体を作り出す場合、有用であると見なされる。また、抗原がヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られた Dengue 熱ウイルスを中和することができる抗体を、好ましくは同じレベルまで(上で論じられるように)作り出す、好ましくはウイルスを少なくとも95%または少なくとも98%、例えば100%中和する場合、有用であると見なされる。抗原は、

20

a) 抗FL抗体を作り出さない、または有意に作り出さない場合、及び

30

b) 4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスとかなり有意な程度まで結合する場合、及び

c) ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られた4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスをかなり有意な程度まで100%中和する場合、最も有用であると見なされる。

【0202】

さらに、別の実施形態では、作り出された抗体が上述の実施形態において定義されるEDEに結合することができる場合、この抗原は、ワクチン接種で用いるのに適していると見なされる。

【0203】

さらなる実施形態では、対象に投与される抗原は、抗体が融合ループに作り出されるのを防ぐのに役立つようにさらなる薬剤を含んでもよい。

40

【0204】

抗原に曝露される対象によって産生される抗体は、対象の分類された単一の形質細胞から得られてもよい。

【0205】

初めてまたは高度に交差反応性があり Dengue 熱ウイルスを強力に中和する抗体の特定は、このウイルス疾患を治療または予防することができる特有の機会を与えることが理解されよう。加えて、本発明まで、試験中に生じた感染を確実に治療する方法がなかったため、生 Dengue 熱ウイルスを含む臨床試験を行うことが可能であろう。したがって、本発明のさらなる態様は、対象における Dengue 熱ウイルス感染を治療または予防する方法を提供す

50

る。

【0206】

この方法は、本発明に従う1つ以上の化合物、好ましくはポリペプチド、好ましくは抗体もしくはその断片の投与を含む。本発明はまた、 Dengue 熱ウイルス感染の予防または治療で用いるための本発明に従う1つ以上の化合物、好ましくはポリペプチド、好ましくは抗体もしくはその断片も提供する。本発明はまた、 Dengue 熱感染の治療または予防のための薬剤の製造における本発明の化合物の使用も提供する。

【0207】

投与については、本発明の化合物は、組成物、例えば薬学的組成物の一部であってもよいことが理解されよう。この組成物は、感染を治療するのにそれ自体が有用であると見なされる1つ以上の治療剤、例えばさらなる抗ウイルス剤、または例えば Dengue 熱感染の症状を治療するのに有用であると見なされる1つ以上の薬剤]をさらに含んでもよい。

【0208】

「治療する」という用語は、本発明の化合物、例えば、本発明の化合物、EDE 化合物、ワクチン組成物、抗体、安定化組換え s E 二量体、または本発明の免疫原性組成物のうちのいずれかを、 Dengue 熱ウイルス感染または Dengue 熱ウイルス感染の症状を有する患者に、 Dengue 熱ウイルス感染及び/または Dengue 熱感染の症状を治す、治癒する、緩和する、軽減する、変化させる、救済する、向上させる、改善する、または影響を及ぼすという目的で投与することを含む。 Dengue 熱感染の症状のうちのいずれか1つ以上を治療するを緩和するという意味を含む。治療はまた、新たな細胞が感染するのを防ぐという意味も含む。患者がうまく治療されているかどうかは、当業者には明らかであろう。例えば、ウイルス量は減少し得る。

【0209】

「予防する」という用語は、 Dengue 熱ウイルス感染の進行が減速される及び/もしくは排除される、または Dengue 熱ウイルス感染の発症を遅らせるまたは排除されることを意味する。

【0210】

Dengue 熱ウイルス感染及び Dengue 熱の症状は、例えば、WHO ファクトシート 117 番で提示されている。そこに記述されるように、 Dengue 熱は、重症のインフルエンザ様疾患であり、乳児、幼児、及び成人が罹患するが、死亡することはめったにない。高熱 (40 / 104 ° F) が、激しい頭痛、眼の奥の痛み、筋痛と関節痛、悪心、嘔吐、腺の腫脹、または発疹のうち2つ以上の症状を伴う場合には、 Dengue 熱を疑うべきである。症状は、感染蚊に刺された後4~10日の潜伏期間後、通常2~7日間持続する。重症型の Dengue 熱は、血漿漏出、体液貯留、呼吸困難、重度の出血、臓器不全等による死に至る可能性のある合併症である。危険な兆候は、初発症状から3~7日後に起こり、同時に体温低下 (38 / 100 ° F 以下) と併せて、激しい腹痛、連続する嘔吐、呼吸促進、歯肉の出血、倦怠感、不穏、吐血を含む。危険状態の24~48時間後に死亡することがあり、合併症や死亡するリスクを避けるために適切な医学的治療が必要である。

【0211】

本化合物または本化合物を含む組成物の投与は、本化合物が予防的に使用される場合に細胞の感染の阻害、あるいは、治療目的で使用される場合に細胞のさらなる感染の阻害をもたらす、及び/または疾患の兆候及び/もしくは症状を軽減する、ある量、例えば治療有効量の投与である。

【0212】

治療有効量は、他の症状 (複数を含む) の主観的軽減または臨床医もしくは資格のある観察者によって言及されるように客観的に識別できる改善をもたらす量である。

【0213】

Dengue 熱感染を予防するとは、任意の有意な程度まで感染のレベルを低減するという意味を含む。一実施形態では、本発明の化合物は、1種の血清型の Dengue 熱ウイルスによる感染を30%、50%、70%、80%、90%、95%、好ましくは100%予防する

10

20

30

40

50

。好ましい実施形態では、本発明の化合物は、2種の血清型のデング熱ウイルス、3種の血清型のデング熱ウイルス、4種すべての血清型のデング熱ウイルスによる感染を30%、50%、70%、80%、90%、95%、好ましくは100%予防する。最も好ましい実施形態では、本発明の化合物は、4種すべての血清型のデング熱ウイルスによる感染を完全に予防する。これは、当業者に公知の技術によって、例えばウイルス量を測定することによって評価されてもよい。

【0214】

本発明は、動物（非ヒト）、好ましくは哺乳動物、例えば、サル、ウサギ、マウス、またはラクダ科動物（例えば、ラマ）に免疫性を与えるための、EDE、好ましくは安定化組換えsE二量体、または本発明に従う免疫原性組成物の使用を提供する。

10

【0215】

さらなる実施形態は、例えば、感染を終結させることを意図して、生デング熱ワクチン試験で用いるために、本発明に従う1つ以上の化合物、好ましくはポリペプチド、好ましくは抗体もしくはその断片を提供する。

【0216】

好ましくは、本発明の化合物は、昆虫細胞及びヒト細胞の両方で作られる4種すべての血清型のデング熱ウイルスを少なくとも95%または少なくとも98%、例えば100%中和することができるものである。ウイルスへの曝露前の化合物の事前投与は、ウイルス感染を予防するであろうと見なされている。

20

【0217】

例えば、上述の4種すべての血清型のデング熱ウイルスを中和することができる、本発明に従う化合物、例えば、抗体もしくはその断片は、上述のウイルスへの曝露前に投与してもよく、例えば、旅行者または大発生または1人以上以上の感染した人々の発生または密接な接触、例えば、蚊に刺された可能性が高い人々の近隣もしくは住宅でのいずれかにおける予防薬として使用されてもよい。あるいはまたは加えて、本化合物は、患者が初めに発熱を示す場合、または症状が重症になる場合に投与されてもよい。

【0218】

本化合物についてのすべての選好は、本発明の実施形態において上述される通りである。

【0219】

本発明の化合物、例えば、抗体またはその抗原結合部分が、さらなる治療剤、例えば、1つ以上のT細胞ワクチン、または他の抗ウイルス剤とともに投与されてもよいことが理解されよう。これらは、本発明の化合物と同じ組成物の一部として投与されてもよく、または別々に投与されてもよい。例えば、T細胞ワクチンは、インフルエンザに対する保護のために提案されている^{8 5}。

30

【0220】

本発明の化合物は、1回、2回、または数回投与されてもよい。投与は、1日、2日、1週間、2週間、1カ月、6カ月、1年間またはそれ以上にわたって行ってもよい。感染後の治療については、より短期間、例えば最長1カ月が、適切であり得る。予防については、より長期間、例えば1年のうちの6カ月またはそれ以上が、適切であり得る。

40

【0221】

デング熱感染の予防または治療で用いるための本化合物、例えば抗体またはその抗原結合部分は、本発明の方法を用いて選択されてもよい。それ故に、本発明は、デング熱ウイルスの予防または治療で用いるための適当な抗体またはその断片を選択する方法を提供し、当該方法は、任意の上述の実施形態において定義されるエンベロップ二量体エピトープを含む抗原に応答して対象において作製された抗体またはその断片の特徴付けを含む。

【0222】

上述の実施形態のうちのいずれかに記載のEDE化合物は、対象へのEDEの投与後に適当な抗体を作り出すことができる可能性が高い。それ故に、かかる対象において作られた抗体は、デング熱感染の治療または予防で有用である可能性が高い。

50

【0223】

好ましい実施形態では、EDEは、任意に骨格タンパク質の一部として、本発明のEDE化合物、例えば、エンベロープタンパク質の二量体、好ましくは安定化した二量体である。好ましい実施形態では、抗原/EDE化合物は、EDEに結合することができる高度に交差反応性があり強力に中和する抗体、例えば、本発明の抗体に結合することができることが既に周知であるようなものである。好ましい実施形態では、この抗原は、例えば、交差反応性のある及び潜在的に中和する抗EDE抗体を作り出すのに必要とされる特定の配置において残基を含むが、抗FL抗体を作り出す残基または特定の立体構造の残基を含まないことによって、天然エンベロープ二量体を上回って改善されると見なされる。

【0224】

別の実施形態では、EDE、任意にEDE化合物の投与と同様に、対象に、例えば、抗FL抗体の形成を遮断する化合物または薬剤を投与する。例えば、安定化したsE二量体は、有用であり得る。

【0225】

特徴付けとは、これらの抗体が、例えば、線状または変性または組換えエンベロープタンパク質に結合する抗体の能力、例えば、ウエスタンブロットまたはELISAにおいてエンベロープタンパク質に結合する能力、及びエンベロープタンパク質の二量体、または前述の実施形態において上述のEDEもしくはEDE化合物に結合する抗体の能力を判定することによって、融合ループと結合すると見なされるかどうかを判定するという意味を含む。4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスに結合する抗体の能力はまた、4種すべての Dengue 熱ウイルスを中和する抗体の能力を評価し得るように、評価され得る。抗体の中和能力を判定するための方法は、前述及び実施例において詳述されている。ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られた Dengue 熱ウイルスを中和する抗体の能力もまた、判定され得る。

【0226】

一実施形態では、抗体が、FLに結合する場合、有用であると見なされない。この抗体が、1種を超える血清型の Dengue 熱ウイルス、好ましくは4種の血清型の Dengue 熱ウイルスに結合することができる場合、または前述の実施形態のうちのいずれかに記載の1種を超える血清型のEDEに結合することができる場合、有用であると見なされる。この抗体が、1種を超える血清型の Dengue 熱ウイルス、任意に2種の血清型の Dengue 熱ウイルス、任意に3種の血清型の Dengue 熱ウイルスを中和することができる場合、好ましくは4種の血清型の Dengue 熱ウイルスを、好ましくは少なくとも95%または少なくとも98%、例えば100%中和することができる場合、有用であると見なされる。また、この抗体が、ヒト細胞、任意に樹状細胞、及び昆虫細胞、任意にC6/36細胞の両方で作られた Dengue 熱ウイルスを、好ましくは同じレベルまで中和することができる場合、好ましくはウイルスを少なくとも95%または少なくとも98%、例えば100%中和する場合、有用であると見なされる。この抗体が、

- a) 抗FL抗体を作り出さない、または有意に作り出さない場合、及び
- b) 4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスとかなり有意な程度まで結合する場合、及び
- c) ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られた4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスをかなり有意な程度まで100%中和する場合、最も有用であると見なされる。

【0227】

本発明者らは、Dengue 熱感染に罹患している患者が有用な抗EDE抗体または有用でない抗FL抗体のいずれかを産生することを見出したため、Dengue 熱感染を治療または予防するために有用であり得る抗体を特定するさらなる方法は、その変性型または線状型のエンベロープタンパク質に結合することができないそれらの抗体を単に特定することである。これらのエンベロープタンパク質に結合することができない任意の抗体は、本発明の有用な化合物である可能性が高い。

【0228】

患者はまた、ポリペプチド、好ましくは抗体またはその抗原結合部分を発現する核酸、ベクター、または宿主細胞で治療してもよいことを理解すべきである。例えば、ポリペプチドを含む核酸は、本発明の化合物が治療される患者内に内因的に発現するように、適当な送達システム、例えばウイルスベクター、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、レトロウイルス、シンドビスウイルス、ワクシニアウイルス、または任意の他のDNAもしくはRNAウイルスベクターに挿入されてもよい。

【0229】

本発明はまた、本発明の1つ以上の化合物で治療または予防的治療を受けるような推定の必要性に従って患者を階層化するための方法も提供する。したがって、本明細書では、前述の実施形態のうちのいずれか1つに従って、本化合物または組成物による治療、または上昇する用量の本化合物または組成物を必要とする可能性が高いような、デング熱ウイルス感染を患っている患者を特定するための方法が提供され、この方法は、対象における抗エンベロープ二量体エピトープ抗体及び抗融合ループ抗体のレベルの判定を含み、このエンベロープ二量体エピトープは、前述の実施形態のうちのいずれかに記載の通りである。

10

【0230】

本発明者らによって特定されるように、デング熱感染に罹患している患者は、抗EDE抗体または抗FL抗体を主に産生する。抗FL抗体は、有用であると見なされないが、一方、抗EDE抗体は、有用であると見なされる。対象が抗EDE抗体を有するが、一方、本発明の化合物によるいくつかのさらなる治療法を依然として必要とし得る場合、主に抗FL抗体を有する対象は、先天性の有用な抗体を有さないため、より高い用量を必要とする可能性が高い。それ故に、抗FL抗体のみを有する患者は、本発明の化合物による治療を必要とする可能性が高い患者であると見なされる。抗EDE抗体を既に産生している患者は、治療を必要としないかもしれない。加えて、抗EDE抗体を産生せず、抗FL抗体のみを産生する患者は、抗EDE抗体を有する患者よりも高い用量の治療を必要とする可能性が高い。また、患者は、抗EDE抗体を低いレベルのみ作り出し得、それ故に、より高い用量の化合物を必要とし得る。

20

【0231】

より高い用量とは、この患者は、抗EDE抗体を産生する患者が必要とするよりも2、3、4、5、10、20、50倍の用量の本発明の化合物を必要とすることを意味する。

30

【0232】

「抗VDE抗体を低いレベルで作り返す」とは、抗EDE抗体を作り出す他の患者と比較して、この患者が、平均よりも低いレベルの抗EDE抗体を有することを意味する。

【0233】

例えば、抗体が無傷デング熱ウイルスまたはEDEに結合するが、変性もしくは線状エンベロープタンパク質に結合しないかどうかを判定する、これらの抗体がEDEに結合するかどうかを特定するための手段は、前述及び実施例において記載される通りである。エンベロープタンパク質が増加した二量体の安定性を有するように操作されている場合、またはエンベロープタンパク質またはその残基が骨格の一部として提示されている場合に、そのタンパク質に結合する抗体の能力を評価することができる。

40

【0234】

対象内の抗FL抗体及び抗EDE抗体のレベルはまた、デング熱ウイルスワクチン接種のためのその対象の必要性を評価するために使用することもできる。それ故に、さらなる実施形態では、デング熱ウイルスワクチン接種のための患者の必要性を評価するための方法が提供され、当該方法は、抗エンベロープ二量体エピトープ抗体及び抗融合ループ抗体のレベルの特定を含み、このエンベロープ二量体エピトープは、前述の実施形態のうちのいずれかに記載の通りである。本発明の化合物、またはより高い用量の本化合物による治療を必要とする患者の基準と同様に、患者が抗エンベロープ二量体エピトープ抗体を有すると判定される場合、ワクチン接種が必要でない可能性が高い。

50

【0235】

さらに、この患者が抗エンベロープ二量体エピトープ抗体を有すると判定される場合、この患者に、ブースト投与が供され得る。

【0236】

別の実施形態では、この患者が抗エンベロープ二量体エピトープ抗体を有さない場合、全ワクチン接種が必要とされる。

【0237】

本発明はまた、感受性のある哺乳動物対象、例えばヒトにおけるデング熱ウイルス感染の予防及び/または治療を目的とする予防的または治療的免疫原性(またはワクチン)組成物を調製するための、上に定義される安定化組換え s E 二量体(抗原として使用される)の使用も提供する。

10

【0238】

有意には、本発明者らは、上述のように、今まで知られていなかった高度に交差反応性があり強力に中和する抗体によって認識される特異的なエピトープを初めて特定した。このエピトープは、デング熱ウイルスに対するワクチン接種において特に効果的な抗原を提供すると見なされている。デング熱ウイルスに対するワクチン接種で用いるために適当な抗原を選択する方法は、前述の実施形態において記載されている。したがって、本発明は、感受性のある哺乳動物対象、例えばヒトにおけるデング熱ウイルス感染の予防及び/または治療を目的とする予防的または治療的免疫原性(またはワクチン)組成物を調製するために用いるための、デング熱ウイルスのエンベロープ二量体エピトープ、任意に E D E 化合物を提示する組成物を提供し、エンベロープ二量体エピトープ及び E D E 化合物は、前述の実施形態のうちのいずれかに定義され、前述の方法に従って特定される通りであり、例えば、E D E または E D E 化合物は、ワクチンで用いるために適当な抗原を選択する方法を提示する前述の実施形態において、例えば、対象への潜在性のあるワクチン候補 E D E / E D E 化合物の投与後に作られる抗体を特徴付けることによって特定され得る。これは、当業者の権限内で十分であり得る。あるいは、E D E または E D E 化合物は、前述の実施形態において提示される通りであり得、例えば 一実施形態では、E D E または E D E 化合物は、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基である。エンベロープタンパク質は、D E N V - 1、D E N V - 2、D E N V - 3 及び D E N V - 3、及び D E N V - 4、(配列番号 29、31、33、または 35)からのエンベロープタンパク質、または配列番号 29、31、33、または 35 の配列に少なくとも 90% の相同性を有するタンパク質のうちのいずれかであってもよい。この二量体は、ホモ二量体またはヘテロ二量体であってもよい。好ましい実施形態では、この二量体は、無傷ウイルス粒子、またはサブウイルス粒子、またはウイルス様粒子に組み込まれないが、むしろ、遊離二量体である。例えば、タンパク質骨格の一部として、本明細書に記載の E D E または E D E 化合物、例えば、操作されたエンベロープタンパク質のうちのいずれかの形態が、ウイルス、ウイルス様粒子、またはサブウイルス粒子の一部として提示されてもよいことが理解されよう。好ましい実施形態では、E D E 化合物は、前述の実施形態において記載される、安定化組換え s E 二量体である。

20

30

40

【0239】

さらに別の実施形態では、ワクチン組成物で用いるための E D E または E D E 化合物は、天然に存在するエンベロープ二量体を上回る改善されたエピトープを提示する。例えば、E D E / E D E 化合物は、F L が、それ自体で、化合物、例えばポリペプチド、例えば抗体またはその抗原部分によって認識されることができないように操作されているか、または骨格に挿入されており、例えば、E D E / E D E 化合物は、F L が、融合ループの直接的隣接からの単離において抗体によって認識することができない、すなわち誘導ループは、四次組織から独立している文脈において認識することができないように操作される。

【0240】

別の実施形態では、ワクチン組成物で用いるための E D E または E D E 化合物は、上述

50

のように、二量体配置において増加した安定性を有するように操作されている、例えば、二量体間の共有及び/または非共有結合の増加したレベルを有するように操作されている、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基を含むか、あるいは、例えば、上述のように、二量体間の共有及び/または非共有結合のレベルを増加することによって、二量体配置を保存する異種タンパク質骨格に組み込まれている。さらに、EDE/EDE化合物は、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基の一部のみ提示し得る異種タンパク質骨格を含んでもよく、この一部は、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基の連続的な一部であるか、またはこの一部は、上述の、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基の厳選した非連続的残基を含む。

10

【0241】

例えば、一実施形態では、EDE/EDE化合物は、位置E49、K64、Q77、W101、V122、N134、N153、T155、I161、A162、P169、T200、K202、E203、L308、K310、Q323、W391、F392、A71、C105、C74、D154、D249、D271、D309、D362、D98、E148、E311、E44、E71、E84、G102、G104、G106、G152、G156、G28、G29、G374、H158、H27、I113、I308、I46、K246、K247、K310、K323、K325、K47、L113、L45、L82、M278、N103、N153、N362、N67、N83、Q248、Q271、Q325、Q77、R2、R247、R323、R73、R99、S72、S81、T115、T155、T361、T46、T68、T69、T70、T72、V113、V114、V250、V309、V324、V97、W101のうちの一つ以上、または残基がエンベロープタンパク質の天然二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基を採用するために、実質的に同様の空間的配置におけるデング熱ウイルスエンベロープポリペプチドの等価残基を含む。これらの残基は、天然に存在するエンベロープタンパク質内であってもよく、または代替の実施形態では、それらは、適切な配置において骨格タンパク質内に保持される。好ましい実施形態では、EDE/EDE化合物は、上述の位置W101及び少なくとも一つの他の残基を含む。さらに好ましい実施形態では、EDE/EDE化合物は、上記の残基のすべてを含む。一実施形態では、EDE/EDE化合物は、N153グリカンを含む。代替の一実施形態では、EDE/EDE化合物は、N153グリカンを含まない。

20

30

【0242】

さらに好ましい実施形態では、ワクチン組成物で用いるためのEDE/EDE化合物は、1種を超える血清型のデング熱ウイルスにわたってアミノ酸及び空間的位置の両方において観察される残基、好ましくは、すべての血清型のデング熱ウイルス、つまり、4種の血清型のデング熱ウイルスにわたってアミノ酸及び空間的位置の両方において観察される残基を含む。

40

【0243】

EDE/EDE化合物は、エンベロープタンパク質の二量体、またはエンベロープ外部ドメイン、またはエンベロープタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基を含んでもよく、これは、二量体配置において増加した安定性を有し、また、上述のタンパク質骨格内に保持されるように操作される。

【0244】

本発明者らは、エンベロープ二量体の特定の領域が本発明の化合物、例えば抗体またはその抗原結合部分との接触には重要であることが分かっている。したがって、いくつかの

50

実施形態では、E D E / E D E 化合物は、エンペローブタンパク質の二量体、またはエンペローブ外部ドメイン、またはエンペローブタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基の特定の抗原部分を含む。

ワクチン組成物で用いるためのE D E / E D E 化合物は、抗原性には必要であると見なされる領域を含む、エンペローブタンパク質の二量体、またはエンペローブ外部ドメイン、またはエンペローブタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基の特定の残基を含む特定の断片であってもよい。この断片はまた、特定の立体構造を維持するように操作されてもよく、またはタンパク質骨格内に保持されてもよく、または操作され、かつタンパク質骨格内に保持されてもよい。

【0245】

例えば、一実施形態では、ワクチン組成物で用いるためのE D E / E D E 化合物は、ドメインI I 側上のbストランド、及び(二量体界面の向かいにある)ドメインI 側上の「150ループ」によって形成されたくぼみの中心に置かれた領域を含み、150ループが残基148~159に広がり、ドメインI のbストランドE 0及びF 0を接続し、N153グリカンを担当し、これは二量体におけるパートナーサブユニットの融合ループを覆う。一実施形態では、この領域は、参照サブユニットのドメインI I の3つのポリペプチドセグメントを含み、これはエピトープへのF L に貢献するサブユニットとして定義される。これらの3つのセグメントは、bストランド(N67グリカンを担当する残基67~74)、すぐ上流の融合ループ及び残基(残基97~106)、ならびにi j ループ(残基246~249)である。

【0246】

別の実施形態では、上述の領域(参照サブユニットのドメインI I の3つのポリペプチドセグメントを含む領域)に加えて、E D E / E D E 化合物は、150ループ及び第2のサブユニットのN153グリカン鎖をさらに含む。

【0247】

E D E / E D E 化合物のさらなる実施形態は、特定の残基K310において、上述の領域(参照サブユニットのドメインI I の3つのポリペプチドセグメントを含む領域)、ならびに150ループ及び第2のサブユニットのドメインI I I のAストランドを含む。本発明者らは、本明細書で定義される有用な化合物のサブユニットがV D E に結合する際に、第2のサブユニットの150ループに障害を来すことが分かっている。それ故に、一実施形態では、150ループは、エンペローブタンパク質の天然二量体、またはエンペローブ外部ドメイン、またはエンペローブタンパク質の外部ドメインの(約)400アミノ末端残基において見出される天然配置にあってもよいが、または別の実施形態では、150ループは、150ループが本発明の化合物のうちの1つに結合する際に採用する不規則な配置にあってもよい。

【0248】

N67グリカンが樹状細胞の Dengue 熱感染には特に重要であると見なされる。それ故に、本明細書に記載されるように、正しいエピトープ環境においてこの残基を含むE D E / E D E 化合物は、好ましい実施形態であると見なされる。

【0249】

好ましい実施形態では、E D E / E D E 化合物は、一旦対象、好ましくはヒトに投与されると、抗体を作り出すように、これらの抗体は、好ましくは、4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスに結合することができ、任意に、4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを中和することができ、好ましくは、4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを100%中和することができ、任意に、ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られるウイルスを中和することができ、好ましくは、ヒト細胞及び昆虫細胞の両方で作られる4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを100%中和することができる。

【0250】

上述の安定化組換え s E 二量体を含むE D E を含む免疫原性組成物は、当該対象において、

10

20

30

40

50

- エンベロープ二量体エピトープ (E D E) を単独に認識する (E L I S A 試験において組換え E タンパク質単量体への結合を示さない)、

- 交差反応性がある、及び

- 4 種の血清型 (D E N V 1 - 4) からのデング熱ウイルスを中和する、中和抗体を引き起こすのに特に適している。

【0251】

本発明はまた、有効量の、上に定義される安定化組換え s E 二量体 (抗原として使用される) を含むデング熱ウイルス免疫原性組成物も提供する。

【0252】

本組成物は、E D E / E D E 化合物それ自体を含んでもよいが、またはそれはワクチン接種される対象内に E D E / E D E 化合物を発現するための手段を含んでもよい。例えば、本発明は、デング熱ウイルス感染に対するワクチン接種で用いるための、エンベロープ二量体エピトープまたは E D E 化合物をコードする核酸を含み、エンベロープ二量体エピトープまたは E D E 化合物は、前述の実施形態のうちのいずれかに記載の通りである。さらに、核酸は、ベクターの一部であってもよい。ベクター及びベクター成分についての選好は、上述された通りである。

10

【0253】

例えば、ワクチン接種が、例えばプラスミド D N A による直接免疫を介して、特定の抗原をコードする核酸を用いて実行され得ることは当該技術分野で公知である。かかる核酸は、リポソーム及び免疫刺激構築物を介して送達され得る。あるいは、弱毒化したウイルス宿主またはベクターまたは細菌性ベクターは、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、レトロウイルス、シンドビスウイルス、ワクシニアウイルス、または任意の他の D N A もしくは R N A ウイルスベクターを使用され得る。

20

【0254】

デング熱ウイルス感染に対するワクチン接種で用いるための組成物が核酸である場合に、核酸は、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、レトロウイルス、シンドビスウイルス、ワクシニアウイルス、または任意の他の D N A もしくは R N A ウイルスベクターにおいて、患者に送達され得る。

30

【0255】

デング熱ウイルス感染に対するワクチン接種で用いるための、

- a) エンベロープ二量体エピトープまたは E D E 化合物、
- b) E D E または E D E 化合物をコードする核酸、
- c) 核酸を含むベクター、

のうちのいずれか 1 つ以上を含む組成物はまた、エンベロープ二量体エピトープまたは E D E 化合物が前述の実施形態のうちのいずれかに記載の通りである場合に、本発明の一部である。

【0256】

一実施形態では、

- a) エンベロープ二量体エピトープまたは E D E 化合物、
- b) E D E または E D E 化合物をコードする核酸、
- c) 核酸を含むベクター、

は、1 種を超える、任意に 2 種、任意に 3 種、任意に 4 種の血清型のデング熱ウイルスであるか、またはそれらをコードする。

40

【0257】

好ましい実施形態では、

- a) エンベロープ二量体エピトープまたは E D E 化合物、
- b) E D E または E D E 化合物をコードする核酸、
- c) 核酸を含むベクター、

50

は、4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを中和する、好ましくは4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスを100%中和することができる抗体を作り出すことができる単一エピトープであるか、または単一エピトープの産生をもたらす。

【0258】

Dengue 熱ウイルスに対するワクチン接種における本発明の組成物の使用は、Dengue 熱ウイルスによる感染を低減または予防することを意図している。

【0259】

Dengue 熱感染を低減または予防するとは、あらゆる程度まで感染のレベルを低減するという意味を含む。一実施形態では、本発明の化合物は、1種の血清型の Dengue 熱ウイルスによる感染を30%、50%、70%、80%、90%、95%、好ましくは100%低減する。好ましい実施形態では、本発明の化合物は、2種の血清型の Dengue 熱ウイルス、3種の血清型の Dengue 熱ウイルス、4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスによる感染を30%、50%、70%、80%、90%、95%、好ましくは100%低減する。最も好ましい実施形態では、本発明の化合物は、4種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスによる感染を完全に予防する。

10

【0260】

Dengue 熱ウイルス感染に対する中和抗体を誘発する、本発明の、EDE または EDE 化合物、例えば安定化組換え sE 二量体は、Dengue 熱ウイルスによる感染の期間の範囲で、重症度を防ぐまたは弱毒化するのに十分な量で哺乳動物対象、好ましくはヒトに投与される。

20

【0261】

治療有効量は、その他の要因の中で、治療される対象、治療される対象の年齢及び全身状態、抗体を合成するための対象の免疫反応の容量、所望の保護の度合い、治療される状態の重症度、特定の VDE 化合物、例えば選択された特定の安定化組換え sE 二量体及び投与の様式に応じて異なる。適切な有効量は、当業者によって容易に決定され得る。治療有効量は、定期的な試験を通して決定され得る比較的に広範な範囲に収まるであろう。

【0262】

より具体的には、EDE 化合物、例えば本発明の安定化組換え sE 二量体は、1~1000 µg の二量体、好ましくは1~50 µg を含む治療有効量で投与される。

【0263】

特定のワクチンに対する最適量は、対象における抗 sE 二量体の抗体力価を測定することを含む標準研究によって確かめられ得る。

30

【0264】

本発明の免疫原性組成物は、アジュバントを含むまたは含まずに投与されてもよい。アジュバントは、免疫原性組成物に直接添加され得るか、またはワクチンの投与と同時にまたは投与直後に、別々に投与され得る。かかるアジュバントとしては、アルミニウム塩（水酸化アルミニウム）、ムラミルペプチド等の特定の刺激剤を含むまたは含まない水中油型乳剤製剤、サポニンアジュバント、サイトカイン、コレラ毒素、百日咳毒素、もしくは大腸菌易熱性毒素等の細菌毒素の解毒された突然変異体が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0265】

本発明の免疫原性組成物は、他の免疫原または免疫調節剤、例えば、免疫グロブリン、サイトカイン、リンホカイン、及びケモカインと共に投与されてもよい。

【0266】

ワクチン接種プログラムは、しばしば、ブースト戦略を含む。初期ワクチン接種後、対象は、当業者によって決定される適切な間隔で1つまたは2つのブースター注射を受けてもよい。一実施形態では、ワクチン接種は、プライム、続いて、1つまたは2つのブーストを含むことができる。抗原の発現をもたらす、抗原、組成物、核酸、またはベクターが、Dengue 熱ウイルス感染に対するワクチン接種のためのブースト戦略で用いるために、本発明において含まれ、任意に、この抗原、化合物、核酸、ベクター、または組成物は、デ

50

ング熱ウイルス、任意に、弱毒化した Dengue 熱ウイルス、及び/または Dengue 熱ウイルス様粒子の（プライム）投与前または（ブースト）投与後の投与のためのものであり、この Dengue 熱ウイルスまたは Dengue 熱ウイルス様粒子は、1 種以上の血清型の Dengue 熱ウイルスの一群であり得、E D E、例えば、上述の非天然 E D E または E D E 化合物を含んでも、提示してもよい。さらなる例として、黄熱病を伴うキメリバックス等の異種フラビウイルスは、例えば、二量体、D N A、ワクシニア、アデノウイルスのうちの一つ以上によって使用してもよく、当業者には明らかであるように、異なる抗原及び/または抗原をコードする核酸の投与の異なる順序及びタイミングが可能であってもよく、本発明は、投与のいかなる特定の組み合わせまたは順序に限定されない。

【0267】

本発明はまた、Dengue 熱ウイルスに対する保護を提供するためのワクチン接種戦略も含み、このワクチン接種戦略は、例えば、

a) 前述の実施形態のうちいずれかに記載の、4 種すべての血清型に対して抗体を作り出すことができるエンベロープ二量体エピトープもしくは E D E 化合物、または前述の実施形態に従うワクチン組成物、またはワクチン接種で用いるための核酸、またはワクチン接種で用いるためのベクターの単回投与、任意に、続いて、弱毒化した Dengue 熱ウイルスの投与、あるいは

b) 前述の実施形態のうちいずれかに記載の、2 種の血清型からの 2 つのエンベロープ二量体エピトープもしくは E D E 化合物の投与、続いて、その他の 2 種の血清型からのエンベロープ二量体エピトープもしくは E D E 化合物の投与、任意に、続いて、弱毒化した Dengue 熱ウイルスの投与、または

c) 弱毒化した Dengue 熱ウイルスの投与、続いて、前述の実施形態のうちいずれかに記載の、4 種すべての血清型に対して抗体を作り出すことができるエンベロープ二量体エピトープの投与、あるいは

d) 弱毒化した Dengue 熱ウイルスの投与、続いて、前述の実施形態のうちいずれかに記載の、2 種の血清型からの 2 つのエンベロープ二量体エピトープもしくは E D E 化合物の投与、続いて、その他の 2 種の血清型からのエンベロープ二量体エピトープもしくは E D E 化合物の投与、を含む。

【0268】

本発明に従ってワクチン接種を受けた患者が、Dengue 熱感染を治療または予防するために用いるための本発明に従う化合物または組成物によるその後の治療を依然として必要とし得ることも想定される。

【0269】

それ故に、本発明の化合物は、Dengue 熱ワクチン接種をこれまでに受けたことがある患者、または Dengue 熱ワクチン接種をこれまでに受けたことがない患者において、Dengue 熱感染を治療または予防するために用いるためのものである。

【0270】

このワクチン接種が 1 種を超える血清型の Dengue 熱ウイルスに対する保護を与える、好ましくは 4 種すべての血清型の Dengue 熱ウイルスに対する保護を与えると見なされるため、ワクチン接種は、患者が既に Dengue 熱感染に罹患している場合、依然として有用であると見なされるが、このワクチンは、好ましくは、Dengue 熱感染の症状の前に、または患者が Dengue 熱感染に罹患していることが分かる前に投与される。

【0271】

それ故に、このワクチン接種は、Dengue 熱にこれまでに感染したことがない患者、及び Dengue 熱に今のところ感染していない、ワクチンの投与時に感染していない患者に用いるためのものである。あるいは、このワクチン接種は、1 種以上の血清型の Dengue 熱感染にこれまでに感染したことがあるが、ワクチンの投与時に感染していない患者に用いるためのものであるか、またはこのワクチン接種は、1 種以上の血清型の Dengue 熱感染にこれまでに感染したことがあり、1 種以上の血清型の Dengue 熱に今のところ感染していない、ワクチンの投与時に感染していない患者に用いるためのものである。

10

20

30

40

50

【0272】

このワクチン接種はまた、本発明の化合物でこれまでに治療したことがあるが、本発明の化合物で現在治療していない患者に用いるためのものであり、これはまた、本発明の化合物でこれまでに治療したことがあり、本発明の化合物で現在治療している患者に用いるためのものである。このワクチン接種はまた、本発明の化合物で初めて治療する患者に用いるためのものである。

【0273】

本発明はまた、薬剤用として、好ましくはデング熱ウイルス感染を予防及び/または治療するために、上に定義される、EDE化合物、例えば安定化組換えsE二量体または免疫原性組成物も提供する。

10

【0274】

本発明はまた、薬剤の、好ましくは、対象におけるデング熱ウイルス感染に対する予防もしくは治療ワクチンの製造のために、上に定義される、EDE化合物、例えば安定化組換えsE二量体または免疫原性組成物も提供する。

【0275】

本発明はまた、デング熱ウイルス感染を予防及び/または治療するための方法も提供し、この方法は、予防及び/または治療を必要とする対象に、上に定義される、EDE化合物、例えば安定化組換えsE二量体または免疫原性組成物を、感受性細胞のデング熱ウイルス感染を阻害するのに有効な量で投与し、それによって感染を予防または治療することを含む。

20

【0276】

本発明はまた、本発明のEDE化合物、例えば、安定化組換えsE二量体、または本発明の化合物、例えば、本発明に従う抗体もしくはその断片を含むか、またはそれらからなる診断用薬剤も提供する。

【0277】

当該診断用薬剤の一実施形態では、この化合物、例えば、本発明に従う抗体もしくはその断片は、検出可能なマーカーに直接的もしくは間接的に、共有結合的もしくは非共有結合的に結合している。

【0278】

検出可能なマーカーは、この化合物、例えば抗体もしくはその断片に、当該抗体もしくはその断片の末端(NまたはC末端)のうちの1つ、または当該抗体もしくはその断片のアミノ酸のうちの1つの側鎖のいずれかに、直接的に及び共有結合的に結合し得る。検出可能なマーカーはまた、当該抗体もしくはその断片に、接続アーム(すなわち、架橋結合試薬)を通して、当該抗体もしくはその断片の末端のうちの1つ、または当該抗体もしくはその断片のアミノ酸のうちの1つの側鎖のいずれかに、直接的に及び共有結合的に結合し得る。ペプチドまたは抗体への対象となる化合物の結合方法は、当該技術分野で公知である。

30

【0279】

有利に、当該検出可能なマーカーは、

- 西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-ホスファターゼ、またはベータ-ガラクトシダーゼ等の酵素、

40

- 緑色蛍光タンパク質(GFP)、スペクトルの紫外線(UV)部分での波長で励起された青色蛍光色素(例えば、AMCA(7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸)、Alexa Fluor 350)、青色光によって励起された緑色蛍光色素(例えば、FITC、Cy2、Alexa Fluor 488)、緑色光によって励起された赤色蛍光色素(例えば、ローダミン、Texas Red、Cy3、Alexa Fluor 色素546、564、及び594)、または電子検出器(CCDカメラ、光電子増倍管)で視覚化される遠赤外光によって励起された色素(例えば、Cy5)等の蛍光色素分子、

- ユーロピウム、ランタン、またはイットリウム等の重金属キレート、

50

- $[^{18}\text{F}]$ フルオロデオキシグルコース、 ^{11}C -、 ^{125}I -、 ^{131}I -、 ^3H -、 ^{14}C -、 ^{35}S 、または ^{99}Tc -標識化合物等の放射性同位体、からなる群から選択される。

【0280】

本発明はまた、対象における Dengue 熱ウイルス感染を診断または観察するために、本発明に従う、E D E 化合物、例えば、安定化組換え s E 二量体、抗体もしくはその断片、または診断用薬剤の使用も提供する。

【0281】

本発明はまた、対象における Dengue 熱ウイルス感染を診断するためのインビトロ方法も提供し、この方法は、

a) 当該対象からの適切な生体試料を、抗体もしくはその断片、または本発明に従う抗体もしくはその断片を含むまたはそれからなる診断薬剤とインビトロで接触させるステップと、

b) 生体試料中の Dengue 熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の存在または不在を判定するステップと、を含む、

Dengue 熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の存在は、対象が Dengue 熱ウイルス感染を有することを示す。

【0282】

ステップ b) は、抗体-抗原複合体（すなわち、Dengue 熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E - Dengue 熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E 複合体に向けられた抗体）の存在または不在を判定することによって実行され得る。

【0283】

本発明はまた、対象からの適切な生体試料中で Dengue 熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の存在を決定するためのインビトロ方法も提供し、この方法は、

a) 当該対象からの当該適切な生体試料を、抗体もしくはその断片、または本発明に従う抗体もしくはその断片を含むまたはそれからなる診断薬剤とインビトロで接触させるステップと、

b) 当該生体試料中の Dengue 熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の存在または不在を判定するステップと、を含む。

【0284】

本発明はまた、対象における Dengue 熱ウイルス感染を診断するためのインビトロ方法も提供し、この方法は、

a) 当該対象からの適切な生体試料を、本発明に従う安定化組換え s E 二量体とインビトロで接触させるステップと、

b) 生体試料中の二量体を対象とする抗体の存在または不在を判定するステップと、を含む、

抗体の存在は、対象が Dengue 熱ウイルス感染を有することを示す。

【0285】

本発明はまた、対象からの適切な生体試料中で Dengue 熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E を対象とする抗体の存在を決定するためのインビトロ方法も提供し、この方法は、

a) 当該対象からの当該適切な生体試料を、本発明に従う安定化組換え s E 二量体とインビトロで接触させるステップと、

b) 当該生体試料中の当該二量体を対象とする抗体の存在または不在を判定するステップと、を含む。

【0286】

本発明はまた、対象における Dengue 熱ウイルス感染の進行または回帰を観察するためのインビトロ方法も提供し、この方法は、

a) 当該対象からの適切な生体試料を、抗体もしくはその断片、本発明に従う抗体もしくはその断片を含むまたはそれからなる診断薬剤とインビトロで接触させるステップと、

b) 生体試料中の Dengue 熱ウイルスエンベローブ糖タンパク質 E の量を判定するステッ

10

20

30

40

50

ブと、

c) ステップ (b) において判定された量を、対象において以前に得られた Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E の量と比較するステップと、を含み、

Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E の量の有意な増加が Dengue 熱ウイルス感染の進行のマーカーを構成し、Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E の有意な減少が Dengue 熱ウイルス感染の回帰のマーカーを構成する。

【0287】

本明細書に使用される場合、「有意な増加」及び「有意な減少」という用語は、当該からの適切な生体試料中の Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E の量と比較して、既に決定され、参照量として使用された、適切な生体試料中のそれぞれ、より高い量またはより低い量の Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E を指す。

10

【0288】

ステップ b) は、抗体 - 抗原複合体 (すなわち、Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E - Dengue 熱ウイルスエンベロープ糖タンパク質 E 複合体に向けられた抗体) の存在または不在を判定することによって実行され得る。

【0289】

本発明はまた、対象における Dengue 熱ウイルス感染の憎悪の良好な予後を予測するためのインビトロ方法も提供し、この方法は、

a) 当該対象からの適切な生体試料を、本発明に従う安定化組換え s E 二量体とインビトロで接触させるステップと、

20

b) 生体試料中の二量体を対象とする抗体を中和する量を判定するステップと、

c) ステップ (b) において判定された量を、対象において以前に得られた二量体を対象とする抗体の量と比較するステップと、を含み、

当該二量体を対象とする抗体を中和する量の有意な増加は当該 Dengue 熱ウイルス感染の憎悪の良好な予後のマーカーを構成する。

【0290】

本発明はまた、Dengue 熱ウイルスの予防注射を受けた対象における Dengue 熱ウイルス感染のワクチン接種プロトコルの成功を観察するためのインビトロ方法も提供し、この方法は、

a) 当該対象からの適切な生体試料を、本発明に従う安定化組換え s E 二量体とインビトロで接触させるステップと、

30

b) 生体試料中の二量体を対象とする抗体を中和する量を判定するステップと、

c) ステップ (b) において判定された量を、対象において以前に得られた二量体を対象とする抗体の量と比較するステップと、を含み、

当該二量体を対象とする抗体を中和する量の有意な増加が当該ワクチン接種プロトコルの成功のマーカーを構成する。

【0291】

当該適切な生体試料は、血液、血清、尿、または肝生検、好ましくは血液であり得る。

【0292】

タンパク質または抗体の量を検出及び決定するための免疫学的方法は、当該技術分野で公知である。例として、EIA、ELISA、RIA、または免疫蛍光試験は、使用することができる。

40

【0293】

本発明はまた、上に定義される突然変異体 s E をコードする単離ポリヌクレオチド、または配列番号 28、142、140、143、144、145、146、または 147 のポリペプチドも提供する。

【0294】

本発明に従うポリヌクレオチドは、組換え DNA 技術及び / または化学 DNA 合成の公知の方法によって得られ得る。

【0295】

50

本発明はまた、いくつかの部品のキットも提供する。ある実施形態は、安定化組換え s E 二量体、または本発明に従う抗体もしくはその断片、及び適切な診断用試薬を含む、対象における Dengue 熱ウイルス感染を診断または観察するためのキットを提供する。

【0296】

適切な診断用試薬は、対象における Dengue 熱ウイルス感染を診断または観察するためのアッセイを行うために必要である。適切な診断用試薬は、溶媒、緩衝液、染料、抗凝固剤であり得る。

【0297】

このキットはまた、マイクロタイタープレートも包含し得る。

【0298】

一実施形態では、部品のキットは、本発明の化合物による治療を必要とする、または前述の実施形態に従う、より高い用量の本発明の化合物を必要とする患者を特定するための手段を含む。このキットは、抗 E D E 抗体及び抗 F L 抗体の存在または不在を特定するための方法を提供してもよく、例えば、このキットは、マイクロタイタープレートを含んでもよく、任意に、マイクロタイタープレートは、線状もしくは変性エンベロープタンパク質でコーティングされ、前述の実施形態のうちのいずれかに従う、E D E エピトープでコーティングされ、かつ/または E L I S A 試験、任意に棒上の比色試験を実行するための試薬も含み得る。好ましくは、このキットは、好ましくは、固体支持体上の抗体の存在または不在を単に特定するための手段を包含する。このキットはまた、Dengue 熱感染を治療または予防するために用いるための本発明の化合物または組成物をさらに含み得る。

10

20

【0299】

ワクチン接種を必要とする患者を特定するための手段を含むさらなる部品のキットもまた、提供される。患者は、抗 E D E 抗体及び抗 F L 抗体の存在及び不在、ならびにそれらのレベルに基づいて、ワクチン接種を必要すると見なされる。したがって、このキットは、抗 E D E 抗体及び抗 F L 抗体の存在または不在を特定するための方法を提供してもよく、例えば、このキットは、マイクロタイタープレートを含んでもよく、任意に、マイクロタイタープレートは、線状もしくは変性エンベロープタンパク質でコーティングされ、前述の実施形態のうちのいずれかに従う、E D E エピトープでコーティングされ、かつ/または E L I S A 試験、任意に棒上の比色試験を実行するための試薬も含み得る。好ましくは、このキットは、好ましくは、固体支持体上の抗体の存在または不在を単に特定するための手段を包含する。このキットはまた、前述の実施形態に記載される、ワクチン接種で用いるための組成物をさらに含み得る。

30

【0300】

さらなるキットは、Dengue 熱感染を治療または予防する手段を包含し、E D E に結合する本発明の 1 つ以上の化合物、または E D E に結合する本発明の化合物を含む組成物を含み、任意に、さらなる治療剤、例えばさらなる抗ウイルス剤を含む。

【0301】

本明細書に言及される任意の化合物または組成物または抗原または抗体は、組成物の一部であってもよいことが理解されよう。この組成物は、P E G 等の安定化剤を含んでもよい。ポリペプチド成分が、例えば、当該技術分野で公知のように、共有結合的に修飾または共役、例えば P E G 化されてもよいことが理解されよう。

40

【0302】

それ故に、例えば、Dengue 熱感染を治療または予防で用いるための任意の化合物もしくは抗体、または任意のポリペプチドもしくは抗原、またはこの抗原もしくは抗体をコードする核酸もしくはベクターは、1 つ以上のさらなる構成要素に共役してもよく、例えばレポーター部分に共役してもよく、または 1 つ以上のさらなる治療剤に共役してもよい。

【0303】

あるそのようなさらなる治療剤は、F c 受容体結合を防ぐための薬剤である。Dengue 熱ウイルスが抗体依存性増強を招くことは公知であり、このことが、このウイルスに結合するが、中和することができないある特定の抗体の産生が原因であると考えられている。こ

50

のことに、Fc受容体を介して抗原の内面化をもたらす、再感染時に増大した反応をもたらす。Fc受容体結合を遮断し得る薬剤が抗体依存性増強を防ぎ得ると考えられている。かかる薬剤かかる薬剤の例は、デング熱感染を治療または予防するために用いるための本発明の化合物、及びワクチン接種で用いるための抗原と共に（または別々に）投与する場合に有用であると見なされている。また、当業者に周知のように、Fc受容体との相互作用が軽減するような抗体分子を修飾または選択することにも有用であり得る。

【0304】

本明細書に記載の任意の薬剤の投与が、典型的に、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、アジュバント、または担体と一緒に薬学的組成物の一部として投与される。それ故に、化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞に関する任意の言及、及びさらなる治療剤の任意の言及は、化合物、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、及び/またはさらなる治療剤（例えば、製剤）を含む薬学的に許容される組成物に同等に適用する。

10

【0305】

この化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸は、ナノ粒子の一部であり得る。

【0306】

投与の経路は、当業者に周知であろう。例えば、本発明の薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤）は、即時、遅延、または制御放出性の適用のために、香料剤または着色剤を含み得る錠剤、カプセル、胚珠、エリキシル、溶液、または懸濁液の形態で、経口、口内、または舌下に投与することができる。本発明の化合物はまた、静脈内注射によって投与してもよい。本発明に従う化合物ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤は、哺乳動物対象、好ましくはヒトに経口投与することができる。それらはまた、当該対象に、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、または皮下注射等の注射によって投与することができる。

20

【0307】

薬剤は、活性成分を含む薬学的薬剤の形態で、任意に非毒性有機または無機、酸または基、添加塩の形態で、薬学的に許容される剤形で、経口または何らかの非経口経路によって投与され得る。治療される疾患や患者及び投与の経路に応じて、薬剤は、異なる投薬量で投与され得る。

30

【0308】

好ましくは、製剤は、1日用量または単位、1日サブ用量またはその適切な断片、週1回の用量、月1回の用量、または6カ月に1回の用量の薬剤または活性成分を含有する単位投薬量である。

【0309】

ヒト治療法では、薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤さらなる治療剤）は、単独で投与することができるが、一般に、意図される投与経路及び標準的な薬学的実践に関して選択される、適当な薬学的賦形剤希釈剤、または担体と混和して投与されるであろう。

40

【0310】

錠剤は、微結晶セルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、二塩基性リン酸水素カルシウム、及びグリシン等の賦形剤、デンプン（好ましくはコーン、ポテト、またはタピオカデンプン）、デンプングリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウム等の崩壊剤、ある種の錯体ケイ酸塩、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、サクロース、ゼラチン、及びアカシア等の顆粒結合剤を含有してもよい。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリル、及びタルク等の潤滑剤が含まれてもよい。カプセルまたは錠剤はまた、胃の安定性を高めるためにコーティングされた腸溶性であってもよい。

50

【0311】

同様の種類の固体組成物はまた、ゼラチンカプセル中の充填剤として用いられ得る。これに関して好ましい賦形剤には、ラクトース、デンプン、セルロース、乳糖、または高分子量のポリエチレングリコールが含まれる。水性懸濁液及び/またはエリキシルについては、本発明の化合物は、様々な甘味剤または香味剤、着色剤または色素、乳化剤及び/または懸濁化剤、ならびに水、エタノール、プロピレングリコール、及びグリセリン等の希釈剤、ならびにこれらの組み合わせと混合してもよい。

【0312】

薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチン）はまた、非経口に、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、髄腔内、脳室内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、または皮下に投与することができるか、またはそれらは、注入技術によって投与してもよい。それらは、無菌水溶液の形態で使用するのが最も良く、この無菌水溶液は、その他の物質、例えば溶液を血液と等張にするのに十分な塩またはグルコースを含有してもよい。この水溶液は、必要ならば適当に緩衝化（好ましくはpH3から9に）しなくてはならない。無菌条件下の適当な非経口用製剤の調製は、当業者には公知の標準的な薬学的技術によって容易に達成される。

10

【0313】

非経口投与に適した製剤は、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬、及び製剤を対象とする受容者の血液と等張の状態にする溶質を含有してもよい水性及び非水性無菌注射液、ならびに懸濁化剤及び増粘剤を含んでいてもよい水性及び非水性無菌注射液を含む。製剤は、単位用量または多用量容器、例えば密封されたアンプルやバイアルの中で提示されてもよく、使用直前に無菌の液体担体、例えば注射用蒸留水の添加だけを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存されてもよい。即席の注射液及び懸濁液は、以前に記載した種類の無菌の散剤、顆粒剤、及び錠剤から調製され得る。

20

【0314】

ヒト対象への経口及び非経口投与のために、薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチン）の1日投与量レベルは、通常、1成人につき1~5000mgであり、単回または分割した用量で投与されよう。

【0315】

それ故に、例えば、本発明の化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチンを含む錠剤またはカプセルは、必要に応じて、一度に、単回または2回もしくはそれ以上の投与のために、活性化化合物の1mg~1000mg（すなわち、約60~120mg/m²）を含有してもよい。いずれにしても、医師は、任意の個々の対象に最も適しているであろう実際の投与量を決定し、投与量は、特定の対象の年齢、体重、及び反応に応じて異なるであろう。上の投与量は、平均的な症例を例示するものである。当然ながら、より高いまたはより低い投与量の範囲が有利である個々の事例があり、このようなものは、本発明の範囲内である。

30

【0316】

薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチン）はまた、鼻腔内または吸入により、投与することもでき、適当な高圧ガス、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、1,1,1,2-テトラフルオロエタン（HFA 134A3または1,1,1,2,3,3,3-ヘプタフルオロプロパン（HFA 227EA3）等のヒドロフルオロアルカン、二酸化炭素、またはその他の適当なガス、を使用する加圧容器、ポンプ、スプレー、または噴霧器からの乾燥粉末吸入器、またはエアロゾルスプレー提供物の形態で好都合に送達される。加圧エアロゾルの場合には、投与量単位は、計測量を送達するためのバルブを装備することによって決定してもよい。加圧容器、ポンプ、スプレー、または噴霧器は、例えば溶媒としてエタノールと高圧ガスとの混合物を使用する、化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベ

40

50

クター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチンの溶液または懸濁液を入れることができ、これは、潤滑剤、例えばソルビタントリオレートを含ってもよい。吸入器または注入器中で使用するためのカプセル及びカートリッジ（例えばゼラチン製）は、本発明の化合物とラクトースまたはデンプン等の適当な粉末基剤との粉末混合物を含有するように製剤化されてもよい。

【0317】

エアロゾルまたは乾燥粉末製剤は、各計測された用量または「パフ」が、対象への送達のために、少なくとも1mgの薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチン）を含有するように、好ましくは、準備される。エアロゾルを用いた全体の1日投与量が、対象毎に異なり、単回用量、またはより一般には、1日を通して分割された用量で投与され得ることが理解されよう。

10

【0318】

あるいは、薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチン）は、坐剤またはペッサリーの形態で投与することができるか、またはそれらは、ローション、溶液、クリーム、軟膏、または散布剤の形態で局所適用されてもよい。本発明の化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチンはまた、例えば、皮膚用パッチの使用により経皮的に投与されてもよい。それらはまた、具体的には、眼の疾患を治療するために、眼の経路によって投与されてもよい。

20

【0319】

眼に使用するためには、薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチン）は、等張の、pH調整した、無菌食塩水中の超微粉懸濁液として、または好ましくは等張の、pH調整した、無菌食塩水中の溶液として、場合により塩化ベンジルアルコニウム等の防腐剤と組み合わせ、製剤化することができる。あるいは、それらは、ワセリン等の軟膏中に製剤化してもよい。

【0320】

皮膚に局所的に適用するためには、薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチン）は、例えば、以下のもの：鉱油、流動ワセリン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン化合物、乳化剤、及び水、のうちの1つ以上との混合物中に懸濁または溶解させた活性化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチンを含む適当な軟膏として製剤化することができる。あるいは、それらは、例えば、以下のもの：鉱油、ソルビタンモノステアレート、ポリエチレングリコール、流動パラフィン、ポリソルベート60、セチルエステル、セテアールアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコール、及び水のうちの1つ以上の混合物中に懸濁または溶解させた適当なローションまたはクリームとして製剤化することができる。

30

【0321】

口内での局所投与に適した製剤には、芳香基剤、通常スクロース及びアカシアまたはトラガカント中に活性成分を含むトローチ剤、ゼラチン及びグリセリン等の不活性基剤、またはスクロース及びアカシア中に活性成分を含む錠、ならびに適当な液体担体中に活性成分を含む口内洗浄液が含まれる。

40

【0322】

概して、ヒトにおける、薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチン）の経口または局所投与は、最も都合がよい好ましい経路である。受容者が嚥下障害または経口投与後の薬物吸収の低下に苦しんでいる状況では、薬物は、非経口で、例えば、舌下または頬側に投与されてもよい。

50

【0323】

家畜への使用のために、薬剤（化合物、ポリペプチド、抗体、その抗原結合部分、組成物、核酸、ベクター、抗原、宿主細胞、さらなる治療剤、ワクチン）は、通常の獣医学診療に従って適切に許容される製剤であり、獣医は、特定の動物に最も適切であろう投与の投与レジメン及び経路を決定するであろう。

【0324】

便宜上、この製剤は、薬学的製剤である。この製剤は、獣医学製剤であってもよい。

【0325】

投与という用語は、1回の投与に制限されないことが理解されよう。投与という用語は、単回投与、長期間にわたる複数回投与、長期間にわたる可変の投与量の投与、長期間にわたる投与の可変手段、1つ以上のさらなる治療剤と併せた投与のうちのすべてを網羅することを含むが、これらに限定されない。投与は、当該技術分野で周知の任意の手段によるものであり得、投与には、経口、静脈内、腫瘍に対して直接的に局所、舌下、または坐薬が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0326】

本明細書における既報文書の列記または考察は、当該文書が最新技術の一部であり、共通の一般知識であることを確認するものと必ずしも理解すべきではない。

【0327】

本発明の所与の態様、特徴、またはパラメータにおける選好及び選択肢は、特に文脈に示されない限り、本発明のすべての他の態様、特徴、及びパラメータにおける任意の及びすべての選好及び選択肢と組み合わせて開示されているよう見なされるべきである。例えば、VDEについての様々な定義は、本発明のすべての態様に関連しており、例えば、デング熱ウイルス感染に対するワクチン接種で用いるためのVDEを含むエピトープは、エピトープ骨格タンパク質のうちの任意の1つ以上を含み得、骨格タンパク質は、ビリオン依存性エピトープに共有結合的に結合する異種骨格タンパク質；少なくともQ77、W101、N153、T155、K310のエンベロープタンパク質；または任意に、ドメインIIの以下の特性、b鎖（残基67～74）、すぐ上流の融合ループ及び残基（残基97～106）、ならびにijループ（残基246～249）のうちの任意の1つ以上をさらに含むドメインIIのエンベロープタンパク質のうちの任意の1つ以上を含み得る。

20

参考文献

1. Bhatt, S et al 2013 The global distribution and burden of dengue. Nature 496: 504 - 507
2. Lindenbach et al 2007 Flaviviridae: the viruses and their replication. 5th edn, Vol. 1 1101 - 1152 (Lippincott Williams & Wilkins)
3. Guzman et al 2000. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. Am J Epidemiol 152: 793 - 799
4. Sangkawibha et al 1984 Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. Am J Epidemiol 1120: 653 - 669
5. Simmons et al 2012 Dengue. N Engl J Med 366: 1423 - 1432
6. World Health Organization. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet no. 117. <http://www.who.int/mediacentre/facts>

30

40

50

heets/fs117/en/(2009).

7. Mongkolsapaya et al 2003 Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever *Nat Med* 9:921-927
8. Kuhn et al 2002 Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion *Cell* 108:717-725
9. Zhang et al 2013 Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* 20:105-110 10
10. Dejnirattisai et al 2008 A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *The Journal of Immunology* 181:5865-5874
11. Kuhn et al 2002 Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108:717-725 20
12. Mukhopadhyay et al 2005 A structural perspective of the flavivirus life cycle *Nat Rev Microbiol* 3:13-22
13. Li et al 2008 The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation *Science* 319:1830-1834
14. Yu et al 2008 Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation *Science* 319:1834-1837 30
15. Junjhon et al 2010 Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles *Journal of virology* 84:8353-8358
16. Fibriansah et al 2013 Structural Changes in Dengue Virus When Exposed to a Temperature of 37C *J Virol* 87:7585-7592
17. Zhang et al 2013 Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:6795-6799 40
18. Bressanelli, S. et al 2004 Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J* 23:728-738
19. Modis et al 2004 Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427:313-319
20. Plevka et al 2011 Maturation of flav 50

- iviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. EMBO reports 12:602-606
21. Rodenhuis-Zybert, et al 2010 Immature dengue virus: a veiled pathogen? PLoS Pathog 6:e1000718
22. Dejnirattisai et al 2010 Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. Science 328:745-748
23. Halstead 2003 Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. Advances in virus research 60:421-467 10
24. Mantel et al 2011 Vaccine 29:6629-6635
25. Osorio et al 2011 Vaccine 29:7251-7260
26. Sittisombut et al 1995 Lack of augmenting effect of interferon-gamma on dengue virus multiplication in human peripheral blood monocytes. J Med Virol 45:43-49 20
27. de Alwis et al 2012 Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. Proc Natl Acad Sci USA 109:7439-7444
28. Wengler & Rey 1999 The isolation of the ectodomain of the alphavirus E1 protein as a soluble hemagglutinin and its crystallization. Virology 257:472-482 30
29. Cockburn et al 2012 Structural insights into the neutralization mechanism of a higher primate antibody against dengue virus. Embo J 31:767-779
30. Wu & Kabat 1970 An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. The Journal of experimental medicine 132:211-250 40
31. Lefranc et al 2009 IMGT, the international IMMUNOGENETICS information system. Nucleic Acids Res 37:D1006-1012
32. Smith et al 2009 Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. Nat Protoc 4:372-384
33. Tiller et al 2008 Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and 50

- expression vector cloning Immunol Method
s 329:112-124
34. Balakrishnan et al 2011 Dengue virus
activates polyreactive, natural IgG B ce
lls after primary and secondary infectio
n PLoS One 6:e29430
35. Wrammert et al 2012 Rapid and massiv
e virus-specific plasmablast responses d
uring acute dengue virus infection in hu
mans Virol 86:2911-2918 10
36. Lin et al 2012 Analysis of epitopes
on dengue virus envelope protein recogni
zed by monoclonal antibodies and polyclo
nal human sera by a high throughput assa
y PLoS Negl Trop Dis 6:e1447
37. Beltramello et al 2010 The human imm
une response to Dengue virus is dominate
d by highly cross-reactive antibodies en
dowed with neutralizing and enhancing ac
tivity. Cell Host Microbe 8:271-283 20
38. Tsai et al 2013 High-avidity and pot
ently neutralizing cross-reactive human
monoclonal antibodies derived from secon
dary dengue virus infection. J Virol 87:1
2562-12575
39. Cherrier et al 2009 Structural basis
for the preferential recognition of imm
ature flaviviruses by a fusion-loop anti
body. EMBO J 28:3269-3276
40. Smith et al. 2013 The potent and broa
dly neutralizing human dengue virus-spec
ific monoclonal antibody 1C19 reveals a
unique cross-reactive epitope on the bc
loop of domain II of the envelope protei
n. mBio 4:e00873-00813 30
41. Wu et al 2000 Human skin Langerhans
cells are targets of dengue virus infect
ion. Nat Med 6:816-820
42. Allison et al 1995 Oligomeric rearra
ngement of tick-borne encephalitis virus
envelope proteins induced by an acidic
pH. J Virol 69:695-700 40
43. Nelson et al 2008 Maturation of West
Nile virus modulates sensitivity to ant
ibody-mediated neutralization. PLoS Patho
g 4:e1000060
44. Backovic et al 2010 Efficient method
for production of high yields of Fab fr
agments in Drosophila S2 cells. Protein E
ng Des Sel 23:169-174 50

45. Gilmartin et al 2012 High-level secretion of recombinant monomeric murine and human single-chain Fv antibodies from *Drosophila* S2 cells. *Protein Eng Des Sel* 25:59-66
46. Yu et al 2008 Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 319:1834-1837
47. Cockburn et al 2012 Mechanism of dengue virus broad cross-neutralization by a monoclonal antibody. *Structure* 20:303-314 10
48. Lok et al 2008 Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. *Nat Struct Mol Biol* 15:312-317
49. Pokidysheva et al 2006 Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell* 124:485-493 20
50. de Alwis et al 2012 Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:7439-7444
51. Kaufmann, B. et al. Neutralization of West Nile virus by cross-linking of its surface proteins with Fab fragments of the human monoclonal antibody CR4354. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18950-18955, doi: 10.1073/pnas.1011036107 (2010). 30
52. Fibriansah, G. et al. Structural changes of dengue virus when exposed to 37°C. *J Virol*, doi:10.1128/JVI.00757-13 (2013).
53. Zhang, X. et al. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6795-6799, doi:10.1073/pnas.1304300110 (2013).
54. McLellan, J. S. et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science* 342, 592-598, doi:10.1126/science.1167283 (2013). 40
55. Aricescu, A. R., Lu, W. & Jones, E. Y. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 1243-1250 (2006).
56. Rodenhuis-Zybert et al 2011 A fusion-loop antibody enhances the infectious p 50

- properties of immature flavivirus particles. *J Virol* 85:11800 - 11808
57. McLellan et al 2013 Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science* 340:1113 - 1117
58. Whittle et al 2011 Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:14216 - 14221 10
59. Ekiert et al 2011 A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 333:843 - 850
60. Zhou et al 2007 Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV1 gp120. *Nature* 44:732 - 737
61. Zhou et al 2010 Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 329:811 - 817 20
62. Papworth et al 1996 Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies* 9:3 - 4
63. WO 2011/050168
64. Sittisombut et al 1995 Lack of augmenting effect of interferon-gamma on dengue virus multiplication in human peripheral blood monocytes. *Journal of medical virology* 45:43 - 49
65. Kabsch et al 2010 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:125 - 132 30
66. Evans & Murshudov 2013 How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69, 1204 - 1214
67. Winn et al 2011 Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67:235 - 242
68. McCoy et al 2007 Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40, 658674 40
69. Navaza, 2001 Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57:1367 - 1372
70. Emsley et al 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 486 - 501
71. Blanc et al. 2004 Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2210 - 2221 50

72. Winn et al 2003 Macromolecular TLS refinement in REFMAC at moderate resolutions. *Methods in enzymology* 374:300-321
73. Afonine et al 2012 Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68:352-367
74. Larkin et al 2007 Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948 10
75. Goujon et al 2010 A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 38:W695-699
76. Klungthong et al 2008 Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *Journal of virological methods* 154, 175-181
77. Tamura et al MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739 20
78. Gouet et al 1999 ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15:305-308
79. Baker et al 2001 Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10037-10041 30
80. Dolinsky et al 2004 PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* 32, W665-667
81. Rey 2013 *Nature* 497:443-444
82. Ofek et al 2010 *PNAS* 107:17880-17887
83. Burton 2010 *PNAS* 107:17859-17860
84. Bommakanti et al 2010 *PNAS* 13701-13706
85. Lee et al *Clinical and Experimental Vaccine Research* 2014 3:12-28 40
- 他の参考文献:
86. Collier & Clements 2011 Dengue vaccines: progress and challenges. *Current opinion in immunology* 23:391-398
87. Murphy & Whitehead 2011 Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annual review of immunology* 29:587-619
88. Sabchareon et al 2012 Protective eff 50

- icacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *The Lancet* 380:1559-1567
89. Oliphant et al 2006 Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein. *J Virot* 80:12149-12159
90. Sukupolvi-Petty et al 2010 Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2. *J Virol* 84:9227-9239 10
91. Goncalvez & Lai 2004 Epitope determinants of a chimpanzee Fab antibody that efficiently cross-neutralizes dengue type 1 and type 2 viruses map to inside and in close proximity to fusion loop of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. *J Virot* 78:12919-12928
92. Lai et al 2008 Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *J Virol* 82:6631-6643 20
93. Costin et al 2013 Mechanistic Study of Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies against Dengue Virus That Target the Fusion Loop. *J Virot* 87:52-66 30
94. Teoh et al 2012 The Structural Basis for Serotype-Specific Neutralization of Dengue Virus by a Human Antibody. *Science translational medicine* 4:139ra83
95. Lawrence & Colman 1993 Shape complementarity at protein/protein interfaces. *J Mol Biol* 234:946-950
96. Tran et al 2012 Structural mechanism of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein activation. *PLoS Pathog* 8:e1002797 40
97. McLellan et al 2011 Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* 480:336-343
98. Chen et al 2010 MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:12-21
99. Millward et al 2007 Design of cyclic peptides that bind protein surfaces with antibody-like affinity". *ACS CHEMICAL B* 50

IOLOGY, vol. 2, no. 9, pages 625 - 634,
 100. Heinis Christian et al 2009 Phage - e
 ncoded combinatorial chemical libraries
 based on bicyclic peptides" NATURE CHEMI
 CAL BIOLOGY, vol. 5, no. 7, pages 502 - 507
 101. WO2009098450

参考文献

【0328】

- Afonine, P. V. et al., Acta Crystallogr D Biol
 Crystallogr 68, 352 - 367 (2012). 10
- Backovic, M. et al., Protein Eng Des Sel 2
 3, 169 - 174 (2010).
- Bhatt, S. et al., Nature 496, 504 - 507 (2013)
- Blanc, E. et al., Acta Crystallogr D Biol
 Crystallogr 60, 2210 - 2221 (2004).
- Chen, V. B. et al. Acta Crystallogr D Biol
 Crystallogr 66, (2010).
- Cockburn, J. J. et al., Structure 20, 303 - 31
 4 (2012a). 20
- Cockburn, J. J. et al., Embo J 31, 767 - 779 (2
 012b).
- Coppieters, K. T. et al., Arthritis Rheum 5
 4, 1856 - 66 (2006).
- de Alwis, R. et al., Proc Natl Acad Sci U
 S A 109, 7439 - 7444 (2012).
- Dejnirattisai, W. et al., Science 328, 745 -
 748 (2010).
- Emsley, P. et al., Acta Crystallogr D Biol
 Crystallogr 66, 486 - 501 (2010). 30
- Evans, P. R. & Murshudov, G. N., Acta Crystal
 logr D Biol Crystallogr 69, 1204 - 1214 (201
 3).
- Fan S. Q. et al., J Biol Chem 287, 11272 - 81
 (2012).
- Gilmartin, A. A. et al., Protein Eng Des Se
 l 25, 59 - 66 (2012).
- Goujon, M. et al., Nucleic Acids Res 38, W6
 95 - 699 (2010).
- Haberz P. et al., Organic Letters, 2006, 8,
 1275 - 1278. 40
- Hemaprabha E., Journal of Pharmaceutical
 and Scientific Innovation 1, 22 - 26 (2012)
- Hermanson G. T., Bioconjugate Techniques,
 3rd Edition. Academic Press (2013).
- Harmsen, M. et al., Vaccine 23, 4926 - 34 (200
 5).
- Kabsch, W. Xds., Acta Crystallogr D Biol C
 rystallogr 66, 125 - 132 (2010). 50

- Kaufmann, B. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 107, 18950 - 18955 (2010).
- Khakshoor, O. et al., Org. Lett. 11, 3000 - 3003 (2009).
- Klungthong, C. et al., Journal of virological methods 154, 175 - 181 (2008).
- Kuhn, R. J. et al., Cell 108, 717 - 725 (2002).
- Laughlin, S. T. et al., Nat Protoc 2, 2930 - 44 (2007).
- Larkin, M. A. et al., Bioinformatics 23, 2947 - 2948 (2007). 10
- Lawrence, M. C. & Colman, P. M. J Mol Biol 234, 946 - 950 (1993).
- Lefranc, M. P. et al., Nucleic Acids Res 37, D1006 - 1012 (2009).
- Lindenbach, B., Thiel, H. & Rice, C. Flaviviridae: the viruses and their replication. 5th edn, Vol. 1 1101 - 1152 (Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
- Lok, S. M. et al., Nat Struct Mol Biol 15, 312 - 317 (2008). 20
- McCoy, A. J. et al., J Appl Crystallogr 40, 658 - 674 (2007).
- McLellan, J. S. et al., Science 342, 592 - 598 (2013).
- Modis, Y. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 100, 6986 - 6991 (2003).
- Navaza, J., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 57, 1367 - 1372 (2001).
- Pokidysheva, E. et al., Cell 124, 485 - 493 (2006). 30
- Rey, F. A. et al., Nature 375, 291 - 298 (1995).
- Sabchareon, A. et al., Lancet 380, 1559 - 1567 (2012).
- Sittisombut, N. et al., Journal of medical virology 45, 43 - 49 (1995).
- Speers, A. E., et al., J Am Chem Soc 125, 4686 - 7 (2003).
- Tamura, K. et al., Mol Biol Evol 28, 2731 - 2739 (2011). 40
- Vincke, C. et al., J Biol Chem 284, 3273 - 84 (2009).
- Winn, M. D. et al., Methods in enzymology 374, 300 - 321 (2003).
- Winn, M. D. et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 67, 235 - 242 (2011).
- Wu, T. T. & Kabat, E. A. The Journal of experimental medicine 132, 211 - 250 (1970).
- Yu, I. M. et al., Science 319, 1834 - 1837 (2007). 50

8) .

Zhang, Y. et al., Structure 12, 1607 - 1618 (2004) .

Zhang, X. et al., Nat Struct Mol Biol 20, 105 - 110 (2013) .

【図面の簡単な説明】

【0329】

【図1】ヒト抗DENVモノクローナル抗体の特徴付け145個のDENV mAbのウェスタンブロット(WB)によるDENVエンベロプタンパク質に対する血清型特異性及び反応(b)WB陽性及びEDE(WB陰性)抗体の血清型特異性。(c)突然変異体VLPのパネルを用いたエピトープマッピングの概略図。突然変異の位置をデング熱エンベロプタンパク質のドメイン構造に対して示し、このうち赤色、黄色、及び青色が、それぞれドメインI、II、及びIIIを表す。W101の周りの融合ループを表し、N153グリコシル化モチーフを妨害する突然変異の位置を示す。

10

【図2】中和アッセイにおいて、EDE抗体は、強力かつ高度に交差反応性がある。中和アッセイは、C6/36昆虫細胞(それぞれ3つのFL、EDE1、及びEDE2)において産生された4種すべてのDENV血清型に対する9つの代表的なmAbについてベロ細胞に行われた。データは3つの独立した実験からのものであった。

【図3】EDE特異抗体は、優れた中和活性を有する。標的細胞としてベロを用いた中和アッセイは、C6/36昆虫細胞C6/36-DENV(a)または樹状細胞DC-DENV(b)から作製されたDENV2に行われた。赤色、青色、及び緑色の棒は、それぞれ、0.05、0.5、及び5ug/ml(最終濃度)のmAbにおけるFRNT(低減率(%))を表した。添付論文で使用されたEDE mAbは、ヒストグラムより下に印を付けられる。抗体は、FL及びEDEに分類されるが、一方、VLP上にマッピングしないWBが陽性である抗体は、非FLと称される。VLPマッピングの結果に基づいて、5つのサブグループのEDEが特定され、EDE15と称された。(c)捕捉ELISAによって測定された結合についての力価曲線、及びFLならびにEDE1及び2群からの2つの代表的な抗体を有するウイルスを産生されたDC及びC6/36の中和反応。このデータは2つの独立した実験からのものであり、それぞれ9つの抗FL抗体及び抗EDE1抗体、ならびに7つの抗EDE2抗体からの結果を代表する。

20

30

【図4】異なる成熟状態でのウイルス粒子への抗体結合。(a)抗prM及び抗EELISAは、様々なウイルス粒子におけるprM:Eの比率を計算するために使用され、100%のprM含量として定義されるLoVo細胞からのウイルスと比較した。(b)C6/36、DC、293T、フリンでトランスフェクトされた293T、LoVo細胞から産生したDENV2、または酸処理したDENV2への代表的なmAbの結合は、捕捉ELISAによって測定された。それぞれ2つのFL、VDE1、及びVDE2 mAbを、酸処理したウイルスに対して感受性があるVDE4 mAbと一緒に示す。このデータは2つの独立した実験からのものであり、8つの抗FL、10の抗VDE1抗体、及び8つの抗VDE2抗体からの結果を代表する。

【図5】個々の患者からのFL対EDE mAb。(a)患者間のFL及びEDE反応の分布を、FL-青色及びEDE-赤色で示す。中央にある数字は、各患者からのAbの数を示し、同一のアミノ酸配列を有する患者752からの3つの複製抗体(1 EDE1及び2 EDE2)のうちの1つの写しをこれ及びすべてのその他の分析から排除した。(b)ADE、U937細胞は、FLまたはEDEに反応する抗E mAbの力価の存在下で、C6/36細胞またはDCのいずれかで成長させたDENV2に感染した。これらの結果は、2つの独立した実験からの中央値のピーク増強(倍)として表される。紫色、青色、緑色、及び赤色の記号は、それぞれ、添付論文(c)FLとEDE mAbとの間のNT50及びNT90力価に使用される、752-2C8、753(3)C10、747(4)A11、及び747(4)B7 mAbを示し、これらはC6/36及びDCウイルスについて比較される。

40

50

【図6】突然変異体VLPのパネルを用いたエピトープマッピングの概略図。突然変異の位置をデング熱エンベロタンパク質のドメイン構造に対して示し、このうち赤色、黄色、及び青色が、それぞれドメインI、II、及びIIIを表す。W101の周りの融合ループを表し、N153グリコシル化モチーフを妨害する突然変異の位置を示す。

【図7】EDE1及びEDE2抗EDE抗体の生殖細胞分析。

【図8】組換えE二量体は、EDE1抗体及びEDE2抗体の両方に結合する。a) BNA(広域中和抗体)Fab断片との複合体としての、または複合体でない、4種のデング熱血清型からの組換えsEタンパク質のSEC/MALS分析。MALSは、sEタンパク質のSECクロマトグラム(緑色の曲線)が単量体画分にのみ対応し、二量体が検出されないことを示した。sE血清型1、3、及び4について観察された2つのピークは、単量体に対応する。最も有力な説明は、二量体の親和性が十分高くなく、二量体-単量体の平衡がゲル濾過カラムにおいて乱されて、その結果、二量体が解離するというものである。Fab断片との複合体は、二量体形態を明らかに安定させ、これは2つのFab断片と複合したsE二量体(赤色の曲線)の溶出を可能にする。遅く溶出するsE単量体画分にみだり複合体に変換され、一方、その他のピークは変化がないことに注目した(このことは、DENV-3 sEで最も明らかであったが、それはその他の血清型についても当てはまる)。DENV-2 sEについては、小分子量に向かってテールを有する単一のsEピークがあり、これは複合体形成時に消失する。この挙動についての説明は、アルファウイルス融合タンパク質E1に関する我々の以前の情報と同様に²⁸、二量体を形成するsEコンピテントを含有する画分の露出した融合ループが、支持体と相互作用する傾向があり、このため溶出画これほどまでに遅くなるというものである。b)EDE2すべて、EDE2 B7、EDE1 C8、EDE1 C10のテザーFab断片を有するsEの相互作用に対応するリアルタイムSPRプロファイル。DENV-4に特異的であるFab 5H2の結合は、そのよく特徴付けられたエピトープ²⁹が二量体界面にはなく、結合のために二量体形成を必要としないことを考慮して、陽性対照として示される。Fab断片がProteon XPR36チップ上の同様の密度に固定化された。4種の血清型(示されるような)からのDENV sEタンパク質の2µM溶液を、すべてのFabにわたって同時に注射した(Online Extended Methodsの項を参照)。SPRシグナルは、秒(秒)単位の時間の関数として反応単位(RU)で提示される。結合のレベルは、パネル(a)における対応する抗体のSEC/MALSプロットに概ね一致していることに留意されたい。

10

20

30

【図9】結晶学的統計学

【図10】非連結型DENV-2 FGA02 sE二量体の結晶構造。a) sEの利用可能な構造との比較。sEのその事前有効形態での3つの利用可能な構造(PDBコード10AN、10KE、1TG8)のうち、PDBコード10ANを有する1つは、非連結型FGA02 sE構造でより小さい標準偏差を示した。b)構造によって示された2つの遺伝子型のDENV-2を位置付ける系統樹。

【図11】4種のEDE抗EDE抗体と複合したDENV2 sE。a)EDE2 A11 Fab断片との複合体。sE二量体は、垂直な2倍の分子軸とウイルス膜に面している側面の下に配向している。sEプロモーターを、ドメイン(I、II、及びIIIをそれぞれ、赤色、黄色、及び青色)により着色された表面として、ならびに融合ループを紫色(bでは、あるプロモーターに対して標示された)として示す。前景及び背景sEサブユニットは、鮮やかな色及び淡い色で区別される。2つのN結合型グリカン鎖(表面には含まれない)を、原子の種類により着色された球棒として示し(炭素を白色、酸素を赤色、窒素を青色)、標示した(N67及びN153)。A11 Fabを、重鎖及び軽鎖をそれぞれ、緑色及び灰色でリボンでの表現で示す。b)2倍軸(中央に「2」と標示された)の下に見られる非連結型DENV2 FGA02 sE二量体。緑色及び灰色の空の楕円(VH及びVLと標示された)は、それぞれ、2倍分子軸により近接したVHを有する、重鎖及び軽鎖の接触部位をおおむね示す。エピトープの説明に関連するポリペプチド部分及びループをc)と標示する。2つの頂上部間で覆われた融合ループ「くぼみ」、一

40

50

方のサブユニット上に b ストランド、及びもう一方に 150 ループを強調する、(b) 中に示される白抜き矢印の下の方の図。d ~ f) c にあるものと同じ図であって、抗 E D E 抗体 E D E 2 B 7 (d)、E D E 1 C 8 (e)、及び E D E 1 C 10 (f) を有する複合体を示す(可変ドメインのみを示す)。(e) 及び (f) 中の白色星は、これらの複合体において不規則である、150 ループの領域に印を付ける。B 7 及び A 1 1 複合体では、C 8 及び C 10 複合体と比較して、軽鎖がドメイン I I I から離れすぎて、それと相互作用できないことに留意されたい。

【図 1 2】抗 E D E 抗体及び s E 二量体の全体的な複合体及びインプリント。各行は、異なる s E / B N A (広域中和抗体) 複合体(非連結型 s E 二量体を示す初めのものを除く)に対応し、各列は、標示されるように、同じ配向を示す。初めの 2 カラムでは、s E 二量体をリボンとして、B N A 可変ドメインを図 1 1 中にあるように色付けされた表面として示す。側面図(左カラム)では、ウイルス膜は、下部にあり得、一方、底面図(中央カラム)はウイルス膜から見られる s E 二量体に対応し、これらの抗体は、s E リボン全域に可視的である。上面図(右カラム)は、ウイルス粒子上の免疫系に提示される s E 表面を示し、白色奥行き手がかりフォグで抗体(緑色)のインプリントを示す。明確にするために、白色輪郭線は、ドメイン I I I の青色表面上に緑色インプリントの範囲を定める。参考のために、左上のパネルでは、前景及び背景サブユニットのグリカン鎖は、それぞれ、赤色及び黒色で標示される。融合ループは、そのループが上中央のパネルにおいて標示される場合、抗 E D E 抗体と接触して他の行において見られ得る。行 c ~ e の左パネルでは、赤色星は、E D E 1 抗 E D E 抗体との複合体において不規則である、150 ループの位置に印を付ける。このループは、行 b の左パネル(赤色に色付けられた炭素を有する棒として示されるグリカン)において見られるように、E D E 2 抗 E D E 抗体によって認識される N 1 5 3 グリカンを担持する。対照的に、すべての抗 E D E 抗体は、N 6 7 グリカンを、最も多い接触を示す C 8 (行 c の左パネル、炭素原子(黄色)を有する棒として N 6 7 グリカン)と接触させるように見られる。行 c 中の青色星は、ドメイン I I I における不規則なループを示す。E D E 2 C 10 (行 d 及び e) は、他の抗 E D E 抗体よりも深く s E 二量体に挿入することに留意されたい。

【図 1 3】様々な B N A 複合体における埋没表面面積

【図 1 4】D E N V - 2 s E 複合体、エピトープ、及びパラトープの静電気の可能性。陰性及び陽性の可能性を有する複合体の見開き提示が示され、下にある棒に従って色付けされた。ある種の領域が複合体において不規則であるため、Online Methods の項において記載されるように作製された D E N V - 2 s E 二量体モデルを使用して、s E 二量体の表面での静電気の可能性を計算した。接触して対応する領域は、同じ色付けされた楕円形によって示されている。

【図 1 5】B N A / 抗原の相互作用に関連する残基。a) 血清型全域において、それぞれ、同一性及び類似性を強調する黒色または薄青色背景において残基を有する、4 種の D E N V 血清型からの s E のアミノ酸配列アライメント。二次構造要素が示され、アライメントの下に標示され、図 1 1 中にあるように色別で示された三次構造を有する。様々な抗 E D E 抗体によって接触された D E N V 2 s E 残基がアライメントの上に示され、これは要所において提供されたコード別に接触した B N A 領域を示す。全シンボルは、参照サブユニット(融合ループをエピトープに寄与するものとして定義される)における接触に対応し、空のシンボルは、二量体界面全域において接触に対応する。配列上の色付けされた箱は、エピトープを作り上げる s E の 5 つの異なる領域を強調する。図 2 4 は、各 B N A との複合体において s E 残基毎の原子接触の数を有するヒストグラムを提供する。E D E 2 B 7 及び A 1 1 接触はとても類似しているため、B 7 接触のみをここでは示す。150 ループ上の疑問符は、これらの残基が E D E 1 抗 E D E 抗体に接触する可能性が高いが、このループが不規則であるため、構造において可視的ではないことを示す。4 種の抗 E D E 抗体のアライメントが結晶化され、K a b a t 定義に従って番号付けされ³⁰、灰色及び白色背景において、それぞれ、F R W 及び C D R 領域を有する。I M G T 変換³¹に対応する C D R を、配列上に青色線で印を付け、標示する。体細胞の突然変異は、赤

10

20

30

40

50

色であり、生殖細胞系において対応する残基は下により小さいフォントで書かれている。VDJ（またはVJ）組換えプロセスから生じる残基は、緑色である。接触されたsE部分（図15a中の色付けされた箱に対応する）は、各配列の上に示され、要所において支持されるようにコードされている。EDE2 C8 Ig - パーレルの二次構造要素は、参考のために、各配列の上に示される。各結晶化複合体におけるBNA残基毎の接触の数のヒストグラムを図26に提供する。

【図16】DENV-2 sEとの様々なBNAの相互作用の比較。a) 同じ立体構造がsE/Fab断片複合体において保持されることを示すために、DENV-2 sE（黄色、3.8Å解像度）との複合体におけるFabすべての可変ドメインに重ね合わせられた非連結型EDE2のすべてのscFv（赤色、非結合、1.7Å解像度）の構造。b) 10 対応するFab/DENV-2 sE複合体の構造から抽出された150ループと一緒に、重ね合わせられたB7（緑色）及びA11（黄色）の可変ドメインを示す立体図。150ループの主鎖は、主にB7のCDRH3におけるY99側鎖のヒドロキシル基がsE T155で水素結合するため、2つの複合体において異なる立体構造を採用することに留意されたい。すべてが、この位置でフェニルアラニンを有し、そのため、ヒドロキシル基を欠失している。A11との複合体においてsEタンパク質は、非連結型sE（示されず）と同じ立体構造を示す。c) B7（sE配列の上）及びA11（この配列の下）の原子接触のヒストグラム。d) c)と同様であるが、sEタンパク質一次構造におけるBNA C10（この配列の上）及びC8（下）によって作られる接触のパターンを示す。e) 20 c)と同様であるが、Eタンパク質配列に従ってC10（EDE1）及びB7（EDE2）を比較する。

【図17】EDE抗EDE抗体及び抗HIVを広域中和抗体PG9におけるH3ループ。FabまたはscFv断片は、同様に配向され、灰色では軽鎖、緑色では重鎖を有し、赤色で強調されたH3ループを有する。比較のために、広い範囲までグリカン鎖を認識し、非常に長いH3ループ（IMGTによって計算される30aa）を有する、強力な抗HIV-1 BNA PG9⁵¹のFab断片が、同じ方法で示される。

【図18】sE二量体界面でのBNA CDRの相互作用。a) 右パネルは、リボンとしてsE二量体を示し、左パネルには、エピトープが拡大され、主な特徴が標示される。行b~dは、リボンが透けて見える半透明の表示でsE表面を示す。グリカン残基は、棒として示された（これらは表面の計算には含まれなかった）。抗EDE抗体の関連CDRループは、図11にあるように色付けされた、sEタンパク質の上部にある棒として側鎖を有するリボンとして示される。行b~dにおける左パネルの配向は、行aの左パネルに対応し、右パネルは、図11b中の矢印に従う図である。水素結合が、点線として示される。

【図19】グリカン鎖との相互作用。a) EDE1 C8 / DENV-2 sE複合体がリボンとして示され、選択された側鎖が棒として、sE表面が半透明の表示で示され、N67グリカンとの相互作用を強調する。少数の水素結合が、点線として示される。150ループは不規則である（密度中断で標示される）。(a)及び(b)の両方では、右パネルは、グリカン鎖に沿った、左パネルの矢印の先の図である。b) EDE1及びEDE2抗EDE抗体が同様の方法で結合することを強調するために、(a)ではC8と同じ配向でB7で示されるEDE2 B7 BNA/DENV-2 sE複合体。EDE2 B7は、融合ループのくぼみにその長いCDRH3を挿入し、一方、その側は、左パネルに見られるように、2つのグリカン鎖に接触する。H3 - らせんは、N153グリカンに対して梱包する。図21c)中に列挙される、抗EDE抗体とsEとの間に多数の水素結合も示される。テキストならびにパネル(a)及び(b)において使用される糖接続性及び命名法への要所。d) 要所に従ってコードされる、抗体と糖残基の接触（図24中と同様）。e) N153グリカンを欠失しているデング熱変異体は、EDE1抗EDE抗体によってより容易に認識されているが、一方、それらは、EDE2抗EDE抗体による中和反応により耐性を示す。平均及びs.e.m.値は、3つの独立した実験から推定された。

10

20

30

40

50

【図20】グリカン鎖についての実験的電子密度。図11にあるように色付けされた、DENV2 sEと複合体形成された、a) EDE2すべてのFab及びb) EDE2 C8 EDE1 Fabのリボンの表示。1シグマ(青緑色)または0.6シグマ(金色)で輪郭された模擬アニーリングオミットマップは、N153(aでは)及びN67グリカン(a及びbでは)(それぞれ、赤色及び黄色の矢印)に対する明らかな密度を示す。不偏マップを作製するために、すべてのグリカン原子は、構造から除去し、すべてのB因子を20Å²に初期化し、構造を、ねじり動的学の模擬アニーリングを用いて再精密化した。抗体足跡が二量体界面全域で2つのグリカンを広げることに留意されたい(図11中にも示される)。c) DENV-2/B7(左パネル)及びDENV-2/C8(右パネル)に対して、それぞれ、パネルa)及びb)の赤色(左パネル)及び黄色(右パネル)の矢印の下に見られる複合体の拡大表示。重及び軽鎖は、表面として示され、グリカン(対応するアスパラギンと一緒に)は、各残基について平均B因子で標示される。また、グリカンは、青色(冷)から赤色(熱)にランプで色付けされる。3つの複合体においてグリカンについてオミットマップを示すために、(c)では、(a)にあるようなDENV-2/A11の代わりにDENV-2/B7について電子密度を示したことに留意されたい。

10

【図21】抗体と抗原との間の極性相互作用。

【図22】デング熱血清型2及び4のsE二量体におけるC10 BNAインプリント。a) ビリオンの外から見られるDENV-2 sEの表面の表示、曝露された主鎖原子橙色(上パネル)、または主鎖原子+厳密に保存された側鎖(橙色)、及び高度に保存された側鎖(黄色)(下パネル)。EDE1 BNA C10(黒色輪郭)及びEDE2 BNA B7(緑色輪郭)のエピトープを示す。b) 図11にあるようなドメインによって色コードされる、C10との複合体から抽出された、DENV-2(上パネル)及びDENV-4(下)のsE二量体の表面。各症例におけるC10足跡を示す。立体構造における非対称に留意されたい。二量体の右手側(両パネルにおける)にある大きな「穴」は不規則なijループによるものであり、左(下パネル、DENV-4 sE/C10)にある小さな穴は不規則なklループによるものである。

20

【図23】DENV-2及びDENV-4 sEとのC10の相互作用の比較。a) C10と複合体形成されたDENV-2(赤色)及びDENV-4(緑色)のsE二量体の構造は、C10部分に重ね合わせられた。sE二量体の軸は、適宜に色付けされた中央に引かれている。明確にするために、重ね合わせが行われたC10 scFvのみが、複合体毎に示される。抗体を重ね合わせる際に、sE二量体は局所的にのみ一致し、描かれているように、二量体軸の若干異なる配向をもたらす。sE二量体は、青色で引かれている軸(灰色/赤色の湾曲した矢印で標示される)周辺に互いに約6度回転し、重ね合わせが右(エピトープB)にあるscFvで行われるよりも、左(エピトープAに結合する)にあるscFvで行われる場合に著しく異なる配向を有し、sE二量体に結合するC10の非対称を強調する。b) C10接触は、DENV-2(上)及びDENV-4 sE(下)のラインメントに表示され、2つの複合体において非常に類似した接触のパターンがあることを示す。配列の背景は、主なテキストにおける図15の背景に対応し、4種の血清型における保存を示す。

30

40

【図24】sE二量体に結合するBNAの検出された非対称。この図は、パネル(a)~(e): a) EDE1 C8/DENV-2 sE、b) EDE1 C10/DENV-2 sE、c) EDE2 A11/DENV-2 sE、d) EDE2 B7/DENV-2 sE、e) EDE1 C10/DENV-4 sE中の、ここに分析された独立したすべての複合体の構造におけるsE残基毎の接触の数のヒストグラムを提供する。各パネルは、2つの部分に分割され、部分(I)は、エピトープを示すために、左(明確にするために、Fab断片の接触ドメインは除去された)、及び完全に除去された抗体を有する右にあるsE二量体の2倍軸の下に見られる免疫複合体を示す。この部分はまた、II中で使用されたエピトープA及びBも定義する。部分(II)は、接触に關与する抗体領域をマッピングするために(括弧では、対応する接触に印を付けるために、図15a中

50

で使用された記号がある)、ヒストグラム棒は要所に示されるように色コードされた、二量体におけるA及びBエピトープに対応する接触のヒストグラムを示す。接触パターンは同じ状態のままであるが、接触の数がs E二量体の2つのエピトープにおいて同一ではないことを留意されたい。DENV-2 s E / EDE2 C10の結晶が非対称単位で2つの複合体を有し(すなわち、2つのs E二量体、それぞれ、2つのC10 scFvを有し)、そのため、合計で、(b)に記載される、A~Dで標示された4つの独立したエピトープの図がある。

【図25】EDE1 C10残基Y100(CDR H3)は、成熟 Dengue 熱ビリオンにおいてF279と相互作用する可能性が高い。a)成熟DENV-2粒子を含む90E/Mヘテロ四量体のうちの1つは、3.5低温EM再構成から抽出され⁹、灰色及び黄色で2つのEサブユニット、ならびに赤色及びサーモン色で2つのMサブユニットを有する側面図(「2」と標示された白色棒として引かれる、2倍軸垂直)で表示される。2つの黒色矢印は、らせん形の膜相互作用領域(水平の「幹」らせん及び垂直なTMらせん)を有する、E外部ドメイン(s Eに対応する)間の接続を示す。MのN末端部分は、E二量体の下で相互作用するように見られる(ピンク色矢印)。b)(c)で拡大された領域が囲まれた、2倍軸の下の方の図。c)この図は、ビリオンEに重ね合わされたC10複合体の両方(DENV-2及び-4 s E)の構造を有する(b)中の図に関して、明確にするために若干傾斜している。これらの標示は、対応する構造の色(DENV-2 s E / C10 緑色 / からし色、DENV-4 s E / C10 青色 / ページュ色の色、ならびにパネル(a)及び(b)にあるようなビリオンEに一致している。Mタンパク質を、サーモン色の表面として示す(白色で標示される)。Mタンパク質は、E二量体の下にあり、二量体界面全域において、k1ヘアピン(矢印間に含まれ、標示された)、また、ijヘアピンの基部を強調し、k1ヘアピンの異なる立体構造を誘発し、そのため、F279(標示された)はEプロトマーの疎水性コア(濃灰色棒)から離れて指し示すが、一方、s Eタンパク質構造(非連結型s Eを含む、示さず)では、それは疎水性コア(緑色及び青色棒、標示された)の一部である。C10のCDR H3におけるY100(標示された)の側鎖は、s Eにおいてそのパートナーを見出さないため、代替の立体構造を有する(Y100はまた、図18d、左パネルにおいても例示される)。CDR H3ループは、Y100がビリオンに観察された立体構造において、F279(血清型全域において保存されている、図15aを参照のこと)との積み重ね相互作用を行い得るのに十分な柔軟性がある。

【図26】抗体残基における接触のヒストグラム。この図は、図24に反映し、この時、抗体側での接触を示す。(a)C8、b)C10(DENV-2 s Eとの複合体から)c)すべて、d)B7、e)C10(DENV-4 s Eとの複合体から)。各パネルでは、パートIは、体細胞突然変異を赤色で、組み合わせから生じる接合残基を緑色で、灰色(VH濃灰色、VL薄灰色)で色付けされた、対応する複合体から抽出されたBNA可変ドメインを示す。接触に参与する側鎖は、球及び棒で表し、標示される。パートIIは、接触するs Eの領域を示すために(括弧では、対応する接触に印を付けるために、図15b中で使用された記号がある)、要所に従って色コードされた、残基毎の原子接触の数のヒストグラムを示す。配列番号付け及び背景は、Kabab変換(図15bにあるような)に対応する。IMGT変換に対応するCDRを、配列上に橙色の点線で表示する。体細胞突然変異は赤色で、VDJ(またはVI)組み合わせから生じる残基は、緑色である。

【図27】他のウイルスを標的にする強力な抗EDE抗体の結合特性との比較。

【図28】血清型1~4からのDengue熱エンベロープタンパク質の配列

【図29】実施例1中に特定されるEDE1及びEDE2型抗体の配列。

【図30】中和試験を行う方法。

【図31】結晶構造由来のエンベロープタンパク質における接触残基。

【図32】共有結合的な架橋DV2 E二量体

【図33】rE DENV2 WT対MT A259CへのEDE1の結合

10

20

30

40

50

- 【図34】 rE DENV2 WT対MT A259CへのEDE2の結合
- 【図35】 rE DENV2 WT対MT A259CへのFLEの結合
- 【図36】 rE DENV2 WT対MT A259Cへの非FLEの結合
- 【図37】 rE DENV2 WT対MT L107C、A313CへのEDE1の結合
- 【図38】 rE DENV2 WT対MT L107C、A313CへのEDE2の結合
- 【図39】 rE DENV2 WT対MT L107C、A313CへのFLEの結合
- 【図40】 rE DENV2 WT対MT L107C、A313Cへの非FLEの結合
- 【図41】 C6/36 DENV2における抗体力価 群1 単量体/単量体 E WTを用いたプライム及びブースト 群2 二量体/二量体 E A259C突然変異体を用いたプライム及びブースト 群3 VLP/VLP prM/Eウイルス様粒子(VLP)を用いたプライム及びブースト 群4 二量体/VLP E A259C突然変異体を用いたプライム、続いて、VLPを用いたブースト 群5 VLP/二量体 VLPを用いたプライム、続いて、E A259C突然変異体を用いたブースト 群6 偽物 非予防接種 10
- 【図42】 交差反応：生ウイルス(プールした血清)への結合 群1 単量体/単量体 E WTを用いたプライム及びブースト 群2 二量体/二量体 E A259C突然変異体を用いたプライム及びブースト 群3 VLP/VLP prM/Eウイルス様粒子(VLP)を用いたプライム及びブースト 群4 二量体/VLP E A259C突然変異体を用いたプライム、続いて、VLPを用いたブースト 群5 VLP/二量体 VLPを用いたプライム、続いて、E A259C突然変異体を用いたブースト 群6 偽物 非予防接種 20
- 【図43】 マウス血清：C6/36 DENV2の中和反応 群1 単量体/単量体 E WTを用いたプライム及びブースト 群2 二量体/二量体 E A259C突然変異体を用いたプライム及びブースト 群3 VLP/VLP prM/Eウイルス様粒子(VLP)を用いたプライム及びブースト 群4 二量体/VLP E A259C突然変異体を用いたプライム、続いて、VLPを用いたブースト 群5 VLP/二量体 VLPを用いたプライム、続いて、E A259C突然変異体を用いたブースト 群6 偽物 非予防接種
- 【図44】 マウス血清：DC DENV2の中和反応 群1 単量体/単量体 E WTを用いたプライム及びブースト 群2 単量体/単量体 E A259C突然変異体(二量体/二量体)を用いたプライム及びブースト 群3 VLP/VLP prM/Eウイルス様粒子(VLP)を用いたプライム及びブースト 群4 二量体/VLP E A259C突然変異体を用いたプライム、続いて、VLPを用いたブースト 群5 VLP/二量体 VLPを用いたプライム、続いて、E A259C突然変異体を用いたブースト 群6 偽物 非予防接種 30
- 【図45】 ADE：プールしたマウス血清：U937 群1 単量体/単量体 E WTを用いたプライム及びブースト 群2 単量体/単量体 E A259C突然変異体(二量体/二量体)を用いたプライム及びブースト 群3 VLP/VLP prM/Eウイルス様粒子(VLP)を用いたプライム及びブースト 群4 二量体/VLP E A259C突然変異体を用いたプライム、続いて、VLPを用いたブースト 群5 VLP/二量体 VLPを用いたプライム、続いて、E A259C突然変異体を用いたブースト 群6 偽物 非予防接種 40

【0330】
 7人の患者からの試料(表1)を使用して、DENVエンベロープタンパク質に反応する145のヒトモノクローナル抗体を産生した³²、³³。形質芽球(CD3⁻、CD20^{lo}、CD19⁺、CD27^{hi}、CD38^{hi})は、末梢血から分類され、E1ispositは、抗DENV抗体に分泌されたこれらの細胞の5090%を示し、これはその他で報告される頻度と一致した³⁴、³⁵。これらの抗体のうちの84%は、4種すべ 50

でのDENV血清型に対して反応し、13%は2または3種の血清型に対して反応し、わずかに3%が単一の血清型に対して反応した(図1a)。

【表1】

患者id	重症度	感染症の血清型	血清	疾患の回数	形質芽球対全CD19+細胞の頻度(%)	DENV特異的B細胞対全IgG+IgM分泌細胞の頻度(%)	抗EAbの数	κ/λ
747	DHF	DENV2	二次	6	64.9	76.9	18	7/11
749	DF	DENV1	二次	4	56.7	62.4	11	1/10
750	DHF	DENV1	二次	5	67.9	71.5	17	5/12
751	DF	DENV1	二次	4	32.7	75.6	15	8/7
752	DHF	不明	一次	4	68.3	47.0	32	3/1
753	DHF	DENV1	二次	5	74	89.9	35	17/18
758	DHF	不明	二次	5	ND	ND	17	6/11

表1. この研究に登録されたDENVに感染した患者の概略

【0331】

初期抗体スクリーニングは、抗体の完全に代表的なパネルを得たことを確認するために、組換えタンパク質または固定細胞よりもむしろ、捕捉された全ビリオンを用いたELISAによって行われた。抗体のうちのわずかに57%が、ウエスタンブロットによってDENVエンベロープに対して反応し(図1a)、WB陰性mAbはまた、ELISAによって組換えEに対して反応することができなかった。これは、WB反応性及び無傷ビリオンに存在するエピトープのみを認識するものである2つの広範な群に抗体をグループ化させ、ここより、ビリオン依存性エピトープまたはエンベロープ二量体エピトープ(VDEも

10

20

30

40

50

しくはE D E)への反応性としてこれらの抗体を指す。WB陽性抗体の大部分は、4種のウイルス血清型の間で完全に交差反応性があり、一方、E D E E D E m A bについては、62のうちの41が完全に交差反応性があり、さらに、62のうちの17がD E N V - 1、2、及び3に対して反応する(図1b)。各群からの3つの抗体については、C6/36昆虫細胞において産生されたウイルスにおける中和アッセイを図2中に示す。融合ループ及びE D E E D E抗体は、4種すべてのウイルス血清型に対して広く中和した。E D E E 2 7 4 7 (4) A 1 1及び7 4 7 (4) B 7については、D e n 4に対してより低い活性があり、このことは、D e n 4株H 2 4 1における位置N 1 5 3でN結合型グリカンの欠失に関連する。

この実施例及びその他の実施例に関連する方法

10

【0332】

試料。血液試料は、書面によるインフォームド・コンセントに従って入院患者から回収された。研究プロトコルは、英国では、熱帯病病院の科学的倫理委員会、O x f o r d 熱帯研究倫理委員会、及びR i v e r s i d e 倫理委員会によって承認された。デング熱感染の実験室での確認は、D E N V 核酸(感染する血清型も確認した)のR T - P C R 検出、N S 1 抗原側方流動試験、またはI g M E L I S A 試験におけるセロコンバージョンによって決定された。疾患重症度は、1997年の世界保健機関の基準に従って分類された。この研究に登録された患者のうち、2人の患者が軽度の症状のデング熱(D F)として分類され、5人の患者が血漿漏出及びデング出血熱(D H F)の出血を有する重度の症状として分類された(表1)。二次感染は、1.8未満のデング熱特異的I g MのI g G に対する比に基づいて定義された⁷。B細胞選別のための血液試料は、血液形質芽球集団が明白であった時点の入院期間中に回収された。P B M Cを、F i c o l l - H y p a q u e 密度勾配遠心分離によって全血から単離し、直接の使用のために、10% F C S / R P M I 中に再懸濁した。

20

【0333】

細胞及び抗体。蚊アエダスアルボピクタス由来のC6/36細胞株を、L e i b o v i t z L - 1 5 中で28で培養した。ベロ、U937、及び293Tまたはフリんでトランスフェクトされた293T細胞を、それぞれ、M E M、R P M I 1 6 4 0、及びD M E M 中で、37で成長させた。すべての培地に、10%加熱不活性化したウシ胎仔血清(F B S)、100ユニット/mlのペニシリン、100µg/mlのストレプトマイシン、及び2mMのL-グルタミンが補充された。フリン欠失L o V o細胞株を、A T C C から購入し、推奨されるように、F - 1 2 中で維持した。単球由来の樹状細胞(D C)を、上述のように調製した¹⁰。

30

【0334】

ヒトC D 3、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 7、及びC D 3 8 (B D P h a r m i n g e n)、抗ヒトI g G - A L P (S i g m a)、及び抗ヒトもしくはマウスI g G - H R P (D A K O)に対する抗体をこれらの実験において使用した。抗D E N V エンペロープ、4 G 2、及び抗D E N V p r M、1 H 1 0、マウスモノクローナルA bは、D r C . P u t t i k h u n t 及びD r W . K a s i n r e r k (P u t t i k h u n t, 2 0 0 3)からの贈呈物であった。抗D E N V N S 3、E 1 D 8は、E v a H a r r i s 博士からの贈呈物であった。

40

【0335】

ウイルス資源。デング熱ウイルス血清型1 (H a w a i i)、血清型2 (1 6 6 8 1)、血清型3 (H 8 7)、及び血清型4 (H 2 4 1)を、C6/36細胞中で成長させた。さらに、D E N V 2を、D C、L o V o、293T、及びフリんでトランスフェクトされた293T中で繁殖させ、無細胞の上清を回収し、-80で保存した。ウイルス力価は、ベロ細胞におけるフォーカス形成によって決定され、1ml当たりのフォーカス形成単位(F F U)として表された²⁶。

【0336】

D E N V 特異的ヒトモノクローナルA b sの作製。D E N V 特異的ヒトm A b sは、活

50

性化したB細胞/形質芽球から作製された³²、³³。簡潔に言えば、PBMCを、抗CD3、CD19、CD20、CD27、及びCD38で染色した。次いで、活性化した抗体分泌細胞(ASC)を、CD19⁺、CD3⁻、CD20^低、CD27^高、CD38^高としてゲート化した。単一のASCを、RNase阻害剤(Promega)を含有する96ウェルPCRプレートの各ウェル中に分類した。プレートを短時間遠心分離を行い、-80℃で保存する前にドライアイス上で凍結させた。次いで、RT-PCR及び入れ子PCRを、IgGに特異的なプライマーのカクテルを用いてガンマ、ラムダ、及びカッパ遺伝子を増幅させるように行った。次いで、重鎖及び軽鎖のPCR産物は、適切な制限エンドヌクレアーゼで消化させ、IgG1、Ig、またはIg 発現ベクターにクローン化し、Hedda Wardemann博士からの贈呈物であった。抗体を発現するために、重鎖及び軽鎖プラスミドは、ポリエチレンイミン法によって293T細胞に共トランスフェクションし、抗体上清をさらなる特徴付けのために収穫した。

10

【0337】

ELISPOTアッセイ。Elispotプレート(Millipore)を、抗ヒトIg(Invitrogen)または紫外線で不活性化したDENV1~4のいずれかでコーティングした。プレートをRPMIで洗浄し、1%BSA/RPMIで1時間遮断した。選別されたASCを、500個の細胞で抗Ig及びDENVでコーティングしたウェルに添加し、37℃で5%CO₂中で一晩インキュベートした。プレートを洗浄し、ビオチン化した抗ヒトIgG及びIgM(Sigma)で室温で2時間インキュベートし、続いて、ストレプトアビジン-ALP(Sigma)でインキュベートした。反応物を開発し、スポットをAID Elispotプレートリーダーを用いて計数した。

20

【0338】

ELISAによるDENV-特異度及び血清型の交差反応性の検出。DENV1~4及び偽物の非感染上清を、抗E Abs(4G2)でコーティングされたMAXISORP免疫プレート(NUNC)上に別々に捕捉した。次いで、DENV捕捉ウェルを、1ug/mlのヒトmAbでインキュベートし、続いて、ALP共役抗ヒトIgGでインキュベートした。この反応を、PNPP基質の添加によって可視化し、NaOHで停止した。吸光度は、405nmで測定した。

【0339】

組換え可溶性DENVエンベロープタンパク質ELISA。プレートを、150ngの組換え可溶性Eで直接コーティングし、ウシ血清アルブミン(BSA)を陰性対照抗原として使用した。次いで、タンパク質でコーティングされたウェルを、1ug/mlのヒトモノクローナルAbsでインキュベートし、続いて、ALP共役抗ヒトIgGでインキュベートした。PNPP基質を最後に添加し、この反応は、405nmで測定した。

30

【0340】

ウエスタンブロット分析。ウエスタンブロット分析のために、C6/36細胞からのDENV上清を、非加熱及び非還元条件下で調製し、12%SDSポリアクリルアミド(polyacrylamide)ゲルで泳動し、ニトロセルロース膜(Amersham)上に電気泳動した。次いで、膜を、5%スキムミルクで遮断し、DENV特異的ヒトmAbsでプローブ化し、続いて、HRP共役抗ヒトIgG Absでプローブ化し、膜を増強した化学発光基質(Amersham)で成長させた。

40

実施例2-突然変異分析は、EDE抗体及びWB反応性抗体が異なるエピトープに結合することを示す。

【0341】

mAbsによって認識されるエピトープのより洞察力を得るために、ビリオン表面上にあると予測される溶媒曝露された溶媒曝露された残基でアラニン置換を含有する65個のウイルス様粒子(VLP)を作製した。これらは、成熟ウイルス粒子の3D構造から得られた⁴、⁷、⁸。これらの突然変異体VLPは、ELISAによって145個のモノクローナル抗体に対してスクリーニングされた²²、³⁶。抗体結合の80%超の低減をもたらした突然変異は、有意であると見なされた。このパネルを用いて、145個のうちの1

50

12個のmAbを、エンベロープタンパク質におけるエピトープに割り当てた。33個の抗体は、これらのすべてがWBによってEに反応し、突然変異体VLPパネルを用いてマッピングされないままであった。エピトープマッピングの結果を図1c中に示し、さらに詳細には図6中に示す。これらのエピトープは、2つの群に広くクラスタ化され得る：

【0342】

群1：融合ループ、上述のまたは古典的な融合ループエピトープ(FL)を定義する101Wの内外の制限的な残基セット。WBにおいてエンベロープに結合する、83個のうちの46個の抗体は、位置101Wで突然変異に対して感受性があり、多くの抗DENV mAbの結合に対して主要な残基であることがこれまでに示されている^{37, 38}。FL特異的mAbのうち、46個のうちの40個は、W101突然変異のみに対して感受性があるが、一方、その他のエピトープは、残基W101、G106、及びL107の組み合わせを含有した。ウエストナイルウイルスからのエンベロープタンパク質に結合するFL mAb E53の結晶構造は、bcループにおいて、残基104~110との接触を示すが、101Wとの接触を示さず、残基74~79との接触を示す³⁹。1C19 mAbと同様に、FL特異的mAbのうちのみが、アミノ酸76~79をアラニンに変化した場合に、結合が欠失したbc-loopループにおける変化に対して感受性があった⁴⁰。

10

【0343】

群2：EDE抗体；これらは、VLP突然変異体への反応性のパターンに基づいて、5つの異なる亜群に細分類され得る(図1c及び図6)。EDE抗体の大部分は、融合ループ残基101の変化に対して感受性があったが、エピトープがさらにより広範であり、ドメインI、II、及びIIIにおいてさらなる決定基を有する場合に、上述の古典的な「融合ループ」特異的抗体と混同するべきではない。EDE抗体の大部分は、EDE2において残基153及び155での変化に対する感受性によって分化される、2つの異なる亜群であるEDE1及びEDE2の間で分割され得、これは、N結合型グリコシル化部位を妨害するであろう。12個の抗体は、異なるエピトープ及び機能を有する3つのさらなる亜群を構成し、EDE3 mAbは、EDE1 mAbと同様であったが、107L及び295Kでの変化に対しても感受性があった。EDE4は、101Wでの変化に対して感受性がなく、酸性化したウイルス粒子に最良に反応した(図4b)。最後に、EDE5 mAbは、一群の5 mAbを構成し、これらは融合ループ101Wのみに結合するが、このエピトープは、無傷ピリオンにおいてのみ反復し、EDE3、4、及び5はすべて、不完全に中和する抗体である 図3a及びb。

20

30

【0344】

VLP変異誘発実験は、EDEが1つを超えるエンベローププロトマーを含む複合四級エピトープであることを示唆している。

方法

【0345】

ウイルス様粒子(VLP)突然変異体を用いた抗体エピトープマッピング。DENV1の完全長prM/Eを、VLP(Aleksandra Flanagan博士によって構成された)を作製するために、発現ベクターpHLsecにクローン化した⁵⁵。VLP突然変異を、PCRベースの部位特異的突然変異誘発法によって生成した⁶²。変異原性PCRは、Pfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen)を用いて、Eタンパク質における選択したアミノ酸残基をアラニンと置換するために行われ、すでにアラニンである場合、突然変異はグリシンになされた。DpnI(NEB)処置後、PCR産物を大腸菌に形質転換した。すべての突然変異は、配列決定によって確認された。プラスミドは、ポリエチレンイミン法によって293T細胞株にトランスフェクションし、培養上清をエピトープマッピングのために収穫した。

40

【0346】

エピトープ特異的Abを特定するために、WT及び突然変異体VLPをマウス抗prM(1H10)で捕捉した。次いで、DENV特異的抗E Abを1~5ug/mlで添加

50

し、続いて、抗ヒトIgG - ALPを添加した。最後に、PNPP基質を添加し、反応をNaOHで停止し、吸光度を405nmで測定した。相対的認識指数を、[突然変異体VLPの吸光度 / WT VLPの吸光度] (試験mAbによって認識される) / [突然変異体VLPの吸光度 / WT VLPの吸光度] (一連の4種混合mAbによって認識される)として計算した。

実施例3 - WB反応性抗体は、EDE抗体とは異なり、ヒト樹状細胞で作製されたウイルスを完全に中和することができない。

【0347】

DENV感染中、宿主は、2つの形態のウイルスで存在し、初期曝露は、昆虫細胞において産生したウイルスによるものであり、一方、ヒト細胞において産生したウイルスは、その後の感染周期を促し、感染中に引き起こされる莫大な量のウイルスを示す。これらの2つの異なるウイルス形態を見るために、蚊に刺されたあとから皮膚へのウイルスの注入後に感染し、感染したヒト宿主におけるウイルス複製の部位であると考えられる、C6/36昆虫細胞(C6/36-DENV)または単球由来の樹状細胞(DC-DENV)において産生したDENV-2ウイルスを比較した²⁰。

10

【0348】

83個のWB陽性mAbのうち、46個がFLにマッピングされ、37個がまだマッピングされていない結合部位であることが認識された。驚くべきことには、83個すべてのWB陽性抗体が、高濃度であっても、DC-DENVを完全に中和することができず、1個のみが、5ug/mlで80%超まで中和した(図3a及びb)。一方、EDE1及び2抗体の大部分は、DC-DENVを80%超まで中和することができ、多くが100%中和に達した。代表的なmAbについての完全結合及び中和曲線(図3c)は、抗FLmAbがELISAによるDC-DENV(青色x印)への結合を低減したことを示し、DCウイルス感染(青色丸印)を完全に中和することができず、一方、EDE mAbにおける中和反応及び結合曲線は、より密接にC6/36及びDC-DENVとは反対である。

20

方法

【0349】

中和及び増強アッセイ。mAbの中和の可能性は、感染した病巣の数の低減が対照(抗体なし)と比較する場合に、フォーカス低減中和試験(FRNT)を用いて判定した²²。簡潔に言えば、連続希釈したAbをウイルスと混合し、37°Cで1時間インキュベートした。次いで、混合物をベロ細胞に移し、3日間インキュベートした。次いで、フォーカス形成アッセイは、抗E mAb(4G2)を用いて行い、続いて、HRP共役されたウサギ抗マウスIgGを用いて行った。この反応は、DAB基質の添加によって可視化した。フォーカス低減の割合は、各抗体希釈について計算された。50%のFRNT値は、SPSSパッケージからのプロビットプログラムを用いて、低減率対Abの濃度のグラフから決定された。

30

実施例4 - 抗EDE抗体は、高比率のprMで、またはエンベロープタンパク質が三量体立体構造を採用した場合にウイルスと結合することができない。

【0350】

これらの異なるウイルス形態を提示するために、6つのDENV-2の調製物と結合する抗体を比較した。prM切断の割合を評価するために、ELISAによってprM:Eの比率を測定し、これを、フリン活性を欠き、ほぼ完全に非完成成熟ウイルス粒子を完全な成分のprMで産生するLoVo細胞において産生したDENVに正規化した¹⁷(図4a)。ウイルス調製物は、1)56%の比較的高いprM含量を有するC6/36-DENV、2)13%のprM含量を有するDC-DENV、3)100%に近いprM含量を有するフリン欠失LoVo細胞(LoVo-DENV)において産生したウイルス²²、4)5%のprM含量を有するフリン(フリン-293T-DENV)を過剰発現する293T細胞において産生したウイルス、5)60%のprMを有する天然293T細胞(293T-DENV)において産生したウイルス、及び6)E三量体立体構造を不

40

50

可逆的に採用する pH 5.5 でインキュベートされたウイルス（酸性 DENV）であった⁴²。

【0351】

EDE1 及び 2 mAb は、恐らく、三量化が立体構造エピトープを妨害するため、酸性 DENV と結合することができなかつたか、または恐らく、prM の完全相補体が prM/E スパイクを支持するため、LoVo-DENV と結合することができず、これらは、成熟エンベロープ二量体エピトープを再度妨害し得るか、または EDE への接近を立体的に妨げ得る（図 4b）。抗 FL mAb は、低 prM 含量のウイルスへの低減した結合を示し、DC-DENV 及び 293T-フリニ-DENV に対する結合曲線を、DENV を産生した C6/36 の右側に 1.5 ~ 2 ログシフトした。さらに、LoVo-DENV への結合は、C6/36 DENV よりもさらになお効率的であり、融合ループ抗体の曝露及び有効な結合における prM の重要性を強調した³⁹、⁴³。3 人の別々の個体から単離した 4 種の EDE 4 抗体は、酸処理したウイルスに対して最も有効に結合したが、これらは無視することができる中和反応を示した（図 4b）。

方法

【0352】

DENV 結合 ELISA。異なる細胞型から生成した DENV への Ab の結合親和性を決定するために、偽物、C6/36、DC、293T、フリニでトランスフェクトされた 293T もしくは LoVo 細胞から産生した DENV2、及び酸処理した C6/36 DENV2 を、4G2 でコーティングされたプレートに捕捉し、次いで、連続希釈の DENV 特異的ヒトモノクローナル Ab でインキュベートし、続いて、ALP 共役抗ヒト IgG でインキュベートした。この反応を、PNPP 基質の添加によって引き起こし、NaOH で停止した。吸光度は、405 nm で測定した。異なるウイルス形態の抗原負荷及び実験の間の OD 読み出しの日間の変動は、ドメイン III の DENV2 に特異的であるヒト化バージョンの十分に説明された 3H5 mAb を用いて対照 ELISA によって正規化された。

実施例 5 - 特定の患者内の抗体は、免疫優勢を示す

【0353】

本明細書に記載される抗 DENV mAb は、EDE が FL 抗体のより制限されたエピトープで重複する場合に、重複特異性のある複合体アンサンブルである。個々の患者内のこれらの抗体群（FL 対 EDE）を比較した場合に、FL エピトープまたは EDE エピトープのいずれかの選択への選好を示す非対称のレパートリー（skewed repertoire）を見出した（図 5a）。個体内の認識のこの免疫優勢は、驚くべきことであった。エピトープが重複する場合に、最も結合力のある抗体が、他の抗体を競合除去し、親和性成熟し得ることが可能であり、それ故に、FL と EDE との間に確率的選択をもたらす反応に優勢である。しかしながら、EDE または FL への反応は、個体内でポリクローナル（異なる VDJ の組換え）であり、このことは、説明としてはあまり可能性が低い。

実施例 6 - 抗 EDE 抗体は、低減したレベルの感染の抗体依存性増強をもたらす

【0354】

U937 細胞を発現する Fc 受容体における DENV 感染を増強する抗体の能力を試験した。試験したすべての抗体は、ADE を引き起こしたが、FL 群と比較した場合に、EDE 群において約 4 ~ 8 倍低く、FL 群対 EDE 群における平均ピーク増強は、C6/36-DENV において 3745 : 545 であり、DC-DENV において 2070 : 480 であった（図 5b）。

方法

【0355】

ADE アッセイについては、連続的に希釈された Ab を、37 °C で 1 時間ウイルスで予めインキュベートし、U937 細胞（Fc 受容体を担持するヒト単球細胞株）に移し、4 日間インキュベートした。上清を収穫し、フォーカス形成アッセイによってペロ細胞に滴

10

20

30

40

50

定した。ウイルス力価は、1 ml 当たりのフォーカス形成単位 (FFU) として表し、増強倍率は、抗体の不在下でウイルス力価と比較することによって計算された。

実施例 7 - 抗 EDE 抗体は組換え sE 二量体に結合する

【0356】

構造研究のために、A11、B7、C8、及び C10 と称されるここから、特定された 4 種の最も強力な抗 EDE 抗体：747 (4) A11 及び 747 B7 (EDE2) 及び 752 - 2 C8 及び 753 (3) C10 (EDE1) を選択した。EDE2 抗 EDE 抗体の両方を、同じ患者 (DENV-2 による二次感染があった) から単離し、IGHV3 - 74 及び IGLV2 - 23 生殖細胞系由来の体細胞変異の同じ IgG クローンである。重鎖は、非常に長い (26 アミノ酸) 相補性決定領域 3 (CDR H3) を有する。EDE1 抗 EDE 抗体を、異なる患者から単離し、対応する生殖細胞系は、VH 及び VL 遺伝子 IGHV3 - 64 及び IGKV3 - 11 (EDE1 C8、この患者は、不確定の血清型の一次感染を有した) 及び IGHV1 - 3* 及び IGLV2 - 14 (EDE1 C10、二次 DENV-1 感染を有する患者から) に由来する。これらの抗体における遺伝子の分析を、図 7 中に要約する。

10

【0357】

組換え sE タンパク質 (エンベロープタンパク質の外部ドメインの 400 アミノ末端残基、「可溶性 E」については「sE」と称される) 及び抗原結合部分 (Fab)、ならびに側鎖可変ドメイン (scFv) の抗 EDE 抗体を、Drosophila S2 細胞において産生した⁴⁴、⁴⁵。抗 EDE 抗体が標準的な ELISA アッセイにおいて組換え sE タンパク質と反応しなかったため、二量体形成を好むように、高濃度で溶液中の精製した組換え DENV sE との抗体断片の相互作用を試験した。多角度光散乱 (MALS) 実験と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、組換え DENV-1、-2、-3、及び -4 sE の二量体 / 単量体平衡が、図 8 a 中に示されるように、様々な種の分離時のサイズ排除を誘発した解離効果にもかかわらず、ほとんどの場合、2 つの抗体断片で sE 二量体に対応する複合体として溶出する抗体断片によって二量体にシフトしたことを示した。このことは、表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析によってさらに確認した (図 8 b)。

20

実施例 8 - 結晶構造

【0358】

交差反応性の決定基を確認するために、4 つの選択された抗 EDE 抗体の断片と複合体形成された DENV-2 sE 二量体、及び EDE1 C10 と複合体形成された DENV-4 sE を含む、合計 7 つの結晶構造において決定した。使用した DENV-2 sE 二量体が構造がすでに利用可能であるものとは異なる株に属するため、抗体によって誘発される立体構造の可能な変化を検出するために、非連結型 sE 二量体を結晶化した。さらに、非連結型 A11 scFv の長い CDR H3 が抗原の不在下で同じ立体構造を維持したかどうか明らかでなかったため、非連結型 A11 scFv の構造を決定した。結晶化手順を、実施例 15 に記載し、結晶学的統計を図 9 中に列挙する。

30

DENV-2 sE 株 FGA02、遺伝子型 III

【0359】

血清型 2 のアジア / アメリカ遺伝子型 III¹¹ に属する、DENV-2 野外株 FGA02 (仏領ギアナにおいて 2002 年に単離された) からの組換え sE を用いて、構造研究の大部分を行った。FGA02 sE は、外部ドメインの 394 残基 (3%) にわたって散乱した、予め結晶化した DENV-2 sE⁵、⁷ と比較して、13 アミノ酸差異を示す。予想通りに、3 分解能構造の FGA02 sE は、PDB (受入番号 1OAN、1OKE、1TG8) に沈着する様々な構造において観察された立体構造の範囲内に収まる、そのプレ融合型における DENV-2 sE の既に利用可能な構造を有する小さな差異のみを示す (図 10)。非連結型 FGA02 sE の構造が、この株の E タンパク質の特異的なアミノ酸配列によるものではないことを示すことによって、抗体結合が疾患を誘発する領域、具体的には、150 ループ (以下を参照のこと) を評価する際に有用であっ

40

50

た。

実施例 9 - エンベロープ二量体エピトープ

抗 E D E 抗体は、s E 二量体界面で結合する

【0360】

F G A 0 2 s E 免疫複合体の結晶構造は、二量体 (s E 二量体における各抗 E D E 抗体のインプリントを提供する、図 1 2 の E D も参照のこと) の両サブユニットと相互作用する、4 種の抗 E D E 抗体が同様の方法で結合することを示す (図 1 1) 。重鎖は、2 倍軸 (すなわち、二量体の中心) により近接して結合するが、一方、軽鎖は、末梢に位置付けられる。エピトープは、低 p H ^{4 6} に曝露される未成熟 D E N V 粒子において E 二量体上に p r M タンパク質のインプリントで大きく重複する。それらは、ドメイン I I 側上の b ストランド、及び (二量体界面の向かいにある、図 1 1 c) ドメイン I 側上の「150 ループ」によって形成されたくぼみの中心に置かれている。150 ループは残基 148159 に広がり、ドメイン I の ストランド E₀ 及び F₀ に接続し、二量体におけるパートナーサブユニットの融合ループの上にある N153 グリカンを持する。重鎖は、二量体界面を横断する、2 つのグリカン鎖、N67 と N153 との間の距離を広げる (図 1 1 c ~ f) 。1 エピトープ当たりの全埋没表面は 1050² ~ 1400² の範囲に及び、表面相補係数^{1 3} は、0.67 ~ 0.74 であり、これらは抗体 / 抗原複合体に典型的な値である (図 1 3) 。エピトープ及びパラトープの表面静電電位は、軽く荷電され、比較的相補的な電荷分布を有する (図 1 4) 。

保存された残基はエピトープを作り上げる

【0361】

抗 E D E 抗体は、4 種の血清型を横断する高度に保存された残基において本質的にクラスタと接触し (図 1 5) 、これはそれらの交差反応性を説明する。B7 及び A11 の 26 残基長 C D R H3 は、エピトープを形成する両方の s E サブユニットにおいて E D E 2 抗 E D E 抗体接触の大部分を占める。H3 ループは、抗原の凹面に相補的な凸形状を採用する、パラトープにおいて突出を作る (図 1 1 d) 。H3 突出は、非連結型 E D E 2 A11 s c F v の 1.7 分解構造によって示されるように、抗体において予め形成され、これは結合に対してエントロピー消費がないことを示す (図 9、16、及び 17) 。エピトープへの融合ループに貢献するものとして定義される参照サブユニットにおいて、E D E 1 及び E D E 2 抗 E D E 抗体は両方とも、ドメイン I I の 3 つの主なポリペプチドセグメント (図 1 5 a 中において囲まれた) 、つまり、b ストランド (N67 グリカンを担持する残基 67 ~ 74) 、すぐ上流の融合ループ及び残基 (a a 97 ~ 106) 、ならびに i j ループ (a a 246 ~ 249) に群がる同じ血清型の不変残基を標的とする。E D E 1 抗 E D E 抗体の軽鎖及び重鎖の両方が 3 つすべての C D R を介して参照サブユニットと相互作用するのに対して、E D E 2 抗 E D E 抗体は、本質的には、重鎖と相互作用し、C D R L3 から少数の軽鎖のみと接触する (図 1 8) 。界面の向かいにある、反対側のサブユニットにおいて、標的とされる s E セグメントは、2 つの E D E 基とは異なる。E D E 2 抗 E D E 抗体は、150 ループ及び N153 グリカン鎖と相互作用するが (以下を参照されたい) 、一方、E D E 1 抗 E D E 抗体は、結合時、150 ループの障害を誘発する。これは、マウス D E N V 交差反応性抗体^{4 7}、^{4 8} に対してこれまでに構造的に特徴付けられている「A ストランド」エピトープの領域において、E D E 1 抗 E D E 抗体における軽鎖を s E により接近させ、ドメイン I I I と相互作用することが可能である。これらのドメイン I I I 接触面は、保存された s E 残基 K310 の中心に置かれ、重要な安定化 s E 二量体接触面において、側鎖は融合ループの W101 のインドル環を覆う蓋を作製する (図 1 8) 。軽鎖は異なる V L 遺伝子に由来するが (図 7) 、E D E 1 C10 及び C8 の両方は、ドメイン I I I と接触するために、C D R L1 及び L2 残基を使用する (図 1 5 及び 図 1 8) 。ドメイン I において、E D E 1 C10 は、(E タンパク質の N 末端 50 アミノ酸に散乱した、図 1 5 a、または 図 1 8 d、左パネルにおいて丸く囲まれた箇所を参照されたい) 150 ループの下に保存された残基と相互作用するようにその比較的長い C D R H3 (21aa、図 7) を挿入するが、一方、E D E 1 C8 のより

短いH3ループはこの領域に達することができない。

実施例10 - グリカン鎖の抗体認識

【0362】

抗EDE抗体は、Eの位置N67及びN153の両方でグリカン鎖との広範な接触面を作る(図19及び図20)。4種すべての抗EDE抗体は、CDRH2接触面を介してN67グリカンと相互作用し、したがって、N67グリカン⁴⁹と特異的に相互作用することが示された樹状細胞のDC-SIGN受容体への結合を妨げるであろう。DENV-2 sE/EDE1 C8複合体は、重鎖のフレームワーク領域3(FRW H3、図15b及び図18c)と接触する遠位マンノース残基を有する最高位のN67グリカン構造を示す。EDE1 C10(その生殖細胞系に非常に近接している、図7)を除いて、多くのFRW H3残基は、変化し(図15b)、このことは糖を認識する親和性成熟を示唆している。さらなるグリカン残基が構造において可視的であった場合、その他の抗EDE抗体にも同じFRW H3残基の相互作用が見られ得る可能性がある。

10

【0363】

N150ループ及びN153グリカンがEDE1複合体において不規則であるが、抗体とドメインIとの間の限定された空間(図19a、左パネル)は、このグリコペプチドセグメントが抗体(図15Aにおける150ループの上の疑問符によって示されるように)と接触するが、平均して結晶中に分解された電子密度がないようにするために、各複合体において可変の局所的な立体構造を採用することを示唆している。150ループが所定の位置に残存した場合、EDE1抗EDE抗体のCDRH3ループは、N153グリカン、例えば、DENV-2 sE/EDE1 C10における第1のGlcNAc残基(図19中の糖1)と衝突し得る。

20

【0364】

電子密度は、EDE2抗EDE抗体(図20中に示される、省略マップを含む)との複合体の結晶におけるsEのN153グリカンのコア6糖残基において明らかである。EDE2抗EDE抗体のCDRH3は、第1のN153 GlcNAc残基のN2原子によって提供される水素結合によって覆われているそのC末端末端のカルボニル基のうちの1つを用いて2回転 - らせん(H3らせんと称される、図11d)を作製する(図21)。H3らせんは、N153グリカンの糖残基1、3、及び4を包むように、Y99(EDE2 A11中のF99)及びY100の芳香族側鎖を横方向に突出する。グリカン、マンノース4、5、及び6の最も遠位の残基は、いくつかの水素結合を含む、CDRL2からの残基を介して、軽鎖と接触させる(図19及び図21)。

30

【0365】

EDE1及びEDE2抗EDE抗体が150ループ及びN153グリカンで生み出す異なる種類の相互作用は、それらの中和効率におけるグリカンの不在の対照的な効果に反映される。例えば、位置155にイソロイシンを有するDENV-4単離体(すなわち、153-NDT-155グリコシル化モチーフを欠いている天然グリコシル化突然変異体)は、グリカン鎖によるCDRH3の衝突がないため、EDE1抗EDE抗体による中和反応に対してより感受性がある。対照的に、この変異体は、EDE2抗EDE抗体による中和反応に対してより耐性があり(図19e)、N153グリカンの観察された特異的認識の重要性を強調する。

40

実施例11 - 結合決定基としての融合ループの主鎖立体構造

【0366】

融合ループでは、残基101-WNGG-104は、二量体界面の向かいにあるドメインIIIに向かってW101側鎖を突出する歪んだらせん回転を作る。EDE2抗EDE抗体との複合体において、融合ループのらせん回転は、2つのらせんのC末端側でカルボニル基が互いに向き合うように、H3らせん下である。さらに、CDRH3のS100Cは、複合ループにおいてG102のカルボニル基に主鎖及び側鎖の水素結合を作製することによってらせん回転を覆っている。EDE1抗EDE抗体との複合体において、融合ループは、それに対してパッキングする重鎖及び軽鎖の両方のいくつかの芳香族残基の

50

側鎖を有する、VH/VL界面の右下にある。具体的には、VL主鎖は、G104の主鎖カルボニル基に水素結合を提供することによって非常に近接してEDE1 C8において、主鎖アミドプロトドナーは、CDR L3からのN93に属するが、一方、EDE1 C10において、それは、CDR L1からのN31に属する。C10及びC8の両方のCDR L2における残基D50は、K310(図19a及び図18d)で塩橋を形成し、これは、この領域では極性相互作用の広範なネットワークの一部である(図21中に列挙される)。

【0367】

E二量体におけるグリシンリッチな融合ループの立体構造は、主鎖を本質的には曝露するが、一方、側鎖は、ほとんど埋没している。ijループの主鎖と共に、主鎖原子は、b ストランドの片方の端によって増大される大きな表面パッチを形成し、これは抗EDE抗体によって認識される不変の曝露された表面をもたらす。E二量体表面(図22a、下パネル)で曝露された主鎖と共に、この領域における不変の側鎖は、実質的には、周囲で非保存残基を有する、不変の血清型であるコア領域のエピトープをもたらす。この変換の理由は、粒子成熟時のprMとの相互作用に関連する可能性が高い^{4 6}。最小の保存領域は、EDE1エピトープ内のドメインIIIの表面である。

実施例12 - EDE1 C10と複合体形成されたDENV-4 sEの構造

【0368】

抗EDE抗体がいかに複数のウイルス血清型を効果的に認識することができるかを詳細に理解するために、アミノ酸配列において他のデング熱血清型とは最も異なり(図15a)、また、EDE抗EDE抗体によって強力に中和される(図19e)ため、我々はDENV-4に戻った。C10 scFvと複合体形成された2.7 分解能結晶構造のDENV-4 sEは、不規則な150ループを有する、DENV-2 sE(図22b及び図23)との複合体において観察された一般的なパターンを確認した。予想通りに、抗EDE抗体は、主鎖と、エピトープの保存された側鎖と同じ相互作用を示す。ドメインIIIにおけるEDE1エピトープのより可変な横方向領域において(図22a)、接触部位は、DENV-4においてはアスパラギン酸であるが、DENV-2においてはバリンである残基309の側鎖を含む(図15a)。後者の複合体では、CDR L2の側鎖V309とT52のVan der Waalsパッキングがあるが、一方、前者の複合体では、D309がT52側鎖からの水素結合を受容する極性相互作用がある(図23b及び図21)。ドメインIIIとの他の接触はまた、具体的には、主鎖カルボニルへの水素結合を含む、位置362のものも維持される(図21)。

【0369】

EDE1 C10は、DENV-2 sEにおいて150ループの不規則性を誘発するが、DENV-4 sEの場合に、このループは、5H2と称される非関連チンパンジー抗体のFab断片と複合体形成されたその結晶構造によって示唆されているように、固有のより高い移動性を示すように思われる(参照^{1 7})。実際には、5H2エピトープはまた、ドメインIにもあるが、sE二量体の側面にあり、本明細書に記載される抗EDE抗体エピトープで重複しないが、150ループは、その構造において不規則であった。さらに、DENV-4 sE/EDE1 C10複合体の構造は、二量体の2つのエピトープによる抗EDE抗体の接触での無視することができない非対称の度合いを強調した(図23、図13、及び図21)。この非対称性はまた、図24中に示されるように、DENV-2 sEとの複合体において検出可能であった。確率的に、第1の抗体断片の結合は、sE二量体の非対称の立体構造の調節を誘導し、第2の抗体断片が結合する場合に、第2のエピトープの利用可能な立体構造に適応するように、第2の部位に影響を及ぼす可能性が高い。総合すれば、これらの観察は、EDE1抗EDE抗体の結合決定基が、EDE2抗EDE抗体で共有される領域において、エピトープの保存されたコアにあり、いずれかの端での接触が、結合に支障を来さない各血清型に存在する特定の側鎖に適応することを強く示唆している。E二量体のこの観察された柔軟性は、抗体との相互作用における通常隠れたエピトープを曝露する、ピリオンにおけるE二量体の立体構造の呼吸の報告と一

10

20

30

40

50

致している。

実施例 13 - 成熟ビリオンにおける推定上のさらなる E D E 1 C 1 0 / E 二量体の相互作用

【0370】

構造の精密な検査は、E D E 1

C 1 0 の C D R H 3 の先端が s E 二量体 (図 1 8 d、左パネルにおいて丸く囲まれており、また、図 1 5 a 及び図 1 2 d ~ e も参照されたい) の「底部」に達し、無傷ビリオンの文脈において、領域は、下の方のタンパク質 M によって強化されることを示す (図 2 5)。D E N V - 2 の無傷成熟粒子の 3 . 5 分解能の低温 E M 構造 (参照⁹) は、M との相互作用が、ドメイン I I の疎水性コアにおいて埋没される代わりに、二量体界面で曝露されるように (図 2 5 c)、E の k 1 ヘアピンの底部に保存された残基 F 2 7 9 をもたらず (図 1 5 a) ことを示す。D E N V - 2 s E / C 1 0 構造による重ね合わせは、ビリオンの文脈において、曝露された F 2 7 9 側鎖が H 3 ループにおいて Y 1 0 0 と相互作用し得ることを示す。Y 1 0 0 が、D E N V - 4 と比較して、D E N V - 2 s E との異なる相互作用をすると見られ (図 2 5 c ; E D 図 2 6 においてパネル b 及び e も比較する)、このことはその正確なパートナーを見出さないことを示唆している。それ故に、成熟ビリオンにおける E 二量体上の E D E 1 C 1 0 結合部位は、組換え s E 二量体によって完全には反復しないと思われる。この観察は、s E 二量体への E D E 1 C 1 0 の弱い結合の間の明らかな相違 (図 8)、ならびに 4 種の Dengue 熱血清型 (低い n M 範囲における N T 5 0、添付の原稿を参照されたい) からのウイルスの強力な結合及び中和反応を恐らく説明している。重要なことは、成熟ビリオンにおける F 2 7 9 の立体構造が疎水性リガンドに結合する s E で観察されたものと同様であり⁴、このことは免疫原として組換え s E 二量体のこの領域の正確な立体構造を誘導することが可能であることを示唆している。

実施例 14

【0371】

Dengue 熱に感染した患者において引き起こされたヒトモノクローナル抗体によって標的とされる主要な新しいエピトープと相互作用する抗 E D E 抗体のスナッフショットを提供した。これらの抗体は、E D E 2 の例にあるように相互作用のほとんどを行う非常に長い C D R H 3 を有する重鎖を必要とするか、または主鎖の接触を、ここで分析された E D E 1 抗 E D E 抗体については融合ループ及びドメイン I I I への主鎖の接触を有する軽鎖及び重鎖の微調整された組み合わせを得る、全く異なる進化経路を介して同じ特異性に向かって集中していると思われる。E D E 1 及び E D E 2 抗 E D E 抗体は、付随する研究における Dengue 熱患者から単離された抗体のほぼ 3 分の 1 の抗体を含み、ビリオン表面で立体構造に特異的な四級エピトープを認識するものの大部分を構成する。アラニン走査実験 (添付の原稿) からのそれらの一般的な特徴は、それらがすべて、本明細書に記載される同じ四級エピトープを標的とすることを強く示唆している。

【0372】

重要なことには、E D E 抗 E D E 抗体の結合決定基は、全体的に E 二量体に対して限局性であり、異なるフラビウイルス、西ナイルウイルス^{5 1}における研究に基づいて、D E N V 粒子^{5 0}上の四級エピトープについて最近示唆されているように、ビリオン表面で高次配置の二量体に応じて異ならない。D E N V - 2 粒子の最近の低温 E M 分析は、杉綾模様パターンが、互いに再配向し、対称性配置を弛緩し、及び / または異なる表面パターンを表す二量体で、ヒトにおいて生理的温度で妨げられ得ることを示唆している^{5 2、5 3}。したがって、本明細書に記載されるエピトープは、膨張に独立して、または粒子に独立しない、E 二量体に接近可能であり、次世代のワクチンに対して好ましい標的物であり得る。当然の結果として、我々の結果は、呼吸器合胞体ウイルス (R S V)^{5 4}に対して最近提案されているように、E 二量体のみが免疫系に提示されるような方法で、二量体の接触を安定化し、それ故に、感染性ビリオンの表面で通常接近可能ではない不良な免疫原性領域に対して抗体を誘発することを避けることによって、強力な免疫原を設計するのに適したものであることを示す。

10

20

30

40

50

【0373】

E D E 抗 E D E 抗体の主な結合決定基は、無傷 E 二量体の文脈において、融合ループ及びその隣近所の主鎖の立体構造であると見られる。これは、添付の原稿においてヒトから単離された、その他の主要なクラスの抗体との著しい対照であり、これは、四級組織から独立する文脈において、融合ループ配列を認識する。後者の抗体は、交差反応性があるが、不良に中和し、潜在的に強力な感染増強を有する^{5 6}。本明細書に記載されるエピトープの注目に値すべき特徴は、曝露された主鎖原子の数であり、E D E 1 の場合において、複合体に埋没された全表面面積の約 30% を占め、E D E 2 抗 E D E 抗体については 20% を占めるが（このより低い E D E 2 の割合は、概して、不変のグリカン組成物の 40% で補正される）（図 13）、一方、一般の主鎖原子において、分析されるほとんどの免疫複合体については、5% ~ 15% 貢献する。例えば、立体構造^{5 7} という点において、E D E 抗 E D E 抗体がそうであるように、安定化させる、プレ融合形態の R S V 融合タンパク質のみに提示する「抗原部位 0」に結合する、呼吸器合胞体ウイルス（R S V）に対する D 2 5 抗体等のある種の非常に強力な中和抗体もまた、抗原において高い割合（約 30%）の主鎖原子も認識する（図 27）。血球凝集素（H A）^{5 8} の受容体結合ポケットに結合することによって広範囲の H 1 インフルエンザウイルス単離体を中和する、B N A C H 6 5、または H 1^{5 9} の幹の基部に結合することによって、H 3、H 7、及び H 10 単離体に対して中和活性のある強力な群 2 の反応性のある抗インフルエンザヒト B N A である C R 8 0 2 0 を有する、同様のパターンが、見出される。C R 8 0 2 0 はまた、本明細書に記載される E D E 抗 E D E 抗体と同様に、プレ融合三量体立体構造において、四級構造の文脈ないに融合ペプチドの主鎖立体構造も認識する。最後に、非常に広範な抗 H I V - 1 抗 E D E 抗体のうちの 2 つの B 1 2（参照^{6 0}）及び V R C 0 1（参照^{6 1}）は、エンベロープ（E N V）タンパク質における C D 4 結合部位を認識し、エピトープにおいて 36% 及び 33% の主鎖原子を示し（図 27）、このことは主鎖立体構造の認識が多きの（すべてではないが）抗 E D E 抗体によって共有される重要な態様であることを示唆している。これらの抗 H I V - 1 広域中和抗体は、有効な結合^{2 9} のために E N V 三量体の正確な四級構造も必要とし、長い親和性成熟プロセスを受け、生殖細胞系からの 20% 超の相違を示すが、一方、デング熱に対する E D E 抗 E D E 抗体は、生殖細胞系からの最大 9% の相違であり（図 27）、このことは、適切な免疫原がワクチン接種用に使用される場合、個体内に比較的容易に発生することを示す。

【0374】

結論として、デング熱ウイルスに対する強力な高度に交差反応性のある抗体における高度に保存された結合部位を説明した。最近の弱毒生多価デング熱ワクチンの不良な有効性は、ヒトにおける防御反応をよりよく理解し、次世代の有効なワクチンを設計するために、差し迫った必要性を生み出す。血清型特異的免疫は、しばしば、それらの四価製剤を要求するデング熱ワクチンの目標である。我々の結果は、安定化 E 二量体を含むサブユニットワクチンが評価されるべきであり、単一の最適化された普遍的な免疫原が可能であり得、抗 E D E 抗体の誘出が成功したデング熱ワクチンにおける実現可能な目標として見なされるべきであることを示唆している。

実施例 15 - さらなる方法

【0375】

D E N V 血清型 1 ~ 4 からの組換え s E タンパク質、ならびに F a b 及び s c F v B N A 断片は、上述のプロトコル^{4 4}、^{4 5}、^{2 9} を用いて、D r o s o p h i l a m e l l a n o g a s t e r S c h n e i d e r 2 において産出された。s E タンパク質への B N A 断片の結合は、S E C / M A L S 及び S P R によってモニタリングされた（図 8）。s E / B N A 複合体の結晶は、S E C による混合物から複合体を単離することによって、または E D E 1 C 1 0 の場合において、s E : 抗体が 1 : 2 の二段燃焼率において 2 つを混合することによって得られた。結晶化試験は、ロボット環境下の施設を使用して行われた。回析データは、シンクロトロン源 S O L E I L 及び E S R F で回収され、構造は、関連の結晶学的統計学も提供する、図 9 中に列挙される検索モデルを用いた分子置換

によって決定された。DENV-4変異体における中和試験は、添付の書類に概説されたものと同じ手順を用いて行われた。

組換えsEタンパク質に産生

【0376】

組換えDENV-1 FGA/89 sE(1-395)、DENV-2 FGA02 sE(1-395)、及びDENV-3 PAH881 sE(1-393)を、いくつかの修飾を用いて、DENV-4 sE(Den4_Burma/63632/1976)のために上述されるDrosophila S2細胞において、本質的に産生した²⁹。簡潔に言えば、sE発現は、メタロチオネインプロモーターによって起動し、昆虫X PRESS培地(Lonza)における5µMのCdCl₂によって誘導した。この構築物は、トランスフェクトされたS2細胞のERへの効果的な転座のためにprM-sE構築物のN末端終端で融合されたDrosophila BiPシグナル配列を有した。prMは、DENVポリタンパク質前駆体等の場合、prMのN末端を有するsE、及びERにおけるシグナラーゼ切断によって生成されたsEへのN末端を提示し、prM(膜に固定された状態である)がsEの融合ループを覆うことによってシャペロンの役割を果たす。prM/sE複合体は、prMがpr(sEに結合するN末端の半分)及びM(膜に固定されたC末端の半分)にフリンによって切断される場合に、酸性分画を横断して運搬される。外部環境、sE、及びpr解離物に達する際に、sE成分を、細胞の上清流体からの親和性クロマトグラフィーによって精製する。DENV-3及び-4 sE構築物がtwin-strep-tag(IBA、<http://www.iba-lifesciences.com/twin-strep-tag.html>)によるC末端融合を有するが、一方、DENV-1及び2 sEは、6xHis C末端タグを有した。浄化した細胞上清を、Vivaflow接線濾過カセット(Sartorius、カットオフ10kDa)を用いて20倍に濃縮し、構築物に応じて、二価イオンを除去するために、緩衝液交換後、StrepTactin親和性精製またはHisTrap-HPクロマトグラフィーのいずれかを用いたAKTA FPLCシステムでの精製前に、0.5M NaClまで調節した。Hisタグタンパク質(DENV-1及び-2 sE)を、HisTrapカラムの溶出後に脱塩し、MonoQにおけるイオン交換クロマトグラフィーによってさらに精製した。50mM Tris pH8、500mM NaCl中で平衡したSuperdex 200 10/300 GLカラムを用いた最終精製SECステップを、すべての構築物で行った。

Fab及びScFvの産生

【0377】

BNA断片を、Drosophila S2細胞において、Fab⁶²及びscFv⁶³としての発現のためにプラスミドにクローン化した。構築物は、親和性精製のために、C末端(Fabの場合において、重鎖のみの)で融合されたtwin-strep-tagを含む。精製プロトコルは、strepタグsEタンパク質のために上述と同じステップを含み、同じ緩衝液を使用した。

免疫複合体の形成及び単離

【0378】

精製したDENV sEタンパク質を、標準的な緩衝液(500mM NaCl、Tris 50mM pH8.0緩衝液)中でFabまたはScFv(約2倍のモル過剰において)と混合した。この体積を、Vivaspin 10kDaカットオフでの遠心分離によって0.2mlにして、4で30分間のインキュベーション後、この複合体を、複合体において明らかなピークが得られなかった場合を除いて、SECによって過剰なFabまたはscFvから分離した(BNA C10と同様に、図8を参照されたい)。この場合において、抗原:抗体のモル比が1:2の混合物(すなわち、過剰な抗体を有する)を、結晶化のために直接使用した。すべての場合において、緩衝液を、結晶化試験のために、150mM NaCl、15mM Tris、pH8に交換した。280nmで光学密度を測定し、アミノ酸配列から推定される減衰係数を用いることによって決定される、

10

20

30

40

50

結晶化のために使用されるタンパク質濃度を、図9に列挙する。

MALS分析

【0379】

150 µgの精製したDENV-1、-2、-3、及び-4 sEを、300 µgのA11、B7、C8、及びC10 Fab断片と混合し、全容積を100 µlに調節した。

個々のタンパク質

(DENV sEまたはFab)はまた、同じ濃度で対照として別々に泳動させた。

試料を室温で15分間インキュベートし、流速0.4 ml/分でSDX200 10/300 GLゲル濾過カラム泳動から溶出した場合に、MALSによって分析した。この溶出は、続いて、屈折率測定法及びDAWN Heleos-Optilab T-rEX設定(Wyatt Technology)でのMALS検出を行った。

表面プラズモン共鳴

【0380】

抗EDE抗体の捕捉Fab断片へのsE二量体の結合のリアルタイムSPR測定は、ProteOn XPR36装置(BioRad)を用いて行われた。

【0381】

DENV-4特異的中和抗体5H2のFab断片は、対照として使用された。ビオチン化した抗ヒトCH1特異的抗体(Life Technologies)は、Neutravidin ProteOn NLCセンサチップ上に固定化し、異なるFab断片の同様の密度(400~500 RU)を捕捉するために使用した。この抗CH1抗体は、軽鎖サブクラス(カッパ/ラムダ)とは無関係にすべてのIgGサブクラス(1、2、3、及び4)を認識する。この抗CH1抗体はまた、より低い親和性を有するが、チンパンジー抗体の5H2と交差反応することも見出した。抗HCV E2抗体のFab断片は、陰性対照として使用した。このチップは、Fab捕捉後、90°回転させ、4種のDENV血清型のsEを、2 µMの濃度で注射した。泳動緩衝液(50 mM Tris pH8、500 mM NaCl、0.01% Tween20)を用いた空注射を二重参照のために使用した。SPRシグナルは、捕捉したFabの量に正規化した。すべてのFabにわたって同様の濃度で風疹ウイルスE1糖タンパク質の外部ドメインの対照注射は、明らかな結合がないことを示した(データ示さず)。

DENV-4グリコシル化変異体を用いた中和アッセイ

【0382】

抗EDE抗体の中和の可能性は、感染した病巣の数の低減が対照(抗体なし)と比較する場合に、フォーカス低減中和試験(FRNT)を用いて判定した²²。DENV-4株H241(位置155でIleを有する)、1-0093、及び1-0554(両方とも、位置155でThrを有し、それ故に、Asn153でグリコシル化を還元する)を、C6/36細胞中で成長させた。ウイルス力価は、ベロ細胞におけるフォーカス形成によって決定された⁶⁴。簡潔に言えば、連続希釈した抗EDE抗体をウイルスと混合し、37で1時間インキュベートした。次いで、混合物をベロ細胞に移し、3日間インキュベートした。次いで、フォーカス形成アッセイは、マウスモノクローナル4G2抗体(すべてのフラビウイルスからのEタンパク質と交差反応する)、続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼで共役されたウサギ抗マウスIgGを用いて行った。この反応は、ジアミノベンジジン基質の添加によって可視化した。フォーカス低減の割合は、各抗体希釈について計算された。50%のFRNTは、統計的パッケージSPSSを用いた「プロビット」(<http://www.statisticalassociates.com/probitregression.htm>)を用いて、低減率対Abの濃度のグラフから決定された。

結晶化及び3D構造決定

【0383】

結晶化試験は、400 nlの滴の固定において行われた。滴下は、96 Greinerプレートの形式で等体積のタンパク質及びリザーバー溶液を、Mosquitoロボッ

10

20

30

40

50

トを用いて混合することによって形成し、Rock-Imagerによってモニタリングした。結晶は、400nlの滴の固定において、ロボット化したMatrix Maker及びMosquito設定で、または2~3µlの懸滴を用いて24ウェルプレート中で手動で最適化した(図9)。回析データ収集における結晶化及び冷凍冷却条件を図9中に列挙する。

【0384】

X線回析データを、SOLEILシンクロトロン(St Aubin, France)でビームラインPROXIMA-1及びPROXIMA-2、ならびにEuropean Synchrotron Radiation Facility(Grenoble, France)でID23-2及びID29で回収した(図9)。回析データを、XD Sパッケージ⁶⁵を用いて処理し、CCP4パッケージソフト⁶⁷の他のプログラムと組み合わせて、SCALAまたはAIMLESS⁶⁶で計測した。構造は、図9中に列挙された検索モデルを用いて、PHASER⁶⁸及び/またはAMoRe⁶⁹との分子置換によって決定した。

10

【0385】

続いて、COOT⁷⁰との慎重なモデル構築、プログラムBUSTER/TNT⁷¹との結晶学的精密化のサイクルを交互に行い、最終モデルをもたらした。精密化は、非結晶学的対称性を尊重するように抑制し、結晶の分解能に応じて、標的拘束(高分解能構造の複合体の部分有する)及びTLS精密化⁷²を使用した(図9を参照のこと)。最終省略マップは、Phenix.Refine⁷³を用いて計算した。

20

原子モデルの分析及び説明

【0386】

各複合体は、プログラムのCCP4パッケージソフト⁶⁷を用いて分析した。分子間相互作用のために、相互作用のために使用した最大カットオフ距離は、4.75であった。次いで、Fab/ScFvまたはDENV sEタンパク質の各残基の接触を計数し、対応する残基を上回る比例棒としてプロットした。

【0387】

Ab配列は、Kabata³⁰及びIMGT³¹変換に従ってCDR/FWR領域をマッピングするために、Abyssis(www.bioinf.org.uk/software)及びIMGT(www.imgt.org)³¹によってそれぞれ分析した。推定上の生殖細胞系列及び体細胞成熟事象の分析を、IMGTウェブサイト(www.imgt.org)で行った。

30

【0388】

複数の配列アライメント及び系統樹は、ClustalW(ClustalW及びClustalXのバージョン2(参照⁷⁴))を用いて、EBIサーバー⁷⁵上で計算した。この系統樹は、この研究において使用されたsEタンパク質、DENV-1 FGA/89(1-395)、DENV-2 FGA02、DENV-3 PAH881(1-393)、及びDENV-4(DEN_Burma/63632/1976)のアミノ酸配列を用いて計算した。DENV-2遺伝子型をマッピングするために、⁷⁶からのデータベースを、sE外部ドメインのアミノ酸配列を抽出するために使用し、DENV2 FGA02 sE及びDENV-2 10AN sEを含むように延長した。標示を簡単にするために、サブルートは、DENV-2のための個々の遺伝子型のレベルに折り畳んだ。次いで、この系統樹を、DENV-4 sE配列でルート構成し、MEGA5ソフトウェアパッケージ⁷⁷を用いて計測するように導いた。

40

【0389】

図22a及び図14のため、ならびに分析目的のために、配列においてギャップのないDENV-2 sE二量体のモデルを使用した。このモデルは、DENV-2 sE/B7複合体の完全プロトマーAを用いて構築した。

【0390】

図は、Program ESPript⁷⁸及びAPBS⁷⁹及びPDB2PQRツ

50

ル⁸⁰を含む、PyMOL Molecular Graphics Systemのバージョン1.5.0.4 Schrodinger、LLC (pymol.sourceforge.net)を用いて準備した。

【0391】

最後に、現行のワクチン戦略は、4種すべての血清型に対してバランスのとれたタイプの特異的反応を作り出す目的で四価製剤を採用する。そのような強力かつ交差反応性のある抗体のここでの説明は、自然の連続的な感染に見られる反応を繰り返すような、所望のエピトープ及び場合により、異種のプライムブースト戦略を含むサブユニットワクチンへの方法を示す。

実施例16：配列情報

配列番号

配列番号1

抗体C8重鎖の完全配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTTFSTYSMHWVRQA
PGKGLEYSVAITGEGDSAFYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
FEMNSLRPEDTAVYYCVGGYSN FYYYYTMDVWGQGTTVTV

配列番号2

抗体C10重鎖の完全配列

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQA
PGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQDRVTITRDTSA STAY
MELSSLRSEDTA IYYCARDKVDDYGDYWFPTLWYFDYWGQ
GTLVTV

配列番号3

抗体A11重鎖の完全配列

EVQLVESGGGLVLRPGGSLRLSCAASGFSSYSNHWMHWVRQA
PGKGLVWVSRINSDGSTRNYADFVKGRFTISRDN AENTLY
LEMNSLTADDTAVYYCVRDGVRFY YDSTGYYPDSFFKYGM
DVWGQGTTVTV

抗体B7重鎖の完全配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTFSSHWMMHWVRQA
PGKGLVWVSRRTNSDGSSTSYADSVKGRFMISRDN SKNTVY
LHMNGLRAEDTAVYFCARDGVRY YDSTGYYPDNFFQYGL
DVWGQGTT

配列番号4
C8 CDR H1

TYSMH

配列番号6

C8 CDR H2

AITGEGDSAFYADSVKGR

配列番号7

C8 CDR H3

GSNFYYY

配列番号8

C10 CDR H1

SYAMH

配列番号9

C10 CDR H2

WINAGNGNTKYSQKFQD

配列番号10

10

20

30

40

50

C 1 0 C D R H 3
D K V D D Y G D Y W F P T L W

配列番号 1 1

A 1 1 C D R H 1
N H W M H

配列番号 1 2

A 1 1 C D R H 2
R I N S D G S T R N Y A D F V K G

配列番号 1 3

A 1 1 C D R H 3
D G V R F Y Y D S T G Y Y P D S F F K Y

配列番号 1 4

B 7 C D R H 1
S H W M H

配列番号 1 5

B 7 C D R H 2
R T N S D G S S T S Y A D S V K G

配列番号 1 6

B 7 C D R H 3
D G V R Y Y Y D S T G Y Y P D N F F Q Y

配列番号 1 7

C 8 - C D R L 1
R A S Q S I S T F L A

配列番号 1 8

C 8 C D R L 2
D A S T R A T

配列番号 1 9

C 8 C D R L 3
Q Q R Y N W P P Y T

配列番号 2 0

C 1 0 C D R L 1
T G T S S D V G G F N Y V S

配列番号 2 1

C 1 0 C D R L 2
D V T S R P S

配列番号 2 2

S S H T S R G T W V F

配列番号 2 3

A 1 1 C D R L 1
T G T S S N A D T Y N L V S

配列番号 2 4

A 1 1 C D R L 2
E G T K R P S

配列番号 2 5

A 1 1 C D R L 3
C S Y A T S R T L V F

配列番号 2 6

B 7 C D R L 1
T G I S S D V E T Y N L V S

配列番号 2 7

10

20

30

40

50

B 7 C D R L 2
E A S K R P S

配列番号 28

B 7 C D R L 3
C S Y A G G K S L V

配列番号 29

完全長エンベロープタンパク質配列 D E N V 1

> D E N V 1 株 H a w a i i

M R C V G I G N R D F V E G L S G G T W V D V V L E H G S C V T T M A K D K P T
L D I E L L K T E V T N P A V L R K L C I E A K I S N T T T D S R C P T Q G E A
T L V E E Q D A N F V C R R T F V D R G W G N G C G L F G K G S L I T C A K F K
C V T K L E G K I V Q Y E N L K Y S V I V T V H T G D Q H Q V G N E T T E H G T
I A T I T P Q A P T S E I Q L T D Y G A L T L D C S P R T G L D F N E M V L L T
M K E K S W L V H K Q W F L D L P L P W T S G A S T P Q E T W N R E D L L V T F
K T A H A K K Q E V V V L G S Q E G A M H T A L T G A T E I Q T S G T T K I F A
G H L K C R L K M D K L T L K G M S Y V M C T G S F K L E K E V A E T Q H G T V
L V Q V K Y E G T D A P C K I P F S T Q D E K G V T Q N G R L I T A N P I V T D
K E K P V N I E A E P P F G E S Y I V V G A G E K A L K L S W F K K G S S I G K
M L E A T A R G A R R M A I L G D T A W D F G S I G G V F T S V G K L V H Q I F
G T A Y G V L F S G V S W T M K I G I G I L L T W L G L N S R S T S L S M T C I
A V G M V T L Y L G V M V Q A

10

20

配列番号 30

完全長エンベロープヌクレオチド配列 D E N V 1

配列番号 31

完全長エンベロープタンパク質配列 D E N V 2

> D E N V 2 株 1 6 6 8 1

M R C I G M S N R D F V E G V S G G S W V D I V L E H G S C V T T M A K N K P T
L D F E L I K T E A K Q P A T L R K Y C I E A K L T N T T T E S R C P T Q G E P
S L N E E Q D K R F V C K H S M V D R G W G N G C G L F G K G G I V T C A M F R
C K K N M E G K V V Q P E N L E Y T I V I T P H S G E E H A V G N D T G K H G K
E I K I T P Q S S I T E A E L T G Y G T V T M E C S P R T G L D F N E M V L L Q
M E N K A W L V H R Q W F L D L P L P W L P G A D T Q G S N W I Q K E T L V T F
K N P H A K K Q D V V V L G S Q E G A M H T A L T G A T E I Q M S S G N L L F T
G H L K C R L R M D K L Q L K G M S Y S M C T G K F K V V K E I A E T Q H G T I
V I R V Q Y E G D G S P C K I P F E I M D L E K R H V L G R L I T V N P I V T E
K D S P V N I E A E P P F G D S Y I I I G V E P G Q L K L N W F K K G S S I G Q
M F E T T M R G A K R M A I L G D T A W D F G S L G G V F T S I G K A L H Q V F
G A I Y G A A F S G V S W T M K I L I G V I I T W I G M N S R S T S L S V T L V
L V G I V T L Y L G V M V Q A

30

40

配列番号 32

完全長エンベロープヌクレオチド配列 D E N V 2

配列番号 33

完全長エンベロープタンパク質配列 D E N V 3

> D E N V 3 株 H 8 7

M R C V G V G N R D F V E G L S G A T W V D V V L E H G G C V T T M A K N K P T
L D I E L Q K T E A T Q L A T L R K L C I E G K I T N I T T D S R C P T Q G E A
I L P E E Q D Q N Y V C K H T Y V D R G W G N G C G L F G K G S L V T C A K F Q
C L E S I E G K V V Q H E N L K Y T V I I T V H T G D Q H Q V G N E T Q G V T A
E I T S Q A S T A E A I L P G Y G T L G L E C S P R T G L D F N E M I L L T M K
N K A W M V H R Q W F F D L P L P W T S G A T T E T P T W N R R E L L V T F K N

50

A H A K K Q E V V V L G S Q E G A M H T A L T G A T E I Q T S G G T S I F A G H
 L K C R L K M D K L E L K G M S Y A M C L N T F V L K K E V S E T Q H G T I L I
 K V E Y K G E D A P C K I P F S T E D G Q G K A H N G R L I T A N P V V T K K E
 E P V N I E A E P P F G E S N I V I G I G D K A L K I N W Y R K G S S I G K M F
 E A T A R G A R R M A I L G D T A W D F G S V G G V L N S L G K M V H Q I F G S
 A Y T A L F S G V S W I M K I G I G V L L T W I G L N S K N T S M S F S C I A I
 G I I T L Y L G V V V Q A

配列番号 3 4

完全長エンベロープヌクレオチド配列 D E N V 3

配列番号 3 5

完全長エンベロープタンパク質配列 D E N V 4

> D E N V 4 株 2 4 1

M R C V G V G N R D F V E G V S G G A W V D L V L E H G G C V T T M A Q G K P T
 L D F E L I K T T A K E V A L L R T Y C I E A S I S N I T T A T R C P T Q G E P
 Y L K E E Q D Q Q Y I C R R D V V D R G W G N G C G L F G K G G V V T C A K F S
 C S G K I T G N L V Q I E N L E Y T V V V T V H N G D T H A V G N D I P N H G V
 T A T I T P R S P S V E V K L P D Y G E L T L D C E P R S G I D F N E M I L M K
 M K K K T W L V H K Q W F L D L P L P W A A G A D T S E V H W N Y K E R M V T F
 K V P H A K R Q D V I V L G S Q E G A M H S A L T G A T E V D S G D G N H M F A
 G H L K C K V R M E K L R I K G M S Y T M C S G K F S I D K E M A E T Q H G T T
 V V K V K Y E G A G A P C K V P I E I R D V N K E K V V G R I I S S T P F A E Y
 T N S V T N I E L E P P F G D S Y I V I G V G D S A L T L H W F R K G S S I G K
 M L E S T Y R G V K R M A I L G E T A W D F G S V G G L F T S L G K A V H Q V F
 G S V Y T T M F G G V S W M V R I L I G F L V L W I G T N S R N T S M A M T C I
 A V G G I T L F L G F T V H A

配列番号 3 6 - 完全長エンベロープヌクレオチド配列 D E N V 4

配列番号 3 7

C 8 軽鎖 - 以下の表を参照

配列番号 3 8

抗体 C 1 0 軽鎖の完全配列 - 以下の表を参照

配列番号 3 9

抗体 A 1 1 軽鎖の完全配列 - 以下の表を参照

配列番号 4 0

B 7 軽鎖 以下の表を参照

配列番号 3 7 - - 1 3 1 以下の表からの抗体軽及び重鎖配列

10

20

30

【表 2】

配列 I D	エピソード	配列番号	配列 AA (H鎖)	配列番号	配列 AA (L鎖)
7 4 7 (4) B 3	E D E 1	4 0	QVQLQESGPGLMKPS ETL SLTCSVSGVSI STHYWSW IRQPPGKGLEWIGFI YNS GGTHYNPSLKS RVTISAD TSKNQFALTLSSVTAADT AVYYCARGRRAYDSSGYV KYYYFYGV D VWGQGTTVT VSS	8 6	QTVVTQEP SLTVSPGG TVTLCGS NTGPVTNG HYPYWFQQ KSGQAPRT LIYDTTNR QSWTPVRF SGSLLGK AALTL SGA QPEDEADY HCLLSYSD GLVFGGGT KLTVL
7 4 7 A 1 2	E D E 1	4 1	EVQLVESGSELKKPGASV KVSCRASGFTFTSYTFNW VRQAPGQGLEWMGWIDTK SGRPTYAQQFTGRFVLSL DTSVSTAYLQINSLKVED TAMYYCARVHTGGYPPEL RYYYYGMDVWGQGTTVTV SS	8 7	CMT P APST LAVTPGEP ASISCRST QSLLHSDG YNYLDWYL QKPGQSPH LLIYLGSH RASGVPDR FSGSGSDT DFTLKI SR VEAEDVGV YYCMQPLR TPPTFGQG TKLEIK
7 5 2 B 1 0	E D E 1	4 2	EVQLVESGGGLVQP GGS L RLSCSASGFTFSTYS MHW VRQAPGKGLEYS AITTD GNSAFYADSVKGRFTISR DNSKNTMYFHMNSLRPED TAVYYCVGGYSSFY YYT MDVWGQGTTVTVSS	8 8	EIVLTQSP ATLSLSAG DRATLSCR ASQDISSF LAWYQQKP GQAPRLLM YDTSNRAT GVPARFSG SRSGTDFT LTI STLEP EDVAVYYC QHRYNWPP YTFGQG TK VEIK

10

20

30

40

7 5 2 B 1 1	E D E 1	4 3	QVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCSASGFTFSTYSMHW VRQAPGKGGLEYVSAITTD GDSAFYADSVKGRFTISR DNSKNTMFFHMSNLRPED TAVYYCVGGYSSFYYYT LDVWGQGTTVTVSS	89	EIVLTQSP ATLSLSPG ERATLSCR ASQSISSF LAWYQQKP GQAPRLLI YDASNRVT GVPARFSG SRSGTDFT LTIISTLEP EDFAVYYC QHRYNWPP YTFGQGTK VEIK	10
7 5 2 C 9	E D E 1	4 4	EVQLVESEGGLVQPGGSL RLSCSASGFTFSTYSMHW VRQAPGKGGLEYVSAITTN GDSTFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYFQMSSLRAED TGVYYCVGGYSSFYYYT MDVWGQGTTVTVSS	90	EIVLTQSP ATLSLSPG ERATLSCR ASQSIISTY LAWYQQKP GQAPRLLI YDASNRAT GVPARFSG SRSGTDFT LTIISTLEP EDFAVYYC QQRYNWPP YTFGQGTK VEIK	20
7 5 2 (2) A 2	E D E 1	4 5	EVQLVQSGPEMRKPGASV KVSCKASGYTFTSHGINW VRQVPGQGPEWMGWSSSY TDNTNYAQKFKGRVTMTT DPSTSTAYMELRSLRSDD TAIYFCARGFYSGSYPT APFDIWGQGTLVTVSS	91	DIQMTQSP SSLSASVG DRVITICR ASQTISGS LSWYQHKP GKAPKLLI YAASSLQS GVPSRFSG SGSGTDFT LTISSLQP EDFATFYC QQSYSTPY TFGQGTKV EIK	30
						40

<p>7 5 2 (2) A 5</p>	<p>E D E 1</p>	<p>4 6</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTTYGLSW VRQAPGQGLEWMGWCSSY NDNTNYAQKFKGRVTMTT DTSTNTAYMELRSLRSDD TAVYYCARVIFYSGSYYPN SPFDYWGQGTLVTVSS</p>	<p>9 2</p>	<p>DIQMTQSP SSLSASIG DRVTITCR ASESIS SQ LHWYQQKP GKAPRLLI YAASSLQG GVPSRFSG SGSGTDFT LTISGLQP EDFATYCC QQSFTTPY TFGQGTKV EIK</p>	<p>10</p>
<p>7 5 2 (2) A 7</p>	<p>E D E 1</p>	<p>4 7</p>	<p>QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGDSISSNNYQW NWIRQPAGKGLEWLGRID TTGSTNYNPSLKSRISS IDTSKKQFSLRLNSVTAA DTAVYYCARSLWSGELWG GPLGYWGQGTLVTVSS</p>	<p>9 3</p>	<p>EIVMTQSP ATLSASPG ERATLSCR ASQDVSTF VAWFQQNP GQAPRLLI YDASTRAP GIPARFSG SRSGTEFT LTINSLQS EDFAVYYC QQYYNWPP WTFGQGTK VEIK</p>	<p>20</p>
<p>7 5 2 (2) A 8</p>	<p>E D E 1</p>	<p>4 8</p>	<p>EVQLVESGAEVKNPGASV KVSCKASGYTFIGYYIHW VRQAPGQGLEWMGWINPN SGATYSAQKFKQGRVTLTG DASPSTVYME LSSLRSDD TAIYYCAGRSYNWNDVIFY YYYMDVWGQGTTVTVSS</p>	<p>9 4</p>	<p>DIQMTQSP SSVSASVG DRVTISCR ASQDISAS LGWYQQKP GKAPKLLI YRASNL EG GVPSRFRG SGSGTDFT LTISLQP EDFATYYC LQANSFPL TFGGGTKV EIK</p>	<p>30</p>
						<p>40</p>

7 5 2 (2) B 1 0	E D E 1	4 9	EVQLVESGPGGLVKPSETL SLTCTISGVSISDYWWTW IRQPPGKGLEWIGNIYNT GSTNYNPSLKS RVAIWMD TSKNKFSRLTSVTSADT AVYYCARVEGGPKYYFGS GDFYNLWGRGSLVTVSS	9 5	DIQMTQSP SSLSASVG DSVTVACR ASQPIYRN LNWYQQKP GKAPKLLI YDASTLQS GVPARFSG SGSGTDFT LTISSLQA EDFATYYC QQSYSSPR TFGQGTKV EIK	10
7 5 2 (2) C 2	E D E 1	5 0	SQVQLVQSGAELKKPGAS VKV SCKTSGYTF SYIHW VRQAPGQGLEWMAMINPT SGSTSYAQR FQGRVTMTR DTP TNTVYMEVRS LRSD TAVYFCASRGYNWNDVQY YYTMDVWGQGTTVTVSS	9 6	DIQMTQSP STLSASVG DRVTITCR ASQSI STY LAWYQQKP GKAPKLLI YKASSLEI GVPSRFSG SGSGTEFT LTISSLQP DDFAIYYC QQYNNYSP PVTFGGGT KVEIK	20
7 5 2 (2) D 4	E D E 1	5 1	SEVQLVQSGAELKKPGAS VKV SCKASGYTF SYIHW VRQAPGQGLEWMAIINPT SGSTSYAQR FQGRVTMTR DTSTNTVYME LSS LI SED TAVYYCASRGYNWNDVHY YYTMDVWGQGTTVTVSS	9 7	DIQMTQSP STLSASVG DRVTITCR ASQSI STY LAWYQQKP GKAPKLLI YKASTLES GVPLRFSG SGSGTEFT LTISSLQP DDFAIYYC QQYNNYSP PVTFGGGT KVEIK	30

40

7 5 2 (2) B 1 1	E D E 1	5 2	QVQLVESGAEVKKPGSSV KVSCKASGYTFTTYGLSW VRQAPGQGLEWMGWCSY EDNTNYAPRFKGRVTMTT DTSTNTAYMELRSLRFDD TAVYYCARVFYSGSYYPN SPFDSW	98	DIQMTQSP SSLSASVG DAVSITCR ASESVSRQ LNWYQQKP GKAPNLLI YAASSLQG GVPSRFSG SGSGTDFT LTISGLQP EDFATYYC QQGYSTPY SFGQGTKV EIK	10
7 5 2 — 2 A 2	E D E 1	5 3	QVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCSASGFTFSTYSMHW VRQAPGKGLYISAITTD GDSAFYADSVKGRFTISR DNSKNTMYFHMNSLRPED TAVYYCVGGYSSFYYYT MDVWGQGTTVTVSS	99	EIVLTQSP ATLSLSAG ERATLSCR ASQSISSY LAWYQQKP GQAPRLLI YDASNRA GVPARFSG SQSGTDFT LTI STLEP EDFAVYYC QLRYNWPP YTFGQGTK VEIK	20
7 5 2 — 2 A 4	E D E 1	5 4	EVQLVESGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGINW VRQAPGQGLEWMGWISSD SGHTNYARKLKGRVTMTT DTSTTTAYMELRSLRSDD TAVYYCARGLYSVSYPT SPFDYWGQGSTVTVSS	100	DIQMTQSP SPLSASVG DRVTITCR ASQSISSH LNWYQQKS GKVPKLLI YAASSLQS GVPSRFSG SGSGTDFT LTI TSLQP EDFATYYC QQSDTTPY TFGQGTKV EIK	30 40

7 5 2 — 2 A 5	E D E 1	5 5	QVQLVESGAEVKKPGSSV KVSCRASGYTFTTYGLSW VRQAPGQGLEWMGWCSY NDNTNYAQKFKGRVTMTT DTSTNTAYMELRSLRSDD TAVYYCARVIFYSGSYYPN SPFDSWGQGTTLVTVSS	1 0 1	DIQMTQSP SSLSASVG DAVSITCR ASESIARQ LNWYQQKP GKAPNLLI YAASSLQG GVP SR FSG SGSGADFT LTISGLQP EDFATYYC QQGYSTPY TFGQGTKV EIK	10
7 5 2 — 2 A 9	E D E 1	5 6	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCSASGFTFSTYSMHW VRQAPGKGLEYSAITTD GDSAFYADSVKGRFTISR DNSKNTMYFHMNSVRPED TAVYYCVGGYSSFYYYT MDVWGQGTTLVTVSS	1 0 2	EIVLTQSP ATLSLSAG ERATLSCR ASQDISTF LAWYQQKP GQAPRLLI YDTSTRAT GVPARFSG SRSGTDFT LTITLLEP EDFAVYYC QHRYNWPP YTFGQGTK VEIK	20
7 5 2 — 2 B 2	E D E 1	5 7	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCSASGFTFSTYSMHW VRQAPGKGLEYSAITTD GDSAFYADSVKGRFTISR DNSKNTMYFHMNSLRPED TAVYYCVGGYSSFYYYT MDVWGQGTTLVTVSS	1 0 3	EIVLTQSP ATLSLSAG ERATLSCR ASQSISSY LAWYQQKP GQAPRLLI YDASN RAT GVPARFSG SRSGTDFT LTISTLEP EDFAVYYC QHRYNWPP YTFGQGTK VEIK	30 40

7 5 2 — 2 B 3	E D E 1	5 8	EVQLLES G GGLVQP G G S L R L S C S A S G F T F S T Y S M H W V R Q A P G K G L E Y V S A I S T D G D S A F Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y F H M S S L R A E D T A V Y Y C L G G Y S T F Y Y Y T M D V W G Q G T T V T V S S	1 0 4	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S H S I S T F L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D T S T R A T G V P A R F S G S R S G T D F T L T I N T L E P E D F A V Y Y C Q Q R Y N W P P Y T F G Q G T K V E I K	10
7 5 2 — 2 B 4	E D E 1	5 9	QVQLV E S G GGLVQP G G S L R L S C S A S G F P F S T Y S M H W V R Q A P G K G L E Y V S A I T T N G D S T F Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T V Y F Q L S S L R A E D T A V Y Y C V G G Y S S F Y F Y T M D V W	1 0 5	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S I S S F L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D T S N R A T G V P A R F S G S R S G T D F T L T I S T L E P E D F A I Y Y C Q H R Y N W P P Y T F G Q G T K V E I K	20
7 5 2 — 2 B 7	E D E 1	6 0	EVQLV Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T Y T N Y G L S W V R Q A P G Q G L E W M G W M S S Y N D N T N Y S Q K F K G R V T M T T D P S T T T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R G L Y S G S H Y P T S P L D Y W G Q G T L V T V S S	1 0 6	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S R S L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D F A L T I S S L Q P E D F A T Y S C Q Q S D R T P Y T F G Q G T K V E I K	30 40

7 5 2 — 2 B 1 1	E D E 1	6 1	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCSASGFTFTTYSLHW VRQTPGKGLEYSVAITTD GDSAFYADSVKGRFTISR DNSKNTMYFHMSLRPED TAVYYCVGGYSSFYFYT VDVWGQGTTVTVSF	10 7	EIVLTQSP ATLSLSPG ERATLSCR ASQSI STY LVWYQQKP GQAPRLLI YDASTRAT GVPARFSG SRSGTDFT LTI STLEP EDFAVYYC QHRYNWPP YTFGRGTK VEIK	10
7 5 2 — 2 C 4	E D E 1	6 2	SQVQLVESGAELKKPGAS VKV SCKASGYTFSYYMHW VRQAPGQGLEWMAIINPT SGSTTYAQRFGGRVTMTR DTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCASRGYNWNDVHY YYTMDVWGQGTTVTVSS	10 8	DIQMTQSP STLSASVG DRVTITCR ASQSI STY LAWYQQKV GKAPKLLI YKASTLEG GVPSRFSG SGSGTEFT LTISSLQP EDFAIYYC QQYNNYSP PVTFGGGT KVEIK	20
7 5 2 — 2 C 8	E D E 1	1	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCSASGFTFSTYSMHW VRQAPGKGLEYSVAITGE GDSAFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYFEMNSLRPED TAVYYCVGGYSNFYYYYT MDVWGQGTTVTVSS	37	EIVLTQSP ATLSLSPG ERATLSCR ASQSI STF LAWYQHKP GQAPRLLI YDASTRAT GVPARFSG SRSGTDFT LTI STLEP EDFAVYYC QQRYNWPP YTFGQGTK VEIK	30 40

7 5 3 (3) C 1 0	E D E 1	2	EVQLVESGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYAMHW VRQAPGQRLEWGWINAG NGNTKYSQKFQDRVITR DTSASTAYMELSSLRSED TAIYYCARDKVDDYGDYW FPTLWYFDYWGGGTLVTV SS	38	QSALTQPA SVSGSPGQ SITISCTG TSSDVGGF NYVSWFQQ HPGKAPKL MLYDVTSR PSGVSSRF SGSKSGNT ASLTISGL QAEDEADY YCSSHTSR GTWVFGGG TKLTVL	10
7 5 3 (3) B 1 0	E D E 1	6 3	EVQLVESGPEVKKPGASV KVSCKTSGYTFINYYIHW VRQAPGQGLEWLGLINPR GGNTNYAEKFE DRV TMTR DTSTSTVNMESSLTSED TAVYYCARPLAHTYDFWS GYHRATGYGMDVWGQGT VTVSS	109	DIVMTQSP LSLSVTPG EPASISCR SSQSLVYS DGNKYLDW YVQKPGQS PQLLIYLT STRASGVP DRFSGSAS GTDFTLKI SRVEAEDV GLYYCMQA LQTPFTFG PGTKVDIK	20
7 5 8 P 6 A 1	E D E 1	6 4	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAAFGGFTFVNYAMNW VRQAPGKGP EWVAVIYAA GDGANYGDSVKGRFTISR DNSRNTLYLQMNSLRAED TAIYYCAKPAHYDDSGYP YMAYFDSWGQGT L V T V S S	110	EIVMTQSP ATLSVSPG ERATLTCR ASQTISTF LAWYQQKP GQPPRLLI YDTSTRAT GIPGRFSG SRSGTEFT LTISSLQS EDVAVYYC QHYYNWPP WTFGQGTK VEIK	30 40

7 5 8 P 6 A 3	E D E 1	6 5	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGGFFSSYAITW VRQAPGQGLEWMGGIIPD YDSAKYAQKFQGRVTITA DESTSTAYLELRSLRSED TAVYYCARRHCSSTSCSD PWTFPPSWGQGTLVTSPPQ	1 1 1	QSAL TQPP SASGSPGQ SVTISCTG SSSDIGGN EYVSWYQL QPGKAPKL MIYEVTKR PSGVPNRF SGSKSGNT ASLTVSGL QSEDEGDY YCSSYADN SVLFGGGT TLTVL	10
7 5 8 P 6 A 1 2	E D E 1	6 6	EVQLVESGAEMKKPGSSV KVSCKASGATFTSFAMYW VRQAPGQGLEWMGR I I PM FASAEYAQKFQGR L T M T A DESTTTAYMELSSLRSDD TAVYYCAGRYCSSTSCSD PWTYFPHWGQGTLVTVSS	1 1 2	QSVLTQPP SASGSPGQ SVTISCTG TSSDVGAY YYVSWYQQ HPGKAPKL I I YE V N K R PSGVPARF SGSKSGNT ASLTVSGL QGEDEADY YCTSYAGS NTVIFGGG TKLTVL	20
7 5 8 P 6 B 4	E D E 1	6 7	EVQLVQSGATVRKPGASV TISCKTSGYTF TDYALHW VRQAPGQRLEWMGWLI PG SGYTKFAENFQGRVTITR ATSAHTAYMELSNLRSED TAVYYCARWGGDCNAGSC YGPYQYRGLDAWGQGT TV TVSS	1 1 3	EIVLTQSP VTLSLSPG ERATLSCR ASQTV DST YLAWYQQK PGRAPRL L IYGASNRA IGVPSRFT GSGSGTDF TLTISRLE PEDFALYY CQQSDGSL FTFGPGTK VDIK	30 40

7 5 8 P 6 B 5	E D E 1	6 8	EVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYSFIGYYLHW VRQAPGQGLEWMGRINPN SGGIDYGQTFQGRVTMTR DMSSSTVYLELTRLRSDD TARYYCAGRSDNWNDVYY NYALDVWGQGTTVTVSS	1 1 4	DIQMTQSP ASVSA SVG DRVTISCR ASQGIASW LAWYQQKP GKAPRLLI YGASSLQS GVP SRFRG SGSGTDF LTIS SLQP EDFATYYC QQANSFPF TFGPGTKV DIK	10
7 5 8 P 6 B 1 1	E D E 1	6 9	EVQLLES GGGVVQPGRSL KLS CAASGFTFSGYAMHW VRQAPGKGLEWLAVISYD ATTTY YTPSVKGRFTISR DNSKNTLYLQINSLRAED AAVYYCAKEISYCGGDCQ NFFFYYNMDVWGQGTTVT VSS	1 1 5	QSALTQPA SVSGSPGQ SITISCTG TSSDVGRY NVVSWYQQ HPGKAPKL IIYGSTKR PSGVSYRF SASKSGNT ASLTISGL QAEDEAEY HCCSYASG SVWVFGGG TKLTVL	20
7 5 8 P 6 C 4	E D E 1	7 0	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTAYYIHW VRQAPGQGLEWMGSINPN NGGTNYAQQGFQGRVTMTR DTSIRTVYMELSKLRSD TALYYCARDLGAMGYL SAGNCPFDYWGQGT LVT VSS	1 1 6	QSALTQPP SASGSPGQ SVTISCTG TSSDVGGY NYVSWYQH HPGKAPKL IIYEVS KR PSGVPHRF SGSKSGNT ASLTVSGL QAEDEAEY YCSSYAGS NTFTFGGG TKLTVL	30 40

7 4 7 B 8	E D E 2	7 1	QVQLVESGGALVKPGGSL RLSCAASGFTFRSHWMHW VRQAPGKGLVWVSRINSD GSSTNYADFKGRFTTSR DNAENTLYLEMNSLTADD TAVYYCVRDGVRYYYDSS GYYPDSFFKYGMDVWGQG TTVTVSS	1 1 7	QSALTQTA SVSGSPGQ SITISCTG TSSDAEIIY NLVSWYQQ HPGKAPKL IIYEGSKR PSGVSNRF SASKSAGA ASLRISGL QPEDEADY YCCSYATS KTLVFGGG TKLTVV	10
7 4 7 C 2	E D E 2	7 2	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFRSSAMYW VRQAPGKGLEFVSCIRSN GVTHYADSVKGRFTISR NSKNTLHLQMGLRPDDM AVYYCTRDDGPYSGYDWP WASSMDVWGQGT T V T V S S	1 1 8	DVVMTQSP LSLPVTLG QPASISCR SSRSL LNS DGNTYLNW FHQRPGQS PRRLIFKL SNRDSGVP DRFSGSGS GTDFTLKI SRVEAEDV GIYYCMQG THWPVTFG GGTKVEIK	20
7 4 7 D 8	E D E 2	7 3	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFIFSNHWMHW VRQAPGKGLVWVSR TNSD GSSTSYADFKGRFTISR DNAKNTLHLQINSLRADD TAVYYCARDGVRYYYDST GYYPDSY E YGLDVWGQG TTVTVSS	1 1 9	QSALTQPA SVSGSPGQ SITISCTG TSSGVGSY NLVSWYQQ HPGKAPKF IIYEGSKR PSGVSNRF SGSNSGNT ASLTISGL QAEDEADY YCCSYAGS KTLVFGGG TKVTVL	30
						40

7 4 7 (4) A 3	E D E 2	7 4	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFI FNRHWMHW VRQGPGKGLVWVSRINSD GSSTSYADSVKGRFTISR DNAKNTLHLQINSLRAED TAVYYCARDGVRYYYDST GYYPDSY EYGMDVWGQG TTVTVSS	1 2 0	QSVLTQPA SVSGSPGQ SITISCTG TSSDVGSY NLVSWYQQ HPGKAPKF IIYEGSKR PSGVSNRF SGSNSGNT ASLTISGL QAEDEADY YCCSYAGS KTLVFGGG TKVTVL	10
7 4 7 (4) A 1 0	E D E 2	7 5	QVQLVQSGGALVKPGGSL RLSCVASGFTFGSHWMHW VRQAPGKGLVWVSRVNSD GSSTNYAD FVKGRFTTSR DNAENTLYLEMNSLTADD TAVYYCVRDGVRYYYDSS GYYPDSFFKYGMDVWGQG TTVTVSS	1 2 1	QSALTQPA SVSGSPGQ SITISCTG TSSDIGIY NLVSWYQQ HPGKAPKL IIYEGSKR PSGVSNRF SASKSAGA ASLTISGL QPEDEADY YCCSYATS KTLVFGGG TKLTVV	20
7 4 7 (4) A 1 1	E D E 2	3	EVQLVESGGGLVLRPGGSL RLSCAASGFSYSNHWMHW VRQAPGKGLVWVSRINSD GSTRNYAD FVKGRFTISR DNAENTLYLEMNSLTADD TAVYYCVRDGVRFYYDST GYYPDSFFKYGMDVWGQG TTVTVSS	3 9	QSVLTQPA SVSGSPGQ SITISCTG TSSNADTY NLVSWYQQ RPGKAPKL MIYEGTKR PSGVSNRF SASKSATA ASLTISGL QPEDEADY YCCSYATS RTL VFGGG TKLTVV	30 40

7 4 7 (4) B 4	E D E 2	7 6	QVQLQESGPGLVRPSETL SLTCTVSGLSVSTYYWSW IRQPPGKGLEWIAVYVSR GGTNYNPSLESRVTISVD TATNQFSLRLRSVTAADT AVYFCARATNYFDSSGYF FAPWFDPWGQGI LVTVSS	1 2 2	EIVMTQSP ATLSVSPG ERATLSCR ASQSVKSN LAWYQQKP GQAPRLLM YGASTRVV TIPARFSG SGSGTEFT LTISLQSL EDFAVYYC QQYNKWPL TFGGGTKV EIK	10
7 4 7 (4) B 6	E D E 2	7 7	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGGTRSSYAISW VRRAPGRGLEWVGVIIPF FGTANYAQIFQGRLTITA DESTSIANMELTS LTPED TAIYYCASGGGGYAGYNW FDPWGQGTLVTVSS	1 2 3	QSALTQPA SVSGSPGQ SITISCTG TSSDIGGF NYVSWYQQ HPGKAPKV MIFDVSNR PSGVSNRF SGSKSGNT ASLTISGL QAEDEADY YCSSYTTR TTYVFGTG TKVTVL	20
7 4 7 (4) B 7	E D E 2	4	EVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFSSHWLHW VRQAPGKGLVWVSR TNSD GSSTSYADSVKGRFMISR DNSKNTVYLHMNGLRAED TAVYFCARDGVRYYYDST GYYPDNFFQYGLDVWGQG TTVTVSS	4 0	QSALTQPA SVSGSPGQ SITISCTG ISSDVETY NLVSWYEQ HPGKAPKL IIYEASKR PSGVSNRF SGSKSGNT ASLAISGL QAEDEADY YCCSYAGG KSLVFGGG TRLTVL	30
						40

7 4 7 (4) D 6	E D E 2	7 8	EVQLVQSGGGLIQPGGSL KLSCAASGFSFRNHWMHW VRQAPGKGLVWVSRVNSD GYSTSYADSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRPED TAVYFCARDGVRFYSDST GYYPDNYFPYGMDVWGQG TTVTVSS	1 2 4	QSAL TQPA SVSGSPGQ SITISCSG FSSDVGGD KVVSWYEQ HPGKVPKL IIYEGSKR PSGVSNRF SGSKSGNT ASLTISGL QAEDEADY YCCSYAGP KTLVFGGG TKVTVL	10
7 4 7 B 2	E D E 2	7 9	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCKVSGFTFKAYWMHW VRQAPGKGLVWVSRINGL GSSRDYADSVRGRFTISR DDAENTVYLQMNSLTAED TAMYVCARDVXFHDS SGY YRXGF XAPWG	1 2 5	NSPLSLSA SVGDRVTI TCRASRTI DNFLHWYQ QKPGKAPN LLIYAASS LQSGVPSR FRGSGSGT DFTLTINS VQPEDFAT YYCQQSYT IPPTFGGG TKVEIR	20
7 4 7 C 4	E D E 2	8 0	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGF AFSNHWMHW VRQAPGKGLVWVSRINSD GSSTTYADSVKGRFTISR DNAKNTLSLELNSLRAED TAIYYCARDGVRFYDST GYYPD PYFQYGLDVWGQG TTVTVSS	1 2 6	QSAL TQPA SVSGSLGQ SITISYTG TAIDVGSY NLVSWYQQ HPGKVPKL MIYEGSKR PSGVSNRF FGSKSGNT ASLTISGL QSEDEAEY YCCSYGGS RTL LFGGG TKLTVL	30 40

7 4 7 C 7	E D E 2	8 1	EVQLVESGGGLVQPGASL RVSCAASGFTFSTYNMNW VRQAPGKGLEWVSYISSR SSTIYYADSVQGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARDIGHYYDSSG YFHYSFGMDVWGQGTTVT VSS	1 2 7	DIVMTQSP LSLPVTLG EPASISCR SSRSLLS NGYNYLDW YLQKPGQS PQLLIYLG SNRASGVP DRFSGSGS GTDFTLKI SRVEAEDV GVYYCMQA RQTPVTFG GGTKVEIK	10
7 4 7 D 5	E D E 2	8 2	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFIFRNYWMHW VRQAPGKGLVWVSRINGL GSTTTYADSVQGRFTITR DDAKNTIFLQMNSLRAED TAVYYCARDVNFYDSSGY YREGWFDSWGPQTTVTVS S	1 2 8	GPFTLSAS VGDRVTIT CRASRSIN TFLNWFYQQ KTGSAPKL LIYGASTL QSGVPSRF SGSGSGTD FALTTISL QPDDFAAY YCQQSYTT PLTFGGGT RVEIK	20
7 4 7 D 1 1	E D E 2	8 3	EVQLLESGLAEVKKPGSSV KISCKASGGTFSNYAISW VRQAPGRGLEWLGGIPI FGTPNYAQRFGGRVTITA DESTSTAYMELNSLTSDD TAIYYCARDHPTVINPTF VGSWFDPWGQGTTLVTVSS	1 2 9	SYELTQPP SVSVAPGK TATITCGG DNIGSKTV HWYQQKPG QAPLLVIY YNGDRPPG IPERFSGS NSGNTATL TITRVEAG DEADYCCQ IWDSRSSH PVFGGGTK LTVL	30 40

7 5 2 B 6	E D E 2	8 4	QVQLVESGAEVKKPGASV KVSCKASGFTFTSYIHW VRQAPGQGLEWMGVINPS GGTTIYARNLQGRVTMTR DTSTTTVYME LSS LKSED TAVYYCARAHSGNYDFWS GSNYHYYYGMDVWGQGT VTVSS	13 0	DIVMTQSP LSLPVTPG EPASISCR SSQSL LHT NGYNFLDW YVQKPGQS PQLLIYLG SSRASGVP DRFSGSGS GTDFTLKI SRVEAEDV GLYYCMA LHTPRTFG QGTKVEIK	10
7 5 2 (2) D 2	E D E 2	8 5	EVQLVESGAEVKKPGASV KVSCKASGFTFTSYIHW VRQAPGQGLEWMGVINPS GGTTIYAQNFQGRVTMTR DTSTTTVYME LSS LKSED TAVYYCARAHSGNYDFWS GSNYHYYYGMDVWGQGT VTVSS	13 1	DIVMTQSP LSLPVTPG EPASISCR SSQSL LHT NGYNFLDW YVQKPGQS PQLLIYLG SSRASGVP DRFSGSGS GTDFTLKI SRVEAEDV GLYYCMA LQTPRTFG QGTKVEIK	20

10

20

30

配列番号 1 3 2

エンベロープ外部ドメインタンパク質配列 DENV 1

FHLTTRGGEPHMI VSKQER GKSLLFKTSAGVNMCTLIAMD
 LGELCEDTMTYKCPRI TEAEPDDVDCWCNATDTWVTYGT C
 SQTGEHRRDKRSVALAPHVGLGLETRTETWMSSEGA WKQI
 QKVETWALRHPGFTVIALFLAHAIGTSITQKGIIFILLML
 VTPSMAMRCVGI GNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTM
 AKNKPTLDIE LLKTEVTNPAVLRKLCIEAKISNTTTDSRC
 PTQGEATLVEEQDANFVCRRTVVD RGGWNGCGLFGKGSLL
 TCAKFKCVTKLE GKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQH QV GNE
 TTEHGTIATITPQA PTSEIQ L TDYGT L TLDCSPRTGLDFN
 EVVLLTMKEKSWLVHKQWFLDLPWP TSGASTSQETWNRQ
 DLLVTFKTAHAKKQEVVVLG SQEGAMHTAL TGATEIQ TSG
 TTTIFAGHLKCR LKMDKLT LKGM SYVMCTGSFKLEKEVAE
 TQHGTVLVQVKYEGTDA PCKIPFSTQDEKGV TQNGRLITA
 NP I VTDKEKPINIETEP PFGESYI I V G AGEKAL KLSWFKK
 G

40

配列番号 1 3 3

エンベロープ外部ドメインタンパク質配列 DENV 2

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPT

50

L D F E L I K T E A K Q P A T L R K Y C I E A K L T N T T T E S R C P T Q G E P
 S L N E E Q D K R F I C K H S M V D R G W G N G C G L F G K G G I V T C A K F T
 C K K N M E G K I V Q P E N L E Y T I V I T P H S G E E H A V G N D T G K H G K
 E I K I T P Q S S T T E A E L T G Y G T V T M E C S P R T G L D F N E M V L L Q
 M E D K A W L V H R Q W F L D L P L P W L P G A D T Q G S N W I Q K E T L V T F
 K N P H A K K Q D V V V L G S Q E G A M H T A L T G A T E I Q M S S G N L L F T
 G H L K C R L R M D K L Q L K G M S Y S M C T G K F K I V K E I A E T Q H G T I
 V I R V Q Y E G D G S P C K I P F E I T D L E K R H V L G R L I T V N P I V T E
 K D S P V N I E A E P P F G D S Y I I V G V E P G Q L K L N W F K R G

配列番号 134

エンベロープ外部ドメインタンパク質配列 DENV3

F H L T S R D G E P R M I V G K N E R G K S L L F K T A S G I N M C T L I A M D
 L G E M C D D T V T Y K C P H I T E V E P E D I D C W C N L T S T W V T Y G T C
 N Q A G E H R R D K R S V A L A P H V G M G L D T R T Q T W M S A E G A W R Q V
 E K V E T W A L R H P G F T I L A L F L A H Y I G T S L T Q K V V I F I L L M L
 V T P S M T M R C V G V G N R D F V E G L S G A T W V D V V L E H G G C V T T M
 A K N K P T L D I E L Q K T E A T Q L A T L R K L C I E G K I T N I T T D S R C
 P T Q G E A I L P E E Q D Q N Y V C K H T Y V D R G W G N G C G L F G K G S L V
 T C A K F Q C L E S I E G K V V Q H E N L K Y T V I I T V H T G D Q H Q V G N E
 T Q G V T A E I T S Q A S T A E A I L P E Y G T L G L E C S P R T G L D F N E M
 I L L T M K N K A W M V H R Q W F F D L P L P W T S G A T T K T P T W N R K E L
 L V T F K N A H A K K Q E V V V L G S Q E G A M H T A L T G A T E I Q T S G G T
 S I F A G H L K C R L K M D K L K L K G M S Y A M C L N T F V L K K E V S E T Q
 H G T I L I K V E Y K G E D A P C K I P F S T E D G Q G K A H N G R L I T A N P
 V V T K K E E P V N I E A E P P F G E S N I V I G I G D K A L K I N W Y R K G

配列番号 135

エンベロープ外部ドメインタンパク質配列 DENV4

F S L S T R D G E P L M I V A K H E R G R P L L F K T T E G I N K C T L I A M D
 L G E M C E D T V T Y K C P L L V N T E P E D I D C W C N L T S T W V M Y G T C
 T Q S G E R R R E K R S V A L T P H S G M G L E T R A E T W M S S E G A W K H A
 Q R V E S W I L R N P G F A L L A G F M A Y M I G Q T G I Q R T V F F V L M M L
 V A P S Y G M R C V G V G N R D F V E G V S G G A W V D L V L E H G G C V T T M
 A Q G K P T L D F E L T K T T A K E V A L L R T Y C I E A S I S N I T T A T R C
 P T Q G E P Y L K E E Q D Q Q Y I C R R D V V D R G W G N G C G L F G K G G V V
 T C A K F S C S G K I T G N L V Q I E N L E Y T V V V T V H N G D T H A V G N D
 T S N H G V T A M I T P R S P S V E V K L P D Y G E L T L D C E P R S G I D F N
 E M I L M K M K K K T W L V H K Q W F L D L P L P W T A G A D T S E V H W N Y K
 E R M V T F K V P H A K R Q D V T V L G S Q E G A M H S A L A G A T E V D S G D
 G N H M F A G H L K C K V R M E K L R I K G M S Y T M C S G K F S I D K E M A E
 T Q H G T T V V K V K Y E G A G A P C K V P I E I R D V N K E K V V G R I I S S
 T P L A E N T N S V T N I E L E P P F G D S Y I V I G V G N S A L T L H W F R K
 G

配列番号 136

エンベロープ 外部ドメイン ヌクレオチド配列 DENV1

t t c c a t t t g a c c a c a c g a g g g g g a g a g c c a c a c a t g a
 t a g t t a g t a a g c a g g a a a g a g g a
 a a g t c a c t c t t g t t c a a g a c c t c t g c a g g t g t c a a t a
 t g t g c a c t c t c a t t g c g a t g g a t
 t t g g g a g a g t t a t g t g a g g a c a c a a t g a c t t a c a a a t
 g c c c c c g g a t c a c t g a g g c g g a a

10

20

30

40

50

c c a g a t g a c g t t g a c t g c t g g t g c a a t g c c a c a g a c a
 c a t g g g t g a c c t a t g g g a c g t g t
 t c t c a a a c c g g t g a a c a c c g a c g a g a c a a a c g t t c c g
 t g g c a c t g g c c c c a c a c g t g g g a
 c t t g g t c t a g a a a c a a g a a c c g a a a c a t g g a t g t c c t
 c t g a a g g c g c c t g g a a a c a a a t a
 c a a a a a g t g g a g a c t t g g g c t t t g a g a c a c c c a g g a t
 t c a c g g t g a t a g c t c t t t t t t a
 g c a c a t g c c a t a g g a a c a t c c a t c a c t c a g a a a g g g a
 t c a t t t t c a t t c t g c t g a t g c t g
 g t a a c a c c a t c a a t g g c c a t g c g a t g c g t g g g a a t a g
 g c a a c a g a g a c t t c g t t g a a g g a
 c t g t c a g g a g c a a c g t g g g t g g a c g t g g t a t t g g a g c
 a t g g a a g c t g c g t c a c c a c c a t g
 g c a a a a a a t a a a c c a a c a t t g g a c a t t g a a c t c t t g a
 a g a c g g a g g t c a c g a a c c c t g c c
 g t c t t g c g c a a a t t g t g c a t t g a a g c t a a a a t a t c a a
 a c a c c a c c a c c g a t t c a a g a t g t
 c c a a c a c a a g g a g a g g c t a c a c t g g t g g a a g a a c a a g
 a c g c g a a c t t t g t g t g t c g a c g a
 a c g g t t g t g g a c a g a g g c t g g g g c a a t g g c t g c g g a c
 t a t t t g g a a a a g g a a g c c t a c t g
 a c g t g t g c t a a g t t c a a g t g t g t g a c a a a a c t g g a a g
 g a a a g a t a g t t c a a t a t g a a a a c
 t t a a a a t a t t c a g t g a t a g t c a c t g t c c a c a c a g g g g
 a c c a g c a c c a g g t g g g a a a c g a g
 a c t a c a g a a c a t g g a a c a a t t g c a a c c a t a a c a c c t c
 a a g c t c c t a c g t c g g a a a t a c a g
 t t g a c a g a c t a c g g a a c c c t t a c a c t g g a c t g c t c a c
 c c a g a a c a g g g c t g g a c t t t a a t
 g a g g t g g t g c t a t t g a c a a t g a a a g a a a a a t c a t g g c
 t t g t c c a c a a a c a a t g g t t t c t a
 g a c t t a c c a c t g c c t t g g a c t t c g g g g g c t t c a a c a t
 c c c a a g a g a c t t g g a a c a g a c a a
 g a t t t g c t g g t c a c a t t c a a g a c a g c t c a t g c a a a g a
 a g c a g g a a g t a g t c g t a c t g g g a
 t c a c a g g a a g g a g c a a t g c a c a c t g c g t t g a c c g g g g
 c g a c a g a a a t c c a g a c g t c a g g a
 a c g a c a a c a a t c t t t g c a g g a c a c c t g a a a t g c a g a t
 t a a a a a t g g a t a a a c t g a c t t t a
 a a a g g g a t g t c a t a t g t g a t g t g c a c a g g c t c a t t t a
 a g c t a g a g a a g g a a g t g g c t g a g
 a c c c a g c a t g g a a c t g t c c t a g t g c a g g t t a a a t a c g
 a a g g a a c a g a t g c g c c a t g c a a g
 a t c c c c t t t t c g a c c c a a g a t g a g a a a g g a g t g a c c c
 a g a a t g g g a g a t t g a t a a c a g c c
 a a t c c c a t a g t t a c t g a c a a a g a a a a a c c a a t c a a c a
 t t g a g a c a g a a c c a c c t t t t g g t
 g a g a g c t a c a t c a t a g t a g g g g c a g g t g a a a a a g c t t
 t g a a a c t a a g c t g g t t c a a g a a a

10

20

30

40

50

g g a

配列番号 137

エンベロープ外部ドメイン ヌクレオチド配列 DENV2

```

t t c c a t t t a a   c c a c a c g t a a   c g g a g a a c c a   c a c a t g a
t c g   t c a g t a g a c a   a g a g a a a g g g
a a a a g t c t t c   t g t t t a a a a c   a g a g g a t g g t   g t g a a c a
t g t   g t a c c c t c a t   g g c c a t g g a c
c t t g g t g a a t   t g t g t g a a g a   t a c a a t c a c g   t a c a a g t
g t c   c t t t t c t c a g   g c a g a a t g a a
c c a g a a g a c a   t a g a t t g t t g   g t g c a a c t c t   a c g t c c a   10
c a t   g g g t a a c t t a   t g g g a c g t g t
a c c a c c a c a g   g a g a a c a c a g   a a g a g a a a a a   a g a t c a g
t g g   c a c t c g t t c c   a c a t g t g g g a
a t g g g a c t g g   a g a c a c g a a c   t g a a a c a t g g   a t g t c a t
c a g   a a g g g g c c t g   g a a a c a t g c c
c a g a g a a t t g   a a a c t t g g a t   c t t g a g a c a t   c c a g g c t
t t a   c c a t a a t g g c   a g c a a t c c t g
g c a t a c a c c a   t a g g a a c g a c   a c a t t t c c a a   a g a g c c c
t g a   t t t t c a t c t t   a c t g a c a g c t
g t c g c t c c t t   c a a t g a c a a t   g c g t t g c a t a   g g a a t a t   20
c a a   a t a g a g a c t t   t g t a g a a g g g
g t t t c a g g a g   g a a g c t g g g t   t g a c a t a g t c   t t a g a a c
a t g   g a a g c t g t g t   g a c g a c g a t g
g c a a a a a a c a   a a c c a a c a t t   g g a t t t t g a a   c t g a t a a
a a a   c a g a a g c c a a   a c a a c c t g c c
a c t c t a a g g a   a g t a c t g t a t   a g a g g c a a a g   c t g a c c a
a c a   c a a c a a c a g a   t t c t c g c t g c
c c a a c a c a a g   g a g a a c c c a g   c c t a a a t g a a   g a g c a g g
a c a   a a a g g t t c g t   c t g c a a a c a c
t c c a t g g t g g   a c a g a g g a t g   g g g a a a t g g a   t g t g g a t   30
t a t   t t g g a a a a g g   a g g c a t t g t g
a c c t g t g c t a   t g t t c a c a t g   c a a a a a g a a c   a t g a a a g
g a a   a a g t c g t g c a   a c c a g a a a a c
t t g g a a t a c a   c c a t t g t g a t   a a c a c c t c a c   t c a g g g g
a a g   a g c a t g c a g t   c g g a a a t g a c
a c a g g a a a a c   a t g g c a a g g a   a a t c a a a a t a   a c a c c a c
a g a   g t t c c a t c a c   a g a a g c a g a g
t t g a c a g g c t   a t g g c a c t g t   c a c g a t g g a g   t g c t c t c
c g a   g a a c g g g c c t   c g a c t t c a a t
g a g a t g g t g t   t g c t g c a a a t   g g a a a a t a a a   g c t t g g c   40
t g g   t g c a c a g g c a   a t g g t t c c t a
g a c c t g c c g t   t g c c a t g g c t   g c c c g g a g c g   g a c a c a c
a a g   g a t c a a a t t g   g a t a c a g a a a
g a g a c a t t g g   t g a c t t t c a a   a a a t c c c c a t   g c g a a g a
a a c   a g g a t g t t g t   t g t t t t g g g a
t c c c a a g a a g   g g g c c a t g c a   c a c a g c a c t c   a c a g g g g
c c a   c a g a a a t c c a   g a t g t c a t c a
g g a a a c t t a c   t g t t c a c a g g   a c a t c t c a a g   t g c a g g c
t g a   g g a t g g a c a a   a c t a c a g c t c
a a a g g a a t g t   c a t a c t c t a t   g t g c a c a g g a   a a g t t t a   50

```

a a g t t g t g a a g g a a a t a g c a g a a
 a c a c a a c a t g g a a c a a t a g t t a t c a g a g t a c a a t a t g
 a a g g g g a c g g t t c t c c a t g t a a g
 a t c c c t t t t g a g a t a a t g g a t t t g g a a a a a a g a c a t g
 t t t t a g g t c g c c t g a t t a c a g t c
 a a c c c a a t c g t a a c a g a a a a a g a t a g c c c a g t c a a c a
 t a g a a g c a g a a c c t c c a t t c g g a
 g a c a g c t a c a t c a t c a t a g g a g t a g a g c c g g g a c a a t
 t g a a g c t c a a c t g g t t t a a g a a a
 g g a

10

配列番号 138

エンベロープ 外部ドメインヌクレオチド配列 DENV3

t t c c a c t t a a c t t c a c g a g a t g g a g a g c c g c g c a t g a
 t t g t g g g g a a g a a t g a a a g a g g a
 a a a t c c c t a c t t t t t a a g a c a g c c t c t g g a a t c a a c a
 t g t g c a c a c t c a t a g c c a t g g a t
 t t g g g a g a g a t g t g t g a t g a c a c g g t c a c t t a c a a a t
 g c c c c c a c a t t a c c g a a g t g g a g
 c c t g a a g a c a t t g a c t g t t g g t g c a a c c t t a c a t c g a
 c a t g g g t g a c t t a t g g a a c a t g c
 a a t c a a g c t g g a g a g c a t a g a c g c g a t a a g a g a t c a g
 t g g c g t t a g c t c c c c a t g t c g g c
 a t g g g a c t g g a c a c a c g c a c t c a a a c c t g g a t g t c g g
 c t g a a g g a g c t t g g a g a c a a g t c
 g a g a a g g t a g a g a c a t g g g c c c t t a g g c a c c c a g g g t
 t t a c c a t a c t a g c c c t a t t t c t t
 g c c c a t t a c a t a g g c a c t t c c t t g a c c c a g a a a g t g g
 t t a t t t t t a t a c t a t t a a t g c t g
 g t t a c c c c a t c c a t g a c a a t g a g a t g t g t g g g a g t a g
 g a a a c a g a g a t t t t g t g g a a g g c
 c t a t c g g g a g c t a c g t g g g t t g a c g t g g t g c t c g a g c
 a c g g t g g g t g t g t g a c t a c c a t g
 g c t a a g a a c a a g c c c a c g c t g g a c a t a g a g c t t c a g a
 a g a c t g a g g c c a c t c a g c t g g c g
 a c c c t a a g g a a g c t a t g c a t t g a g g g a a a a a t t a c c a
 a c a t a a c a a c c g a c t c a a g a t g t
 c c c a c c c a a g g g g a a g c g a t t t t a c c t g a g g a g c a g g
 a c c a g a a c t a c g t g t g t a a g c a t
 a c a t a c g t g g a c a g a g g c t g g g g a a a c g g t t g t g g t t
 t g t t t g g c a a g g g a a g c t t g g t g
 a c a t g c g c g a a a t t t c a a t g t t t a g a a t c a a t a g a g g
 g a a a a g t g g t g c a a c a t g a g a a c
 c t c a a a t a c a c c g t c a t c a t c a c a g t g c a c a c a g g a g
 a c c a a c a c c a g g t g g g a a a t g a a
 a c g c a g g g a g t t a c g g c t g a g a t a a c a t c c c a g g c a t
 c a a c c g c t g a a g c c a t t t t a c c t
 g a a t a t g g a a c c c t c g g g c t a g a a t g c t c a c c a c g g a
 c a g g t t t g g a t t t c a a t g a a a t g
 a t t t t a t t g a c a a t g a a g a a c a a a g c a t g g a t g g t a c
 a t a g a c a a t g g t t c t t t g a c t t a

20

30

40

50

c c c c t a c c a t g g a c a t c a g g a g c t a c a a c a a a a a c a c
 c a a c t t g g a a c a g g a a a g a g c t t
 c t t g t g a c a t t t a a a a a t g c a c a t g c a a a a a a g c a a g
 a a g t a g t t g t c c t t g g a t c a c a a
 g a g g g a g c a a t g c a t a c a g c a c t g a c a g g a g c t a c a g
 a g a t c c a a a c c t c a g g a g g c a c a
 a g t a t t t t t g c g g g g c a c t t a a a a t g t a g a c t c a a g a
 t g g a c a a a t t g a a a c t c a a g g g g
 a t g a g c t a t g c a a t g t g c t t g a a t a c c t t t g t g t t g a
 a g a a a g a a g t c t c c g a a a c g c a g
 c a t g g g a c a a t a c t c a t t a a g g t t g a g t a c a a a g g g g
 a a g a t g c a c c c t g c a a g a t t c c t
 t t c t c c a c g g a g g a t g g a c a a g g g a a a g c t c a c a a t g
 g c a g a c t g a t c a c a g c c a a t c c a
 g t g g t g a c c a a g a a g g a g g a g c c t g t c a a c a t t g a g g
 c t g a a c c t c c t t t t g g g g a a a g t
 a a t a t a g t a a t t g g a a t t g g a g a c a a a g c c c t g a a a a
 t c a a c t g g t a c a g g a a g g g a a

10

配列番号139

エンベロープ外部ドメインヌクレオチド配列DENV4

t t t t c c c t c a g c a c a a g a g a t g g c g a a c c c c t c a t g a
 t a g t g g c a a a a c a t g a a a g g g g g
 a g a c c t c t c t t g t t t a a g a c a a c a g a g g g g a t c a a c a
 a a t g c a c t c t c a t t g c c a t g g a c
 t t g g g t g a a a t g t g t g a g g a c a c t g t c a c g t a t a a a t
 g c c c c c t a c t g g t c a a t a c c g a a
 c c t g a a g a c a t t g a t t g c t g g t g c a a c c t c a c g t c t a
 c c t g g g t c a t g t a t g g g a c a t g c
 a c c c a g a g c g g a g a a c g g a g a c g a g a g a a g c g c t c a g
 t a g c t t t a a c a c c a c a t t c a g g a
 a t g g g a t t g g a a a c a a g a g c t g a g a c a t g g a t g t c a t
 c g g a a g g g g c t t g g a a g c a t g c t
 c a g a g a g t a g a g a g c t g g a t a c t c a g a a a c c c a g g a t
 t c g c g c t c t t g g c a g g a t t t a t g
 g c t t a t a t g a t t g g g c a a a c a g g a a t c c a g c g a a c t g
 t c t t c t t t g t c c t a a t g a t g c t g
 g t c g c c c a t c c t a c g g a a t g c g a t g c g t a g g a g t a g
 g a a a c a g a g a c t t t g t g g a a g g a
 g t c t c a g g t g g a g c a t g g g t c g a c c t g g t g c t a g a a c
 a t g g a g g a t g c g t c a c a a c c a t g
 g c c c a g g g a a a a c c a a c c t t g g a t t t t g a a c t g a c t a
 a g a c a a c a g c c a a g g a a g t g g c t
 c t g t t a a g a a c c t a t t g c a t t g a a g c c t c a a t a t c a a
 a c a t a a c t a c g g c a a c a a g a t g t
 c c a a c g c a a g g a g a g c c t t a t c t g a a a g a g g a a c a g g
 a c c a a c a g t a c a t t t g c c g g a g a
 g a t g t g g t a g a c a g a g g g t g g g g c a a t g g c t g t g g c t
 t g t t t g g a a a a g g a g g a g t t g t g
 a c a t g t g c g a a g t t t t c a t g t t c g g g g a a g a t a a c a g
 g c a a t t t g g t c c a a a t t g a g a a c

20

30

40

50

c t t g a a t a c a c a g t g g t t g t a a c a g t c c a c a a t g g a g
 a c a c c c a t g c a g t a g g a a a t g a c
 a c a t c c a a t c a t g g a g t t a c a g c c a t g a t a a c t c c c a
 g g t c a c c a t c g g t g g a a g t c a a a
 t t g c c g g a c t a t g g a g a a a c t a a c a c t c g a t t g t g a a c
 c c a g g t c t g g a a t t g a c t t t a a t
 g a g a t g a t t c t g a t g a a a a t g a a a a a g a a a a c a t g g c
 t c g t g c a t a a g c a a t g g t t t t t g
 g a t c t g c c t c t t c c a t g g a c a g c a g g a g c a g a c a c a t
 c a g a g g t t c a c t g g a a t t a c a a a
 g a g a g a a t g g t g a c a t t t a a g g t t c c t c a t g c c a a g a
 g a c a g g a t g t g a c a g t g c t g g g a
 t c t c a g g a a g g a g c c a t g c a t t c t g c c c t c g c t g g a g
 c c a c a g a a g t g g a c t c c g g t g a t
 g g a a a t c a c a t g t t t g c a g g a c a t c t t a a g t g c a a a g
 t c c g t a t g g a g a a a t t g a g a a t c
 a a g g g a a t g t c a t a c a c g a t g t g t t c a g g a a a g t t t t
 c a a t t g a c a a a g a g a t g g c a g a a
 a c a c a g c a t g g g a c a a c a g t g g t g a a a g t c a a g t a t g
 a a g g t g c t g g a g c t c c g t g t a a a
 g t c c c c a t a g a g a t a a g a g a t g t a a a c a a g g a a a a a g
 t g g t t g g g c g t a t c a t c t c a t c c
 a c c c c t t t g g c t g a g a a t a c c a a c a g t g t a a c c a a c a
 t a g a a t t a g a a c c c c c t t t g g g
 g a c a g c t a c a t a g t g a t a g g t g t t g g a a a c a g c g c a t
 t a a c a c t c c a t t g g t t c a g g a a a
 g g g

10

20

配列番号 140

A11 軽鎖

Q S V L T Q P V S V S G S P G Q S I T I S C T G T S S N A D T Y N L V S W Y Q Q
 R P G K A P K L M I Y E G T K R P S G V S N R F S A S K S A T A A S L T I S G L
 Q P E D E A D Y Y C C S Y A T S R T L V F G G G T K L T V V

30

配列番号 141

B7 軽鎖

R S Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G I S S D V E T Y N L V S W Y
 E Q H P G K A P K L I I Y E A S K R P S G V S N R F S G S K S G N T A S L A I S
 G L Q A E D E A D Y Y C C S Y A G G K S L V F G G G T R L T V L G Q P K A A P S
 V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P
 V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q
 V T H E G S T V E K T V A P T E C S

40

配列番号 142

A11 の vH 鎖

E V Q L V E S G G G L V R P G G S L R L S C A A S G F S Y S N H W M H W V R Q A
 P G K G L V W V S R I N S D G S T R N Y A D F V K G R F T I S R D N A E N T L Y
 L E M N S L T A D D T A V Y Y C V R D G V R F Y Y D S T G Y Y P D S F F K Y G M
 D V W G Q G T T V T V 配列番号 143

vH B7

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S S H W M H W V R Q A
 P G K G L V W V S R T N S D G S S T S Y A D S V K G R F M I S R D N S K N T V Y

50

L H M N G L R A E D T A V Y F C A R D G V R Y Y Y D S T G Y Y P D N F F Q Y G L
D V W G Q G T T V T V

配列番号 144

v H C 8

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C S A S G F T F S T Y S M H W V R Q A
P G K G L E Y V S A I T G E G D S A F Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
F E M N S L R P E D T A V Y Y C V G G Y S N F Y Y Y Y T M D V W G Q G T T V T V

配列番号 145

v L i g h t C 8

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S I S T F L A W Y Q H K P
G Q A P R L L I Y D A S T R A T G V P A R F S G S R S G T D F T L T I S T L E P
E D F A V Y Y C Q Q R Y N W P P Y T F G Q G T K V E I K

10

配列番号 146

v H C 10

E V Q L V E S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y A M H W V R Q A
P G Q R L E W M G W I N A G N G N T K Y S Q K F Q D R V T I T R D T S A S T A Y
M E L S S L R S E D T A I Y Y C A R D K V D D Y G D Y W F P T L W Y F D Y W G Q
G T L V T V

配列番号 147

v L C 10

20

Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S S D V G G F N Y V S W F Q Q
H P G K A P K L M L Y D V T S R P S G V S S R F S G S K S G N T A S L T I S G L
Q A E D E A D Y Y C S S H T S R G T W V F G G G T K L T V L 配列番号 148

D e n v - 1 の 150 ループ

Q H Q V G N E T T E H G

配列番号 149

D e n v 2 の 150 ループ

E H A V G N D T G K H G

配列番号 150

30

D e n v 3 の 150 ループ

Q H Q V G N E T Q G

配列番号 151

D e n v 4 の 150 ループ

T H A V G N D I P N H G

実施例 17

安定した E 二量体を得るための D V 2 E タンパク質の部位特異的な変異誘発

【0392】

3D構造に基づいて、ジスルフィド結合を作製して、E二量体を安定化させるために、3つの異なるE突然変異体を生成した。1つ目はA259Cを有し、2つ目はS255Cを有し、3つ目は2つの同時に起こる変化：L107C及びA313Cを有した(図32)。突然変異体は、上述のように、野生型DV-2 Eタンパク質のために開発した同じ手順を用いて、昆虫S2細胞において発現した。突然変異体A259Cは、精製した二量体タンパク質の最高収率を得たが、その他の2つの構築物もまた、十分な量の架橋二量体を得た。突然変異体を、抗体結合及びマウス予防接種実験において、野生型と比較した。

40

1. 突然変異体へのFLE及びEDE mAbの結合。

【0393】

FLE(融合ループエピトープ)、EDE(エンベロープ二量体エピトープ)、及びその他(非FLE)mAbの一群を、ELISAによって突然変異体及びWTタンパク質において試験した。図33~36は、A259C突然変異体及びWTにおいてFLE及びE

50

D E m A b の結合活性を示す。

図 37 ~ 40 は、L 107 / A 313 突然変異体及び WT において F L E 及び E D E m A b の結合活性を示す。

2 A 259C 突然変異体によるマウス予防接種

【0394】

マウスを 6 つの群に設定し、下述のように、プライム予防接種を行い、続いて、ブースター予防接種を行った。

群 1 E WT を用いたプライム及びブースト。E WT (単量体 / 単量体)

群 2、E A 259C 突然変異体を用いたプライム及びブースト (二量体 / 二量体)

群 3 p r M / E ウイルス様粒子 (V L P) を用いたプライム及びブースト (V L P / V L P)

群 4 E A 259C 突然変異体を用いたプライム、続いて、V L P を用いたブースト (二量体 / V L P)

群 5 V L P を用いたプライム、続いて、E A 259C 突然変異体を用いたブースト (V L P / 二量体)

群 6 対照マウス (偽物)

【0395】

図 41 ~ 46 は、抗 E 抗体力価、発現 E ドメイン 1 ~ 3 (3 つすべてのドメイン)、ドメイン 1 ~ 2 及びドメイン 3 を発現する酵母への結合、血清型交差反応性、昆虫及び D C ウイルスにおける中和反応、ならびに昆虫ウイルスにおける A D E を示す。

方法

【0396】

組換え可溶性 D E N V エンベロープタンパク質結合 E L I S A

組換え可溶性 D E N V エンベロープタンパク質 (r E) へのヒトモノクローナル A b の結合親和性を決定するために、N u n c イモビライザーアミノプレート (436006、T h e r m o S c i e n t i f i c) を、50 mM 炭酸塩緩衝液 pH 9.6 (C 3041、S i g m a) 中の 10 µg / ml のうちの 50 µl の r E D E N V 2 野生型単量体 (W T)、突然変異体二量体 (A 259C もしくは L 107C / A 313C) またはウシ血清アルブミン (B S A、陰性対照) で直接コーティングした。4 で一晩インキュベートした後、プレートを洗浄緩衝液 (P B S + 0.1% T w e e n - 20) で 3 回洗浄し、200 µl の遮断緩衝液 (P B S + 3% B S A) で、室温で 1 時間遮断し、続いて、遮断緩衝液中の 1 ~ 10 µg / ml のうちの 50 µl のヒトモノクローナル A b で、37 で 1 時間遮断した。その後、プレートを 3 回再度洗浄し、遮断緩衝液 (A 9544、S i g m a) 中の 1 : 10,000 希釈の 50 µl の A L P 共役抗ヒト I g G で、37 で 1 時間さらにインキュベートした。最後に、3 回洗浄した後、100 µl の P N P P 基質 (N 2770、S i g m a) を添加し、室温で 1 時間放置した。この反応は、405 nm で測定した。

マウス

【0397】

雌 C 57 B L / 6 マウスを H a r l a n U K (B i c e s t e r、U K) から得た。マウスは、6 ~ 8 週齢で使用した。すべての動物実験は、英国政府規制 (A n i m a l S c i e n t i f i c P r o c e d u r e s A c t 1986) に従って行われ、英国内務省によって承認された。

予防接種実験

【0398】

マウスに、2% アルヒドロゲル (I n v i v o g e n) に共吸着した 1% v / v の抗原 (5 µg) を腹腔内に投与した。抗原 - ミョウバンの混合を注射前に約 5 分間静置した。プライムから 3 週間後、ミョウバン上に同様に吸着させた 5 µg の抗原を含むブースター注射を打った。血清試料は、ブーストから 3 週間後に回収し、様々なアッセイについて試験した。D V 2 - V L P 上清を、p H L s e c - p r M - E プラスミド D N A との H

10

20

30

40

50

E K 2 9 3 T細胞のP E I媒介トランスフェクションによって生成した。U l t r a D o m aタンパク質フリー培地 (L o n z a、U S A)中に回収されたV L P上清を、濃縮し、C e n t r i c o n (1 0 0 K D aカットオフ)を用いてP B Sに緩衝交換した。E - タンパク質を、捕捉E L I S Aを用いて推定した。簡潔に言えば、V L P上清を、マウス抗F L (4 G 2)を用いて捕捉し、Eタンパク質、3 0 - E 2 (患者から)に対してD E N V特異的ヒト抗体、続いて、ヒトI g G (A 9 5 4 4、S i g m a)に対してA P共役抗体を用いて検出した。比色分析反応は、P N P P基質を用いて発生させ、吸光度は4 0 5 n mで測定した。V L P上清中のEタンパク質は、精製したEタンパク質単量体で生成した標準曲線の非線形回帰分析に基づいて定量化した。予防接種のために使用されるEタンパク質の同等物は、約5 m g /マウスの全タンパク質濃度に対応する約7 n g /マウスであった。V L P調製のための全タンパク質濃縮は、基準としてB S Aを用いたB r a d f o r d方法によって行われた。

生ウイルスにおける抗E抗体の測定

【0399】

様々な Dengue 熱血清型で感染した C 6 3 6 細胞の上清からのウイルスは、1 0 μ g / m l のヒト抗 p r M 抗体、3 - 1 4 7 でコーティングした M a x i s o r p 免疫プレート (4 4 2 4 0 4、N U N C) 上で捕捉した。次いで、ウェルを、1 % B S A 中で希釈した様々な希釈のマウス血清でインキュベートし、続いて、1 : 2 0 0 0 希釈の F c 特異的なヤギ抗マウス I g G - アルカリホスファターゼ共役体 (A 2 4 2 9、S i g m a) でインキュベートした。反応を、P N P P 基質の添加によって可視化し、この反応が 0 . 4 N N a O H で停止した後、吸光度を 4 0 5 n m で読み出した。データをプロットし、G r a p h P a d p r i s m v 6 . 0 3 を用いて分析した。

中和アッセイ

【0400】

マウス血清の中和の可能性は、感染した病巣の数の低減が対照 (抗体なし) と比較する場合に、フォーカス低減中和試験 (F R N T) を用いて判定した。F R N T のために、_ E N R E F _ 1 7 5 5 マイクロリットルの D E N V 由来の C 6 / 3 6 細胞 (C 6 / 3 6 D E N V) または D E N V 由来の D C (D C - D E N V) を、等容積の連続 3 倍希釈 (1 : 5 0 ~ 1 : 3 6 4 5 0 のマウス血清と混合し、3 7 で 1 時間インキュベートした。次いで、5 5 マイクロリットルの混合物を、9 6 ウェルプレート中に 2 重でペロ細胞単分子層に移し、3 7 で 3 日間インキュベートした。次いで、フォーカス形成アッセイを、この細胞単分子層を 2 0 0 u l の P B S で 2 回洗浄することによって行った。次いで、細胞を、1 0 0 u l の 3 . 7 % ホルムアルデヒドで、室温で 1 0 分間固定し、次いで、P B S 中の 1 0 0 u l の 2 % T r i t o n X - 1 0 0 で、室温で 1 0 分間透過処理した。P B S で 2 回洗浄した後、5 0 u l のマウスモノクローナル抗 D E N V エンベロープ A b (4 G 2) を各ウェルに添加し、3 7 で 2 時間インキュベートした。細胞を、P B S で再度洗浄し、P B S 中の 0 . 0 5 % t w e e n - 2 0 / 2 % F B S 中の 1 : 1 0 , 0 0 0 希釈の 5 0 u l の H R P 共役ヤギ抗マウス I g G (P 0 4 4 7、D a k o) で、3 7 で 1 時間インキュベートした。この反応は、D A B 基質 (P B S + 0 . 0 5 g / m l D A B + 0 . 0 3 % H 2 O 2 + 0 . 3 2 % N i C l 2) の添加によって可視化した。

抗体依存性増強アッセイ

【0401】

連続希釈した加熱不活性化マウス血清または対照抗体 (抗 F L : 4 G 2) を、D V 2 ウイルスで、3 7 で 1 時間予めインキュベートした。次いで、ウイルス抗体複合体を、1 × 1 0 ⁵ 個の細胞 / ウェルに播種された U 9 3 7 細胞 (F c 受容体を担持するヒト単球細胞株) に移した。細胞を、ウイルス - 抗体複合体で 4 日間インキュベートし、ウイルス力価は、検出のために、抗 F L、4 G 2 抗体を用いたフォーカス形成アッセイによって、ペロ細胞での力価によって決定された。ウイルス力価は、1 m l 当たりのフォーカス形成単位として読み出し、感染の増強倍率は、抗体の不在下で観察された力価に基づいて計算さ

10

20

30

40

50

れた。データをプロットし、GraphPad prism v6.03を用いて分析した。

結論

【0402】

この実施例におけるさらなるデータは、正確に折り畳まれ、EDE抗体に結合し、免疫原性である、二量体を作製することができることを示す。

【0403】

図32は、単一及び二重部位突然変異の位置を示す。A259C突然変異体は、EDE1抗体のパネルに結合する(図33)。同様に、EDE2パネル抗体結合もまた、A259C突然変異体に結合する(図34)。しかしながら、(図35)FLEパネル抗体はまた、E単量体がFLEへの接近を可能にする中央システイン結合の周りに旋回させることができるため、恐らく結合する(あまり望ましくないと見なされる)。同様に、「非FLE」パネルの抗体(マッピングされていない抗体、非融合ループエピトープ(非FLE)mAb)と称される)は、A259C二量体に結合する(図36)。同様に、二重突然変異体L107C及びA313Cは、EDE1抗体(図37)及びEDE2抗体(図38)に結合する安定した二量体を形成する。しかしながら、この二重突然変異体は、両端で固定されており、FLE抗体(図39)によってあまり認識されず、これはFLE反応の生成を促進しなかった免疫原を好み得る場合に理想的である。非FLE認識(図40)があまりないが、これも良好である。

【0404】

単量体、二量体、及びvlpの異なる組み合わせを有する一連のマウス予防接種を図41に示す。二量体+/-VLPは、DENV2ウイルス粒子を認識する良好な血清抗体を生成する(図41)。VLPとの組み合わせは、良好な交差反応性のある結合反応を開始し(図42)、良好な中和反応を提供することが期待される。四価またはブライムブーストアプローチは、広範な中和反応を生成することが必要とされ得る。

【0405】

VLPは、5µgのEタンパク質当量で使用された、すなわち、E-WT、突然変異体、及びVLPの量は、5µgであった。E-WT及び突然変異体はタンパク質であり、ODに基づいた濃度を測定されるが、一方、VLP調製におけるE濃度は、ELISAによって測定され、WT-Eタンパク質は、標準曲線を設定するために使用された。それ故に、Eタンパク質を、捕捉ELISAを用いて推定した。簡潔に言えば、VLP上清を、マウス抗FL(4G2)を用いて捕捉し、Eタンパク質、30-E2(患者から)に対してDENV特異的ヒト抗体、続いて、ヒトIgG(A9544、Sigma)に対してAP共役抗体を用いて検出した。比色分析反応は、PNPP基質を用いて発生させ、吸光度は405nmで測定した。VLP上清中のEタンパク質は、精製したEタンパク質単量体で生成した標準曲線の非線形回帰分析に基づいて定量化した。5µgのVLPは、約7ngのEタンパク質当量を含む全タンパク質に対応すると見なされる。

【0406】

VLPは、単量体または二量体によって誘発されないであろう抗prM活性を誘発し得る。VLPによって誘発される抗prM活性は、ビリオン結合、交差反応性、ADE、及び中和反応の結果の一因となり得る。

【0407】

DENV2の中和反応の結果は、昆虫(高prM;図43)及びDCウイルス(低prM;図44)の両方のウイルスにおいて単量体を上回る二量体からの優れた反応を示す。図45は、A259C二量体に対して作り出された抗体が、依然として、ADE(DENV感染の抗体依存性増強)を生じ得ることを示す。A259C二量体はまた、FL-Abにも反応し、それ故に、強力なADEを生じ、EDE-Abを取り換えるFL様Abを引き起こし得る。L107C/A313C二量体がADEを誘発するかどうかはまだ知られていない。どの構成成分がADEには重要であるかを試験する1つの可能性としては、DIIIの結合Abからの血清を枯渇させ、再度ADE試験を行うことである。

【0408】

また、所望のEDE反応を増強し、あまり望ましくないFLE及び非FLE/非EDE反応を最小限に抑えるために、安定した二量体へのその他の空洞充填アプローチも行っている。二量体に新しい表面をつける広範囲の変異原性はまた、(あまり望ましくないFLE及び非FLE/非EDEエピトープ/反応を隠すのに役立つために)残基の突然変異またはグリカンの添加によって非EDE準最適反応の生成をさらに低減するために行われる。

【0409】

コアEDEエピトープのモデリング及び最適化はまた、最適な配列を生成し、BNA(広域中和抗体)を誘発するためにも行われる。

10

【0410】

様々な異種技術を用いたプライム及びブーストは、EDEに集中させることが必要とされ得る。

【0411】

有用であると見なされるさらなる二量体は、A259C/S255C二重突然変異体であり、(L107C/T313C二重突然変異体と同様に)、FLEがあまり接近できない二量体を提供し得る。

【0412】

k1ループを再形成し、ピリオン様立体構造を模倣すると見なされるさらなる突然変異は、上で論じられるように、L278Fである。単量体間にシステイン結合を構築し、二量体を形成するために、そのような突然変異及び1つ以上の突然変異の組み合わせが有用であり得る。

20

【0413】

上述のように、EDEを提示する分子、例えば安定した二量体は、例えば、広域中和抗体に対してスクリーニングする際に有用であり得る。

実施例18

EDE構築物または結合化合物を最適化するためのさらなる戦略
タンパク質折り畳み

【0414】

安定した二量体分子の適切な折り畳み及び組み立てを促進するために、EDE結合化合物、例えば、Eタンパク質と同じ細胞中のFabまたはscFvを共発現することは、有用であり得る。これは、タンパク質折り畳みを援助すると見なされ、タンパク質凝集体を排除または低減させるのに役立つ。

30

prMレベルの低減

【0415】

prMを欠いているVLPを産生し、それによってそれらの免疫原性を増加させる可能性があることが望ましく、可能であり得る。

scFvの最適化

【0416】

酵母ディスプレイスクリーニングは、例えば、最適化したscFvのスクリーニングをするために使用され得る。既に特定されたscFvは、例えば、無作為に(または非無作為に)突然変異され、酵母において発現され得る。4種の血清型からの組換え安定化E二量体が調製され、それぞれ、異なる色で区別され得る。scFv発現酵母は、これらのタグ付けタンパク質、及び(scFvが、4種の血清型のそれぞれから安定化したE二量体に結合することができる場合に、選択された4色すべての色を持っている酵母細胞を用いて染色することができる。

40

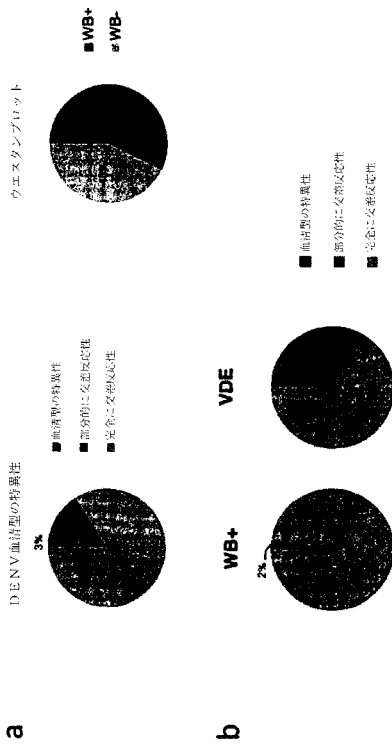
【0417】

酵母染色は、以下のことに基づいて遂行され得る。Eタンパク質ドメイン1+2もしくはドメイン3または3つすべてのドメインを発現する酵母細胞を、PBSで洗浄した。細胞を、FACS緩衝液(1% FCS、0.5% BSAを含有するPBS)中で再懸濁

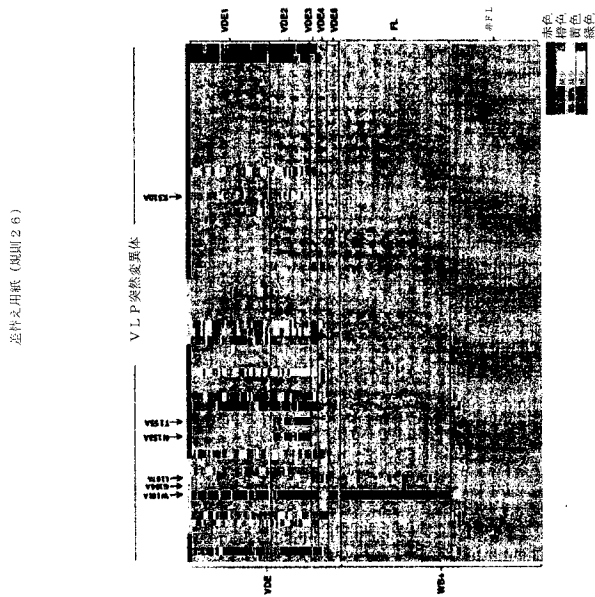
50

し、96ウェルU底プレート中でアリコートした。マウス血清試料(1:300に希釈)を、細胞に添加し、細胞を4℃で一晩インキュベートした。細胞を洗浄し、1:150希釈のウサギ抗マウスIg(Dako R0439)のPE共役(Fab)₂断片で染色した。細胞を4℃で30分間染色し、PBS中でウェルを洗浄し、PBS中の1% PFAを用いて固定した。データは、FACSverse(Becton-Dickinson(Mountain View, CA))を用いて取得し、FlowJoソフトウェア(TreeStar(Ashland, OR))を用いて分析した。

【図1-1】

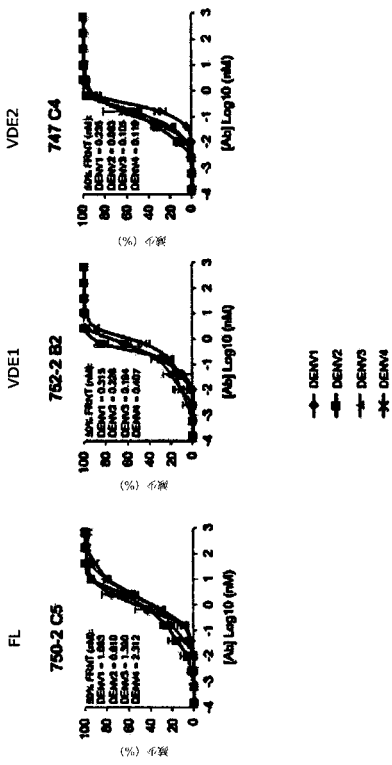


【図1-2】



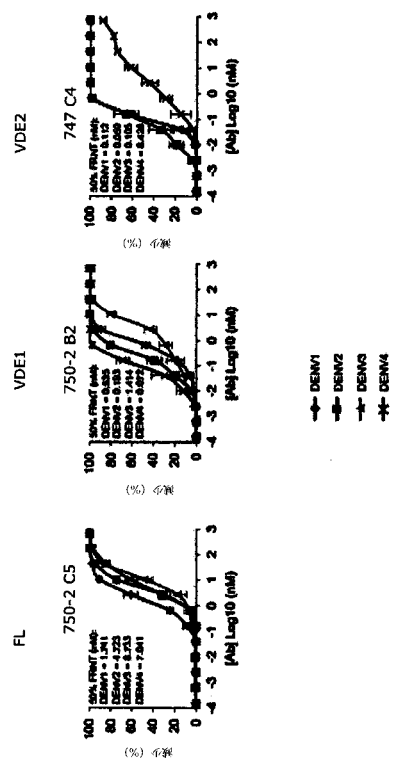
差替え用紙 (規則2.6)

【 図 2 - 1 】



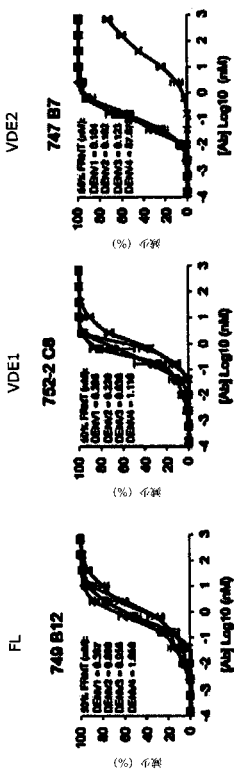
差替文用紙 (規則 2.6)

【 図 2 - 2 】



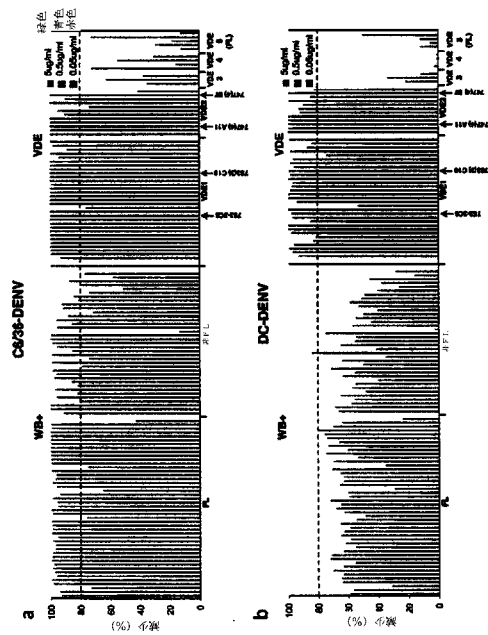
差替文用紙 (規則 2.6)

【 図 2 - 3 】



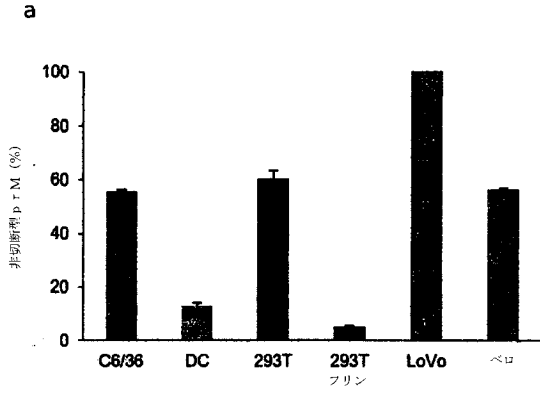
差替文用紙 (規則 2.6)

【 図 3 】



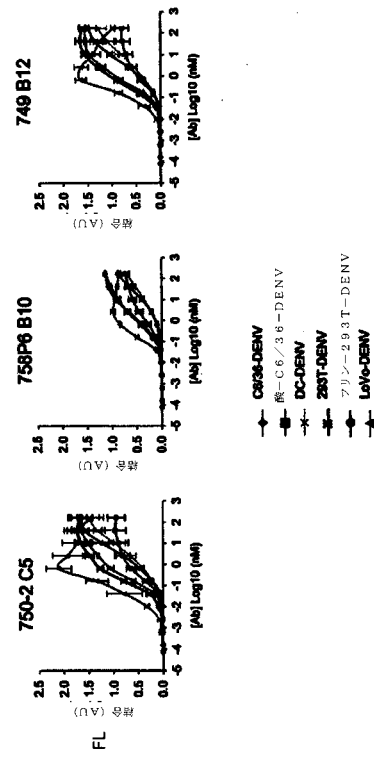
差替文用紙 (規則 2.6)

【 図 4 A 】



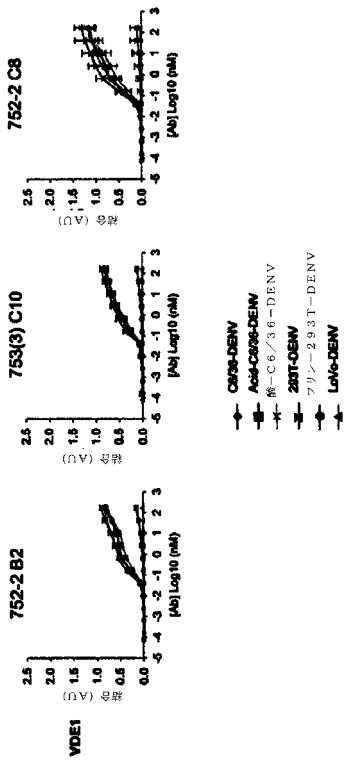
差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 4 B - 1 】



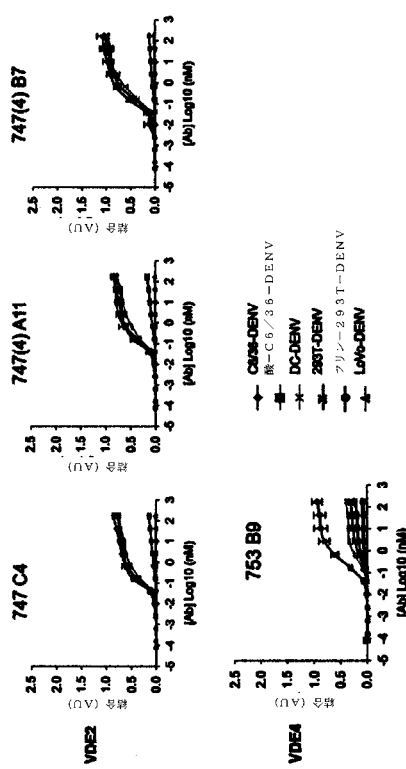
差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 4 B - 2 】



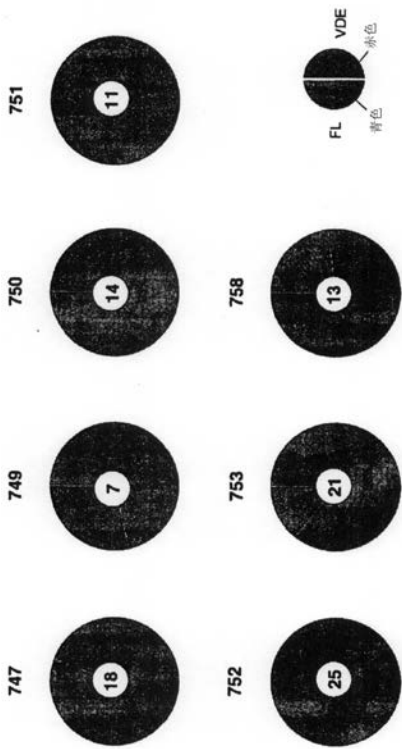
差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 4 B - 3 】

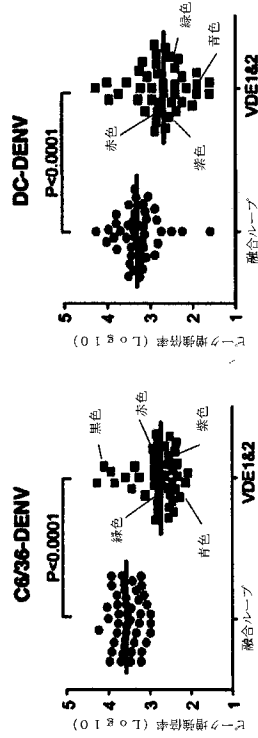


差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 5 A 】



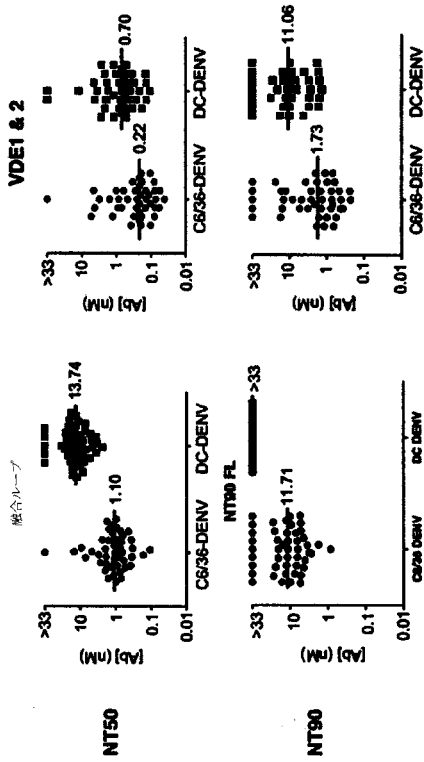
【 図 5 B 】



差替え用紙 (規則 2.6)

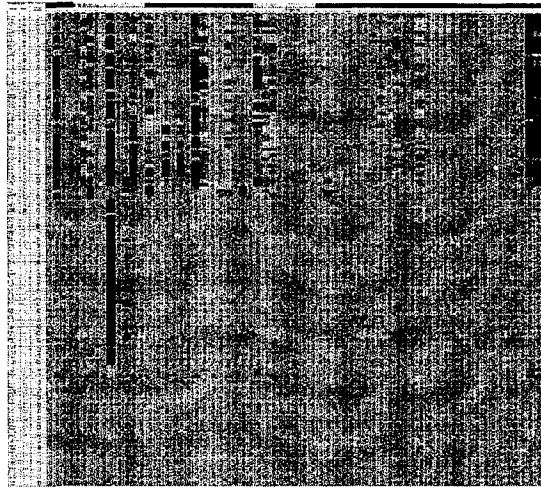
差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 5 C 】



差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 6 】



差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 7 】

表1: VDE1及びVDE2 BNAの生体組成成分

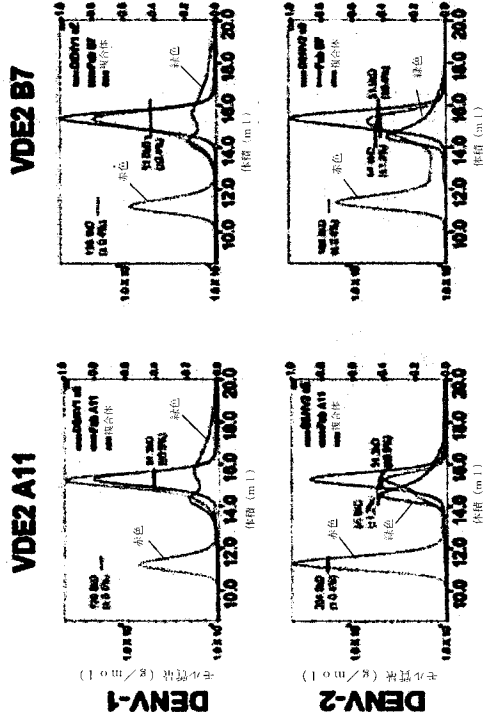
BNA名	V-H対立遺伝子 (28bp)	V-H前座 (28bp)	変化/全体としてV-H遺伝子 (28bp)	V-H対立遺伝子 (28bp)	変化/全体としてV-H遺伝子 (28bp)	II-CDR2.5 (141bp)
VDE2 B7	IGH3-7401	9.9%	IGH4572	IGH3-2201	9.3.10	IGH4572
VDE2 A11	IGH3-7401 ^(B)	8.8%	IGH4572	IGH3-2201	9.3.10	IGH4572
VDE1 C3	IGH3-60706	8.9%	IGH4572	IGH3-2101	9.3.10	IGH4572
VDE1 C10	IGH3-3701	2.7%	IGH4572	IGH3-1701 ^(A)	9.3.10	IGH4572

V-H対立遺伝子 (28bp)	V-H前座 (28bp)	変化/全体としてV-H遺伝子 (28bp)	V-H対立遺伝子 (28bp)	変化/全体としてV-H遺伝子 (28bp)	II-CDR2.5 (141bp)
IGH2-2701 ^(B)	4.5%	IGH3702 ^(B)	IGH3-101	9.3.10	IGH3702 ^(B)
IGH2-2701 ^(B)	6.9%	IGH3702 ^(B)	IGH3-101	9.3.10	IGH3702 ^(B)
IGH3-1101	5.0% ^(B)	IGH4201	IGH3-101	9.3.10	IGH4201
IGH2-4401	3.2%	IGH3702	IGH3-101	9.3.10	IGH3702

V-H、J-H、D-H、V-L、J-Lは、IMGT分析によって分類される、所与のA-Dに示される遺伝子及び対立遺伝子を示している。
 (方法参考) ①、②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧、⑨、⑩、⑪、⑫、⑬、⑭、⑮、⑯、⑰、⑱、⑲、⑳、㉑、㉒、㉓、㉔、㉕、㉖、㉗、㉘、㉙、㉚、㉛、㉜、㉝、㉞、㉟、㊱、㊲、㊳、㊴、㊵、㊶、㊷、㊸、㊹、㊺、㊻、㊼、㊽、㊾、㊿、
 (注) ①、②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧、⑨、⑩、⑪、⑫、⑬、⑭、⑮、⑯、⑰、⑱、⑲、⑳、㉑、㉒、㉓、㉔、㉕、㉖、㉗、㉘、㉙、㉚、㉛、㉜、㉝、㉞、㉟、㊱、㊲、㊳、㊴、㊵、㊶、㊷、㊸、㊹、㊺、㊻、㊼、㊽、㊾、㊿、
 CDR1、CDR2、CDR3

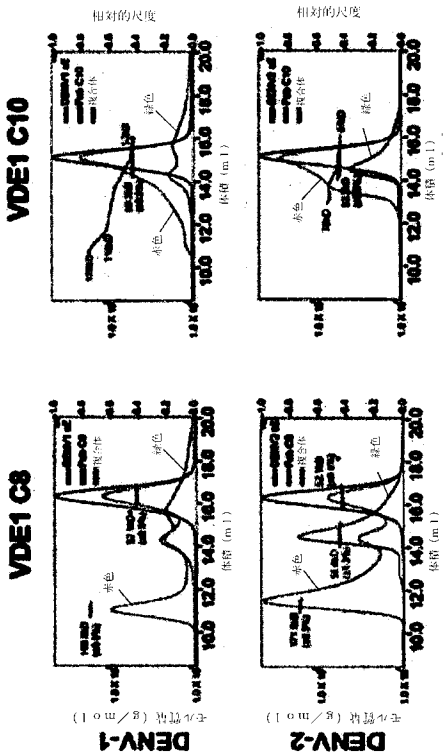
変換用紙 (規則2.6)

【 図 8 A - 1 】



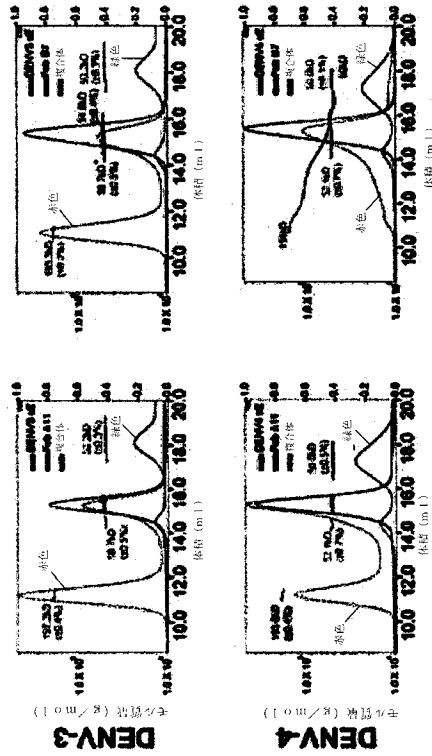
変換用紙 (規則2.6)

【 図 8 A - 2 】



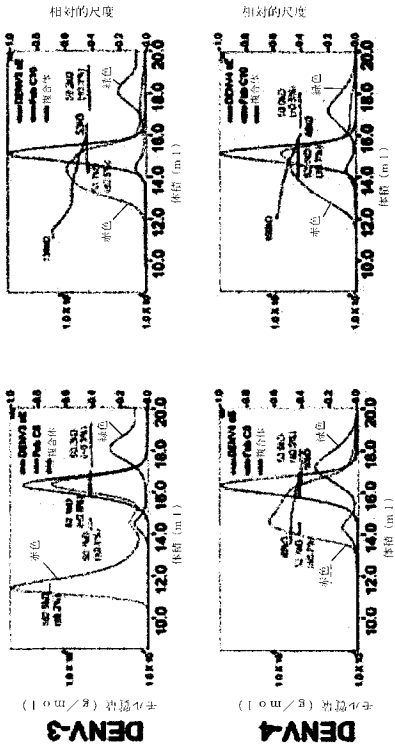
変換用紙 (規則2.6)

【 図 8 A - 3 】



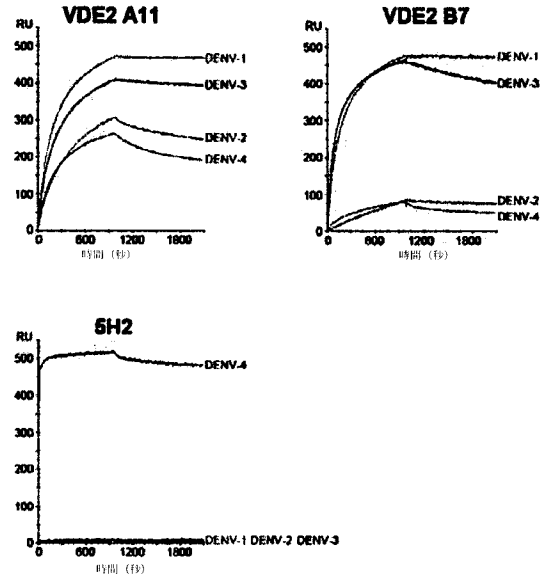
変換用紙 (規則2.6)

【 図 8 A - 4 】



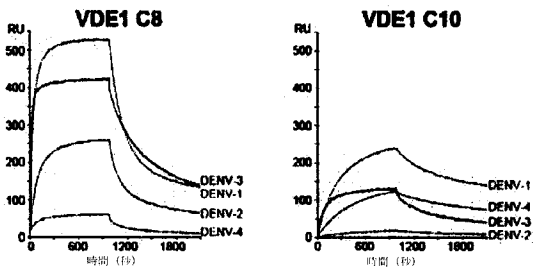
発特用紙 (規則 2.6)

【 図 8 B - 1 】



発特用紙 (規則 2.6)

【 図 8 B - 2 】



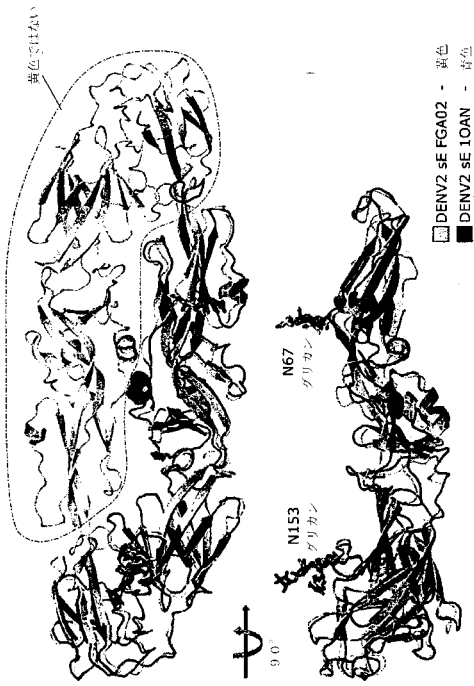
発特用紙 (規則 2.6)

【 図 9 】

試料名	検出器	検出波長 (nm)	検出感度 (RU/1000)	検出下限 (RU)	検出上限 (RU)	検出範囲 (RU)	検出精度 (RU)	検出速度 (RU/秒)	検出時間 (秒)	検出回数	検出エラー
DENV-1	SPR	670	1.0	0.1	100	0.1 ~ 100	±0.1	1.0	100	10	0
DENV-2	SPR	670	1.0	0.1	100	0.1 ~ 100	±0.1	1.0	100	10	0
DENV-3	SPR	670	1.0	0.1	100	0.1 ~ 100	±0.1	1.0	100	10	0
DENV-4	SPR	670	1.0	0.1	100	0.1 ~ 100	±0.1	1.0	100	10	0

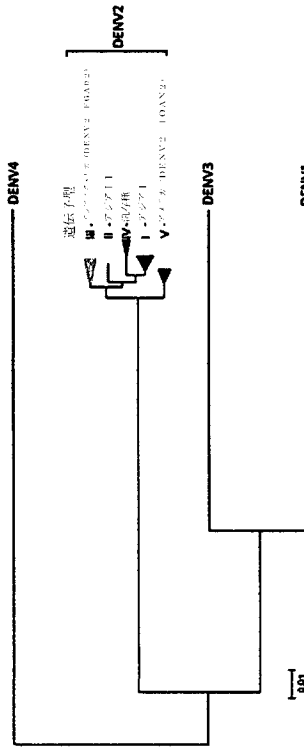
発特用紙 (規則 2.6)

【 図 1 0 a 】



タンパク質のモデル (図 2.6)

【 図 1 0 b 】



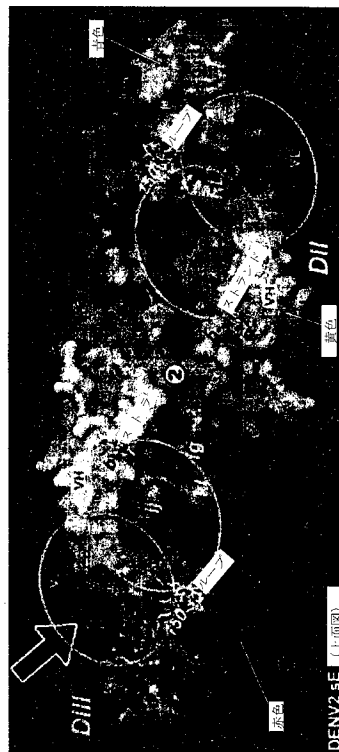
タンパク質のモデル (図 2.6)

【 図 1 1 A 】



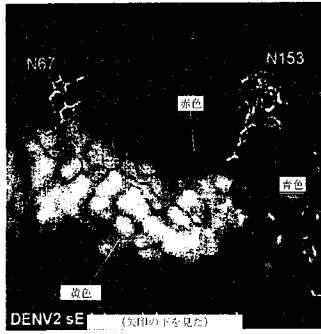
タンパク質のモデル (図 2.6)

【 図 1 1 B 】

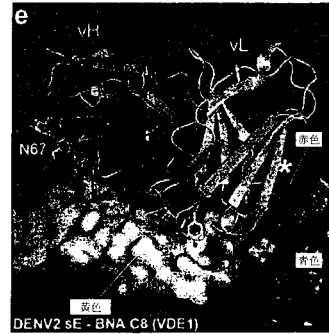


タンパク質のモデル (図 2.6)

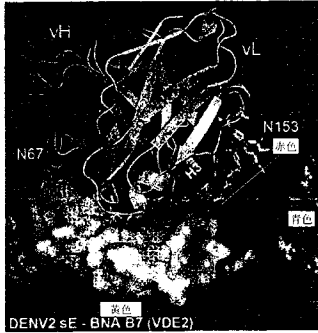
【図 1 1 C】



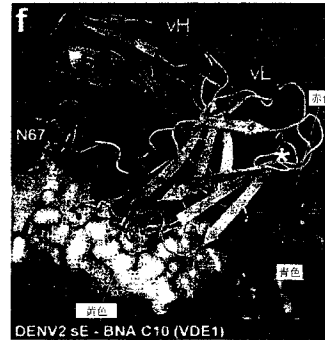
【図 1 1 E】



【図 1 1 D】



【図 1 1 F】

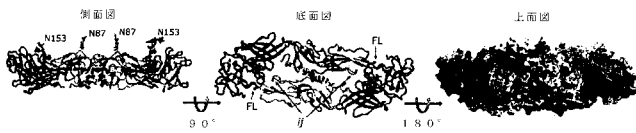


差映元用紙 (規則 2.6)

差映元用紙 (規則 2.6)

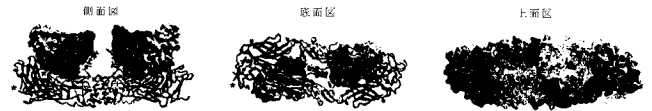
【図 1 2 a】

DENV2 sE



【図 1 2 c】

DENV2 sE/C8 (VDE1 BNA)



【図 1 2 b】

DENV2 sE/87 (VDE2 BNA)

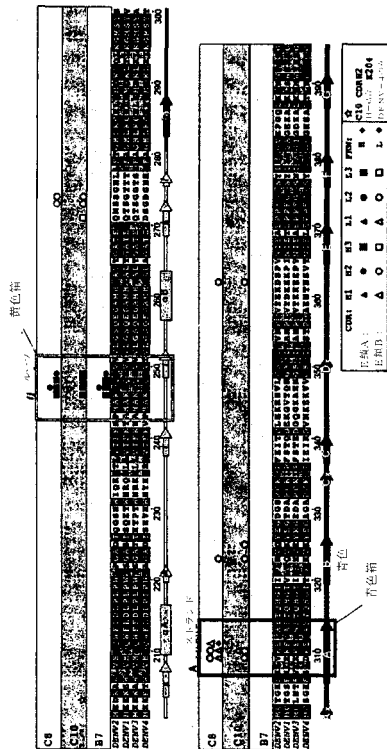


【図 1 2 d】

DENV2 sE/C10 (VDE1 BNA)

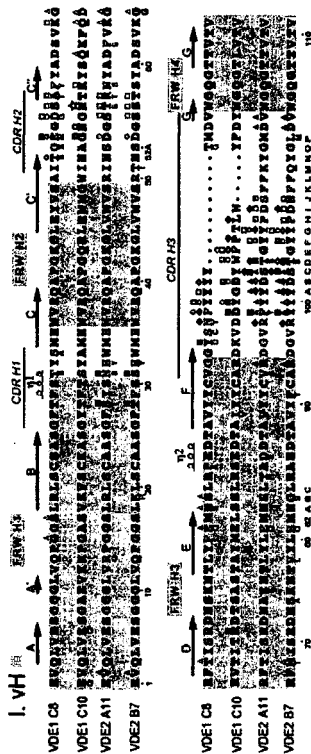


【 図 15 A - 2 】



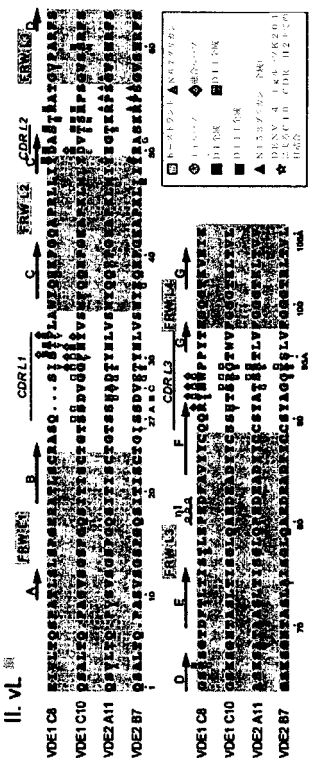
発酵之用紙 (規則2.6)

【 図 15 B - 1 】



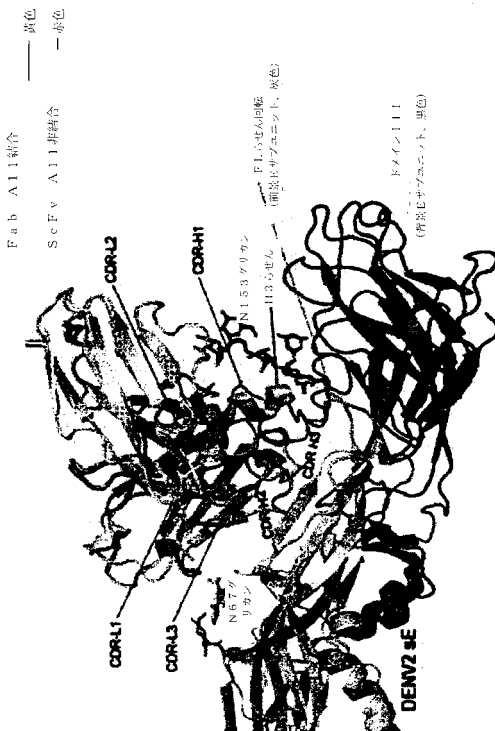
発酵之用紙 (規則2.6)

【 図 15 B - 2 】



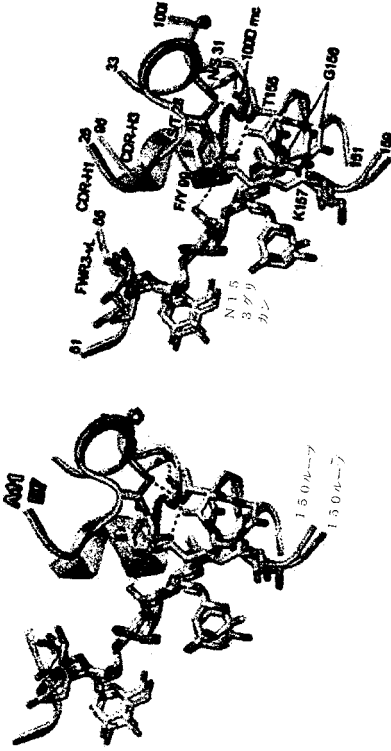
発酵之用紙 (規則2.6)

【 図 16 A 】



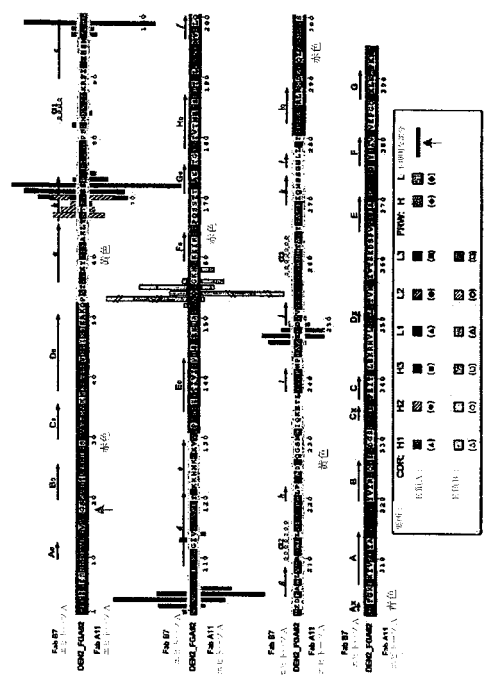
発酵之用紙 (規則2.6)

【図16B】



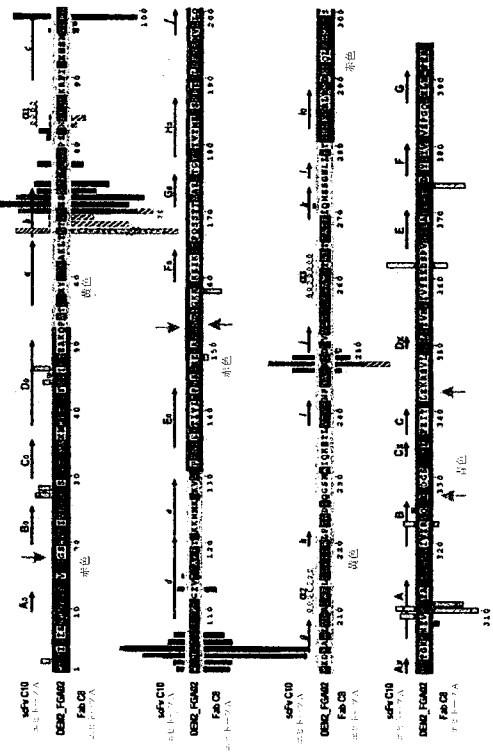
若替之用紙 (規則2.6)

【図16C】



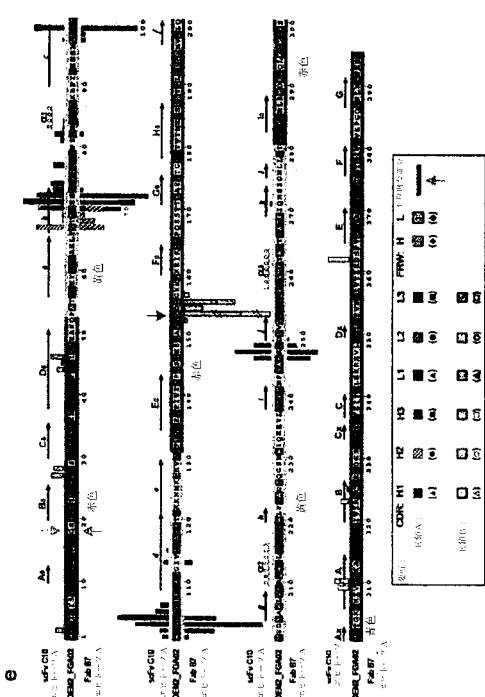
若替之用紙 (規則2.6)

【図16D】



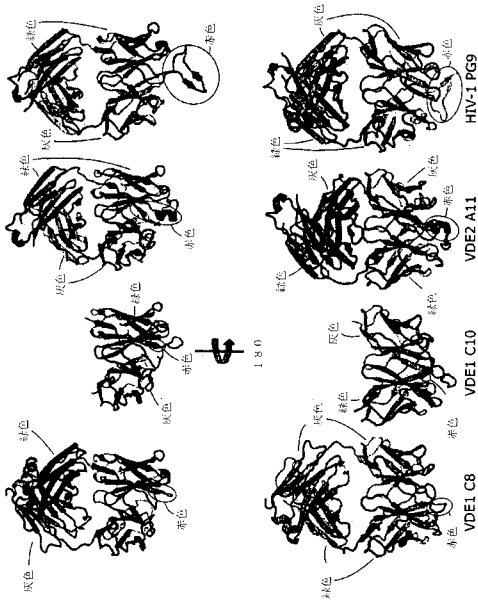
若替之用紙 (規則2.6)

【図16E】

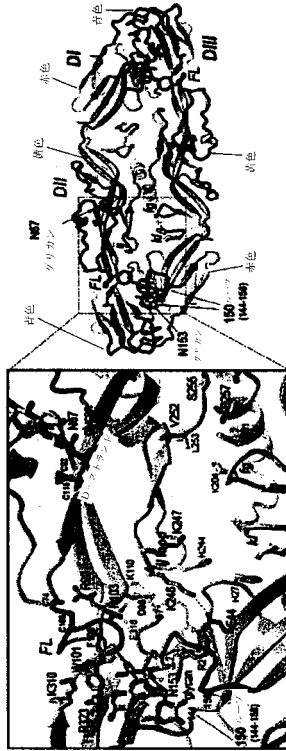


若替之用紙 (規則2.6)

【 図 17 】



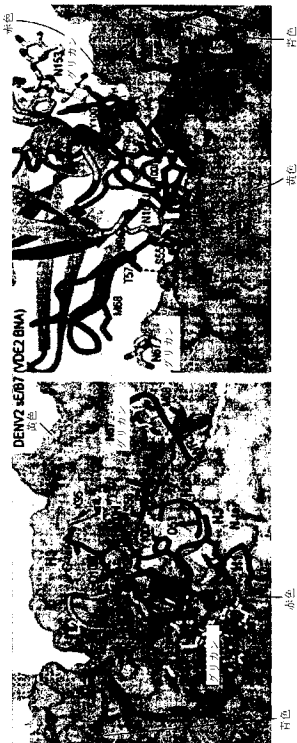
【 図 18 A 】



蛋白之用紙 (規則2.6)

蛋白之用紙 (規則2.6)

【 図 18 B 】



蛋白之用紙 (規則2.6)

蛋白之用紙 (規則2.6)

【 図 18 C 】

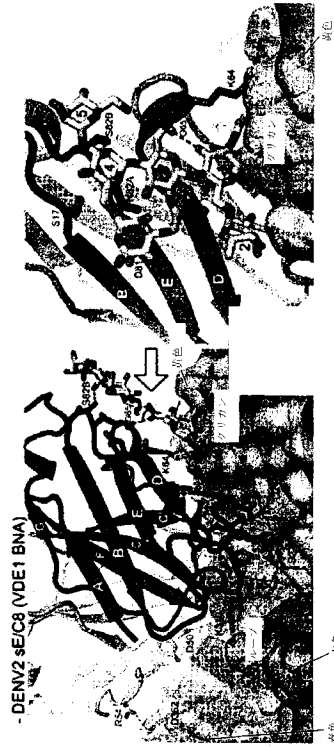


【図18D】



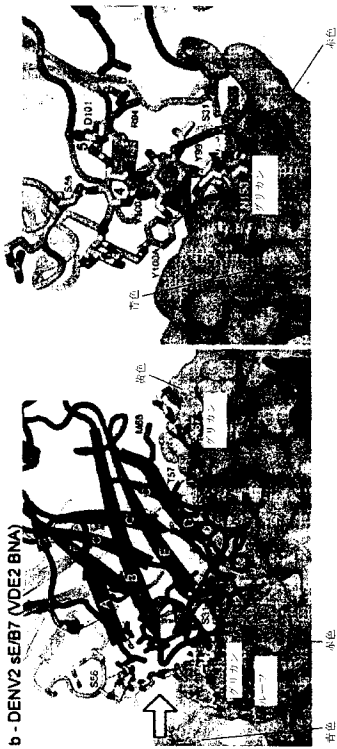
差粒を用紙 (規則2.6)

【図19A】



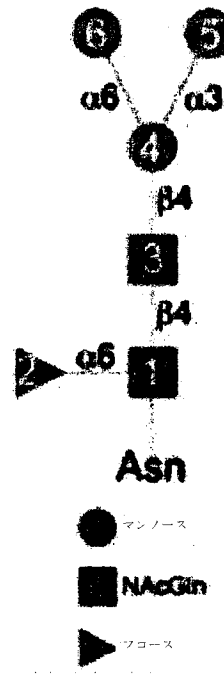
差粒を用紙 (規則2.6)

【図19B】



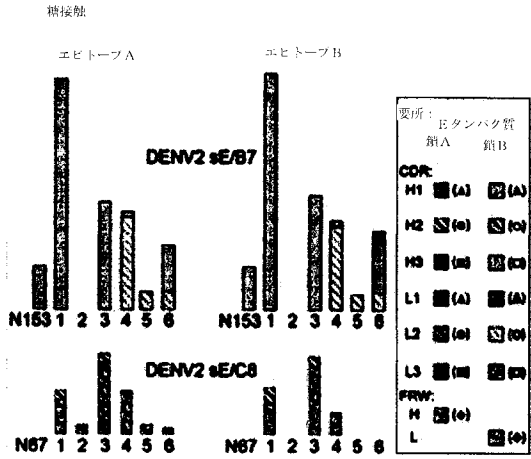
差粒を用紙 (規則2.6)

【図19C】



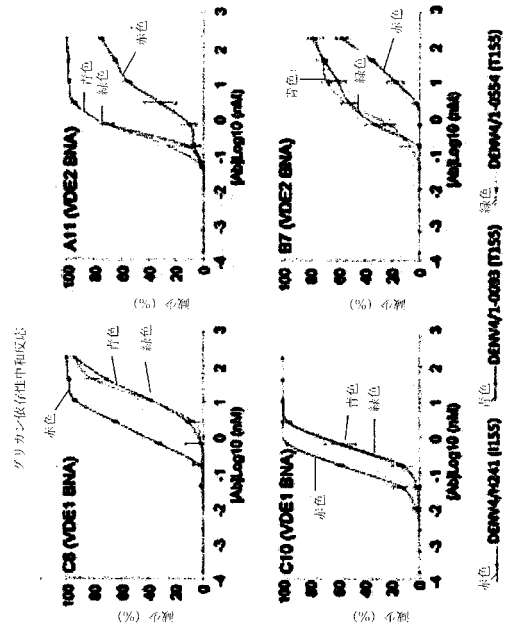
差粒を用紙 (規則2.6)

【図19D】



差替え用紙 (規則2.6)

【図19E】



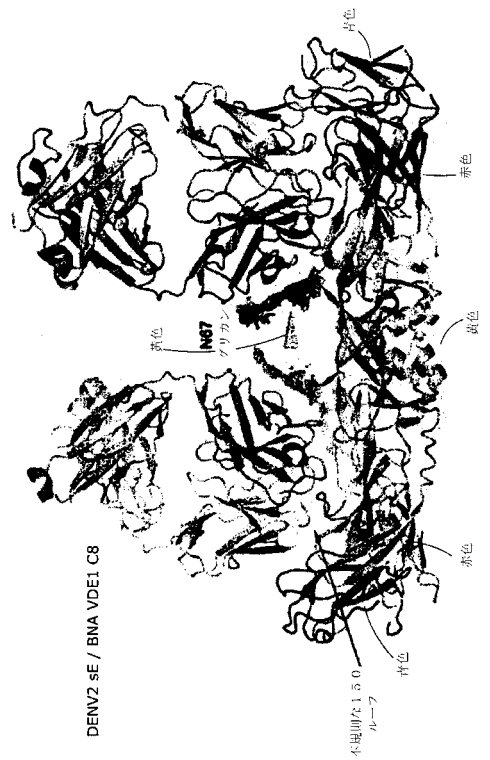
差替え用紙 (規則2.6)

【図20A】



差替え用紙 (規則2.6)

【図20B】



差替え用紙 (規則2.6)

【 20C 】



若林之用紙 (規則2.6)

【 21-1 】

DENV2 / VDE2 B7		DENV2 / VDE1 C8		DENV2 / VDE1 C10		DENV2 / VDE1 C10	
種名	採取地	種名	採取地	種名	採取地	種名	採取地
A	...	A	...	A	...	A	...
B	...	B	...	B	...	B	...
C	...	C	...	C	...	C	...
D	...	D	...	D	...	D	...

若林之用紙 (規則2.6)

【 21-2 】

種名	採取地	種名	採取地	種名	採取地	種名	採取地
A	...	A	...	A	...	A	...
B	...	B	...	B	...	B	...
C	...	C	...	C	...	C	...
D	...	D	...	D	...	D	...

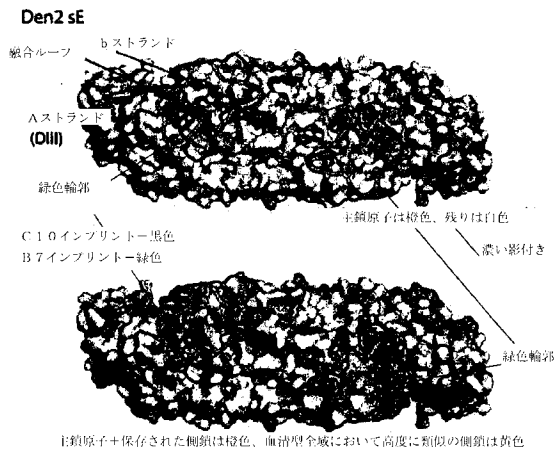
若林之用紙 (規則2.6)

【 21-3 】

種名	採取地	種名	採取地	種名	採取地	種名	採取地
A	...	A	...	A	...	A	...
B	...	B	...	B	...	B	...
C	...	C	...	C	...	C	...
D	...	D	...	D	...	D	...

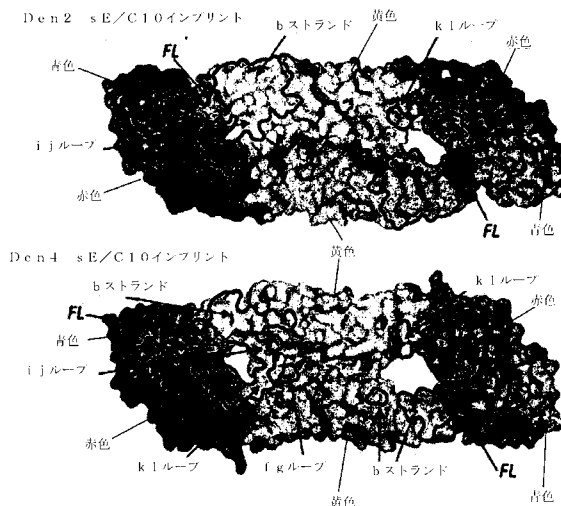
若林之用紙 (規則2.6)

【 図 2 2 A 】



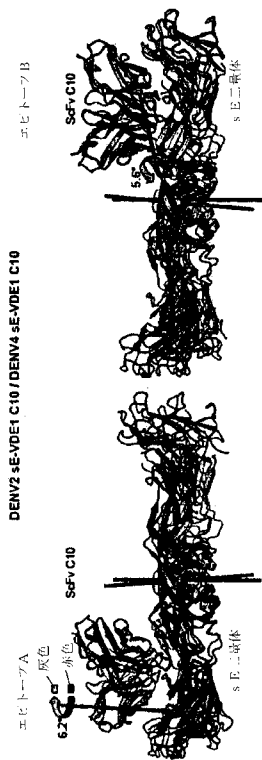
差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 2 2 B 】



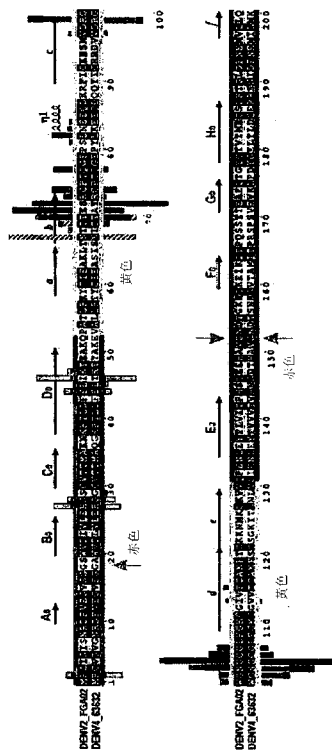
差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 2 3 - 1 】



差替え用紙 (規則 2.6)

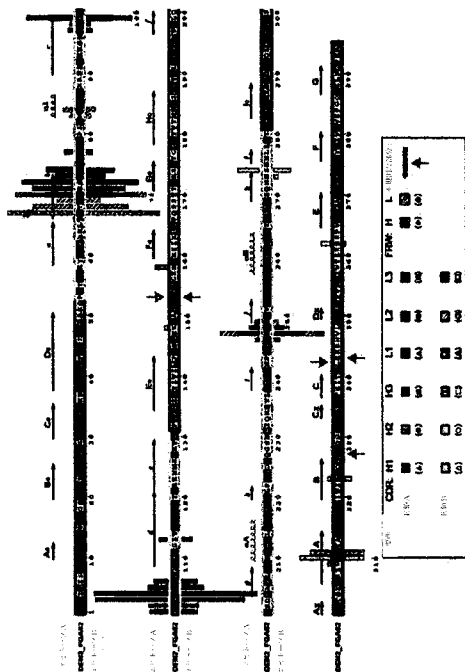
【 図 2 3 - 2 】



差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 2 4 B - 2 】

II - エボラウイルス及びB1における sE 抗原体の BNA の原子座標の核のヒストグラム

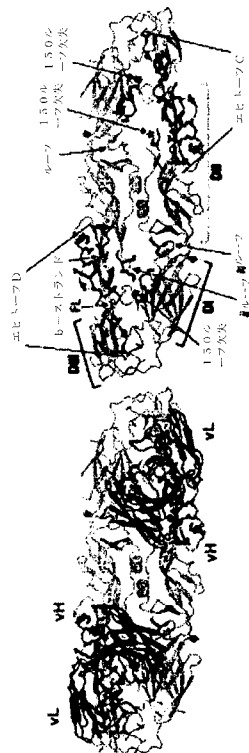


発露之用紙 (規則 2.6)

【 図 2 4 B - 3 】

b (続き) - DENV2 sE / BNA VDE1 C10 複合体

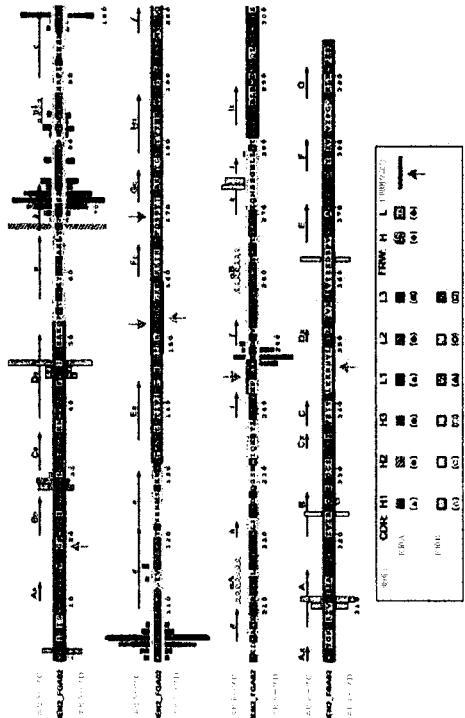
III - エボラウイルスの局在を有する 3D 構造モデルの核 (製品の仕事単位での第 2 の複合体)



発露之用紙 (規則 2.6)

【 図 2 4 B - 4 】

IV - エボラウイルス及びB1における sE 抗原体の BNA の原子座標の核のヒストグラム

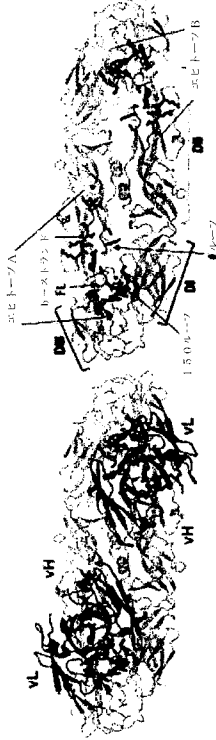


発露之用紙 (規則 2.6)

【 図 2 4 C - 1 】

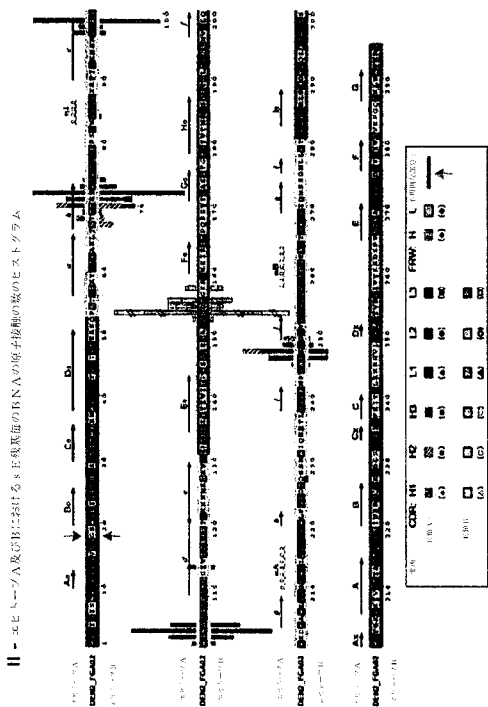
C- DENV2 sE / BNA VDE2 A11 複合体

I - エボラウイルスの局在を有する 3D 構造モデル

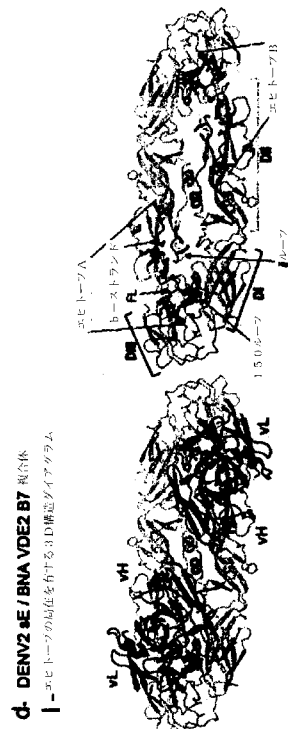


発露之用紙 (規則 2.6)

【 図 2 4 C - 2 】



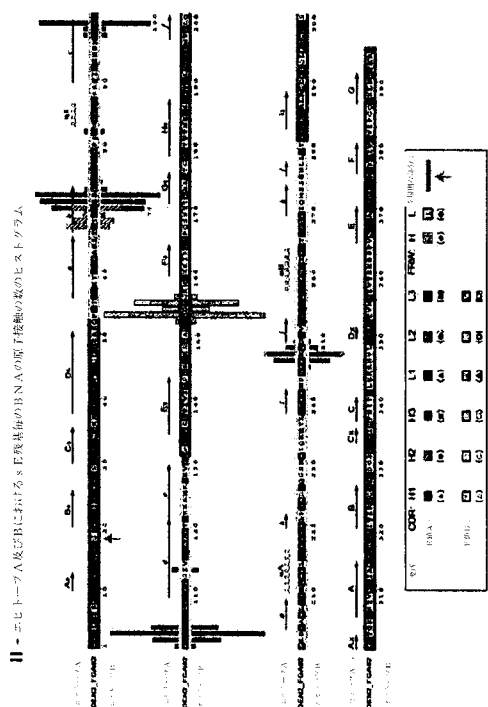
【 図 2 4 D - 1 】



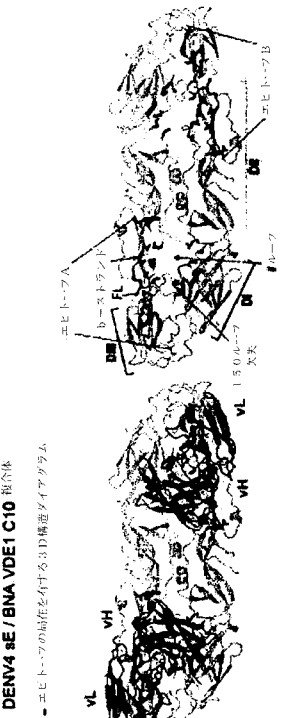
発性用紙 (規則2.6)

発性用紙 (規則2.6)

【 図 2 4 D - 2 】



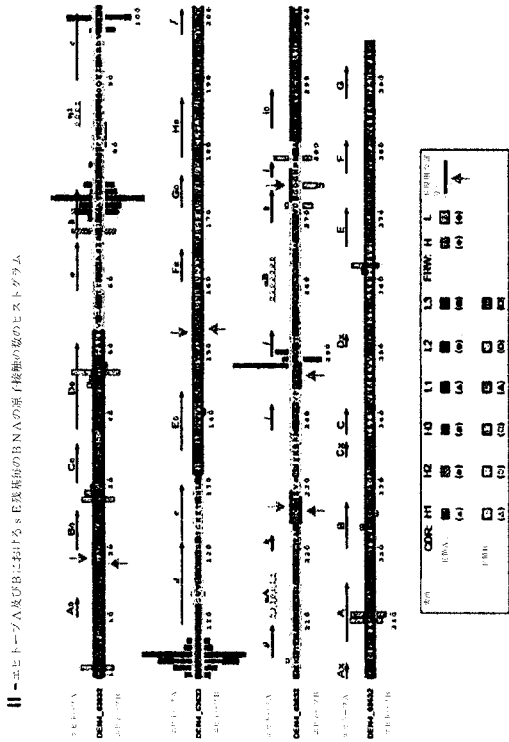
【 図 2 4 E - 1 】



発性用紙 (規則2.6)

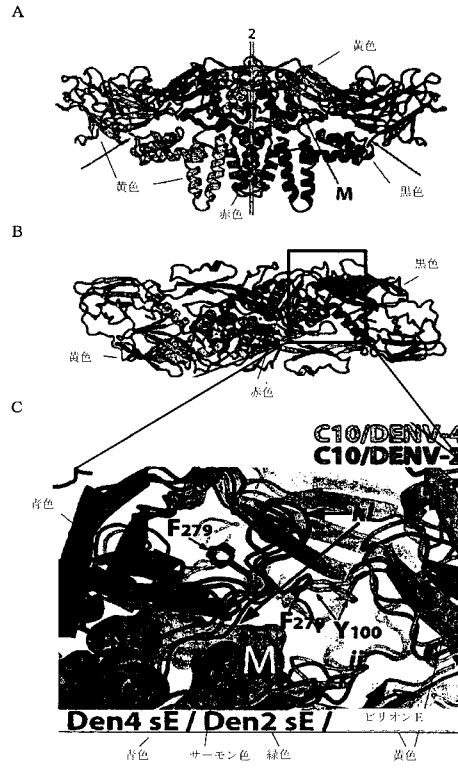
発性用紙 (規則2.6)

【 図 2 4 E - 2 】



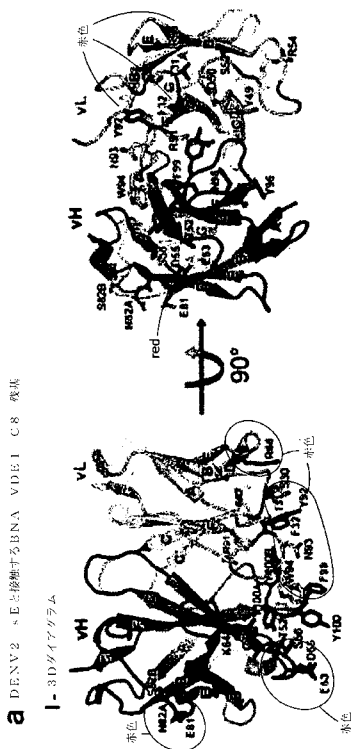
差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 2 5 】



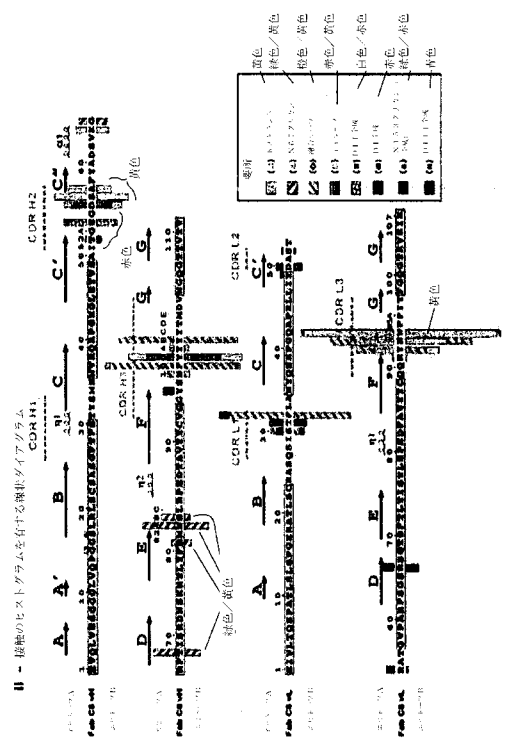
差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 2 6 A - 1 】



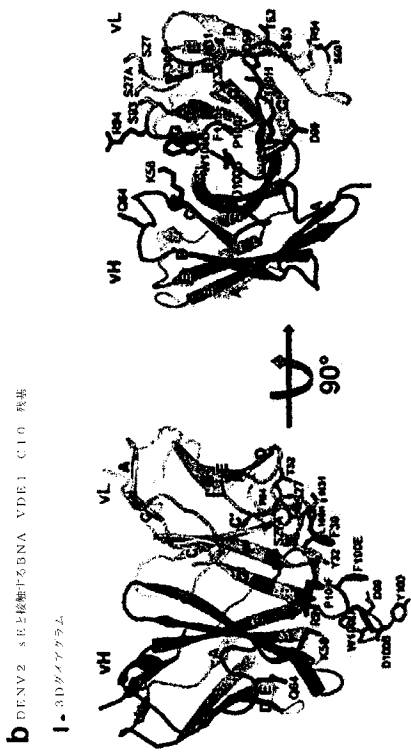
差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 2 6 A - 2 】



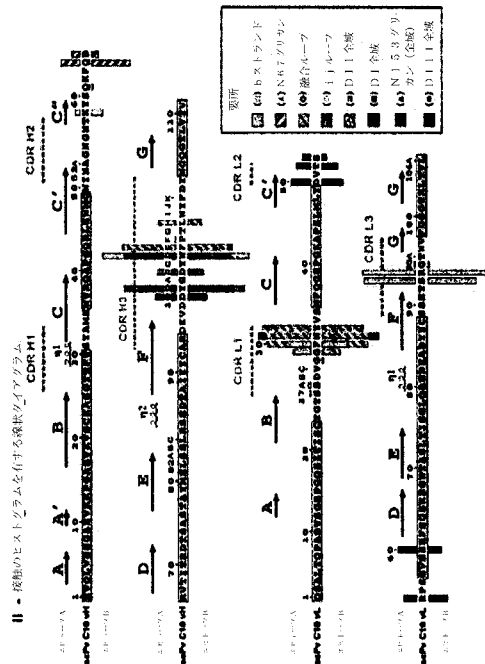
差替え用紙 (規則 2.6)

【 図 2 6 B - 1 】



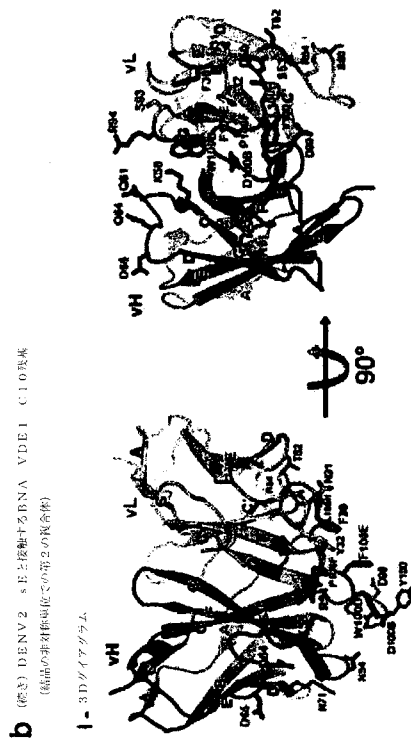
発意之用紙 (規則2.6)

【 図 2 6 B - 2 】



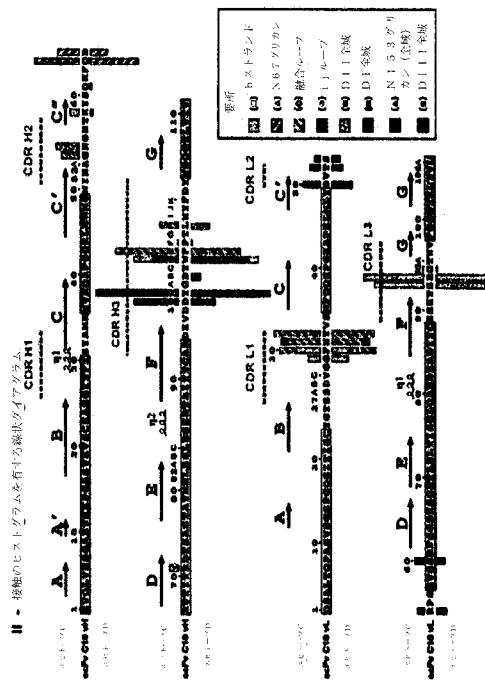
発意之用紙 (規則2.6)

【 図 2 6 B - 3 】



発意之用紙 (規則2.6)

【 図 2 6 B - 4 】

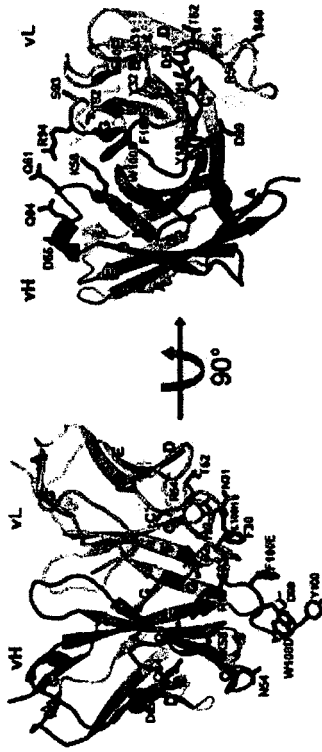


発意之用紙 (規則2.6)

【 26 E - 1 】

e DENV4 s E と接合する BNA VDE1 C10 様体

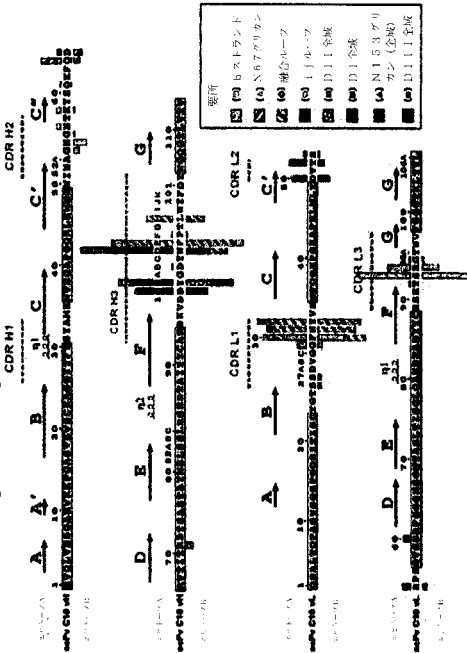
i-3D タイヤグラフ



若替え用紙 (規則 2.6)

【 26 E - 2 】

ii - 接合のヒストグラムを有する領域のタイアグラフ



若替え用紙 (規則 2.6)

【 27 】

延長チンク クラス 表 1. RSV, インフルエンザ, 及 CHIV, BNA との デジ グラム VDE, FNA の 比較 BSA 及び 生 物 種 別 分 析

Table with columns: 種別 (Species), BSA (BSA), BSA(%) (BSA%), 種別 (Species), BSA (BSA), BSA(%) (BSA%), 種別 (Species), BSA (BSA), BSA(%) (BSA%). Rows include VDE2, VDE1, RSV, CH45, CH60, H1V, and H1V. The table compares BSA values and percentages across different species and protein variants.

若替え用紙 (規則 2.6)

【 28 】

>DENV1 株 Hawaii 1
MRCVGI...
>DENV2 株 16681
MRCIGM...
>DENV3 株 1187
MRCVGV...
>DENV4 株 2411
MRCVGV...
上表: 細胞外ドメイン
ハイライト: 150 ループ配列

若替え用紙 (規則 2.6)

【 29 - 1 】

英字 D 番号	英字 一ノ 番号	英字 番号	英字 番号 (11桁)	英字 番号 (18桁)
747(14) B3	EDE1 40	EDE1 40	QVQLVDSGGLVQVGGSLALSCASGRTFTYSHHWVQAP KGLVETSAITFDGDSAFVADSVKGRFTLSDIKDDSKV VSD	QVQLVDSGGLVQVGGSLALSCASGRTFTYSHHWVQAP KGLVETSAITFDGDSAFVADSVKGRFTLSDIKDDSKV VSD
747 A1,2	EDE1 41	EDE1 41	QVQLVDSGGLVQVGGSLALSCASGRTFTYSHHWVQAP KGLVETSAITFDGDSAFVADSVKGRFTLSDIKDDSKV VSD	QVQLVDSGGLVQVGGSLALSCASGRTFTYSHHWVQAP KGLVETSAITFDGDSAFVADSVKGRFTLSDIKDDSKV VSD
752 B10	EDE1 42	EDE1 42	QVQLVDSGGLVQVGGSLALSCASGRTFTYSHHWVQAP KGLVETSAITFDGDSAFVADSVKGRFTLSDIKDDSKV VSD	QVQLVDSGGLVQVGGSLALSCASGRTFTYSHHWVQAP KGLVETSAITFDGDSAFVADSVKGRFTLSDIKDDSKV VSD
752 B11	EDE1 43	EDE1 43	QVQLVDSGGLVQVGGSLALSCASGRTFTYSHHWVQAP KGLVETSAITFDGDSAFVADSVKGRFTLSDIKDDSKV VSD	QVQLVDSGGLVQVGGSLALSCASGRTFTYSHHWVQAP KGLVETSAITFDGDSAFVADSVKGRFTLSDIKDDSKV VSD
752 C9	EDE1 44	EDE1 44	QVQLVDSGGLVQVGGSLALSCASGRTFTYSHHWVQAP KGLVETSAITFDGDSAFVADSVKGRFTLSDIKDDSKV VSD	QVQLVDSGGLVQVGGSLALSCASGRTFTYSHHWVQAP KGLVETSAITFDGDSAFVADSVKGRFTLSDIKDDSKV VSD

英字文用紙 (規則 2.6)

【 29 - 3 】

英字 2) B4 <th>英字 2) B11 <th>英字 2) A2 <th>英字 2) A4 <th>英字 2) A5 </th></th></th></th>	英字 2) B11 <th>英字 2) A2 <th>英字 2) A4 <th>英字 2) A5 </th></th></th>	英字 2) A2 <th>英字 2) A4 <th>英字 2) A5 </th></th>	英字 2) A4 <th>英字 2) A5 </th>	英字 2) A5
752(2) B4	EDE1 30	EDE1 30	EDE1 30	EDE1 30
752(2) B4	EDE1 31	EDE1 31	EDE1 31	EDE1 31
752(2) B11	EDE1 32	EDE1 32	EDE1 32	EDE1 32
752- 2 A2	EDE1 33	EDE1 33	EDE1 33	EDE1 33
752- 2 A4	EDE1 34	EDE1 34	EDE1 34	EDE1 34
752- 2 A5	EDE1 35	EDE1 35	EDE1 35	EDE1 35

英字文用紙 (規則 2.6)

【 29 - 2 】

英字 2) A2 <th>英字 2) A5 <th>英字 2) A7 <th>英字 2) A8 <th>英字 2) B10 </th></th></th></th>	英字 2) A5 <th>英字 2) A7 <th>英字 2) A8 <th>英字 2) B10 </th></th></th>	英字 2) A7 <th>英字 2) A8 <th>英字 2) B10 </th></th>	英字 2) A8 <th>英字 2) B10 </th>	英字 2) B10
752(2) A2	EDE1 45	EDE1 45	EDE1 45	EDE1 45
752(2) A5	EDE1 46	EDE1 46	EDE1 46	EDE1 46
752(2) A7	EDE1 47	EDE1 47	EDE1 47	EDE1 47
752(2) A8	EDE1 48	EDE1 48	EDE1 48	EDE1 48
752- B10	EDE1 49	EDE1 49	EDE1 49	EDE1 49

英字文用紙 (規則 2.6)

【 29 - 4 】

英字 2) B2 <th>英字 2) B3 <th>英字 2) B4 <th>英字 2) B7 </th></th></th>	英字 2) B3 <th>英字 2) B4 <th>英字 2) B7 </th></th>	英字 2) B4 <th>英字 2) B7 </th>	英字 2) B7
752- 2 B2	EDE1 56	EDE1 56	EDE1 56
752- 2 B3	EDE1 57	EDE1 57	EDE1 57
752- 2 B4	EDE1 58	EDE1 58	EDE1 58
752- 2 B7	EDE1 59	EDE1 59	EDE1 59
752- 2 B7	EDE1 60	EDE1 60	EDE1 60

英字文用紙 (規則 2.6)

【 29 - 5 】

752	EDE	61	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	107	EVLVQSPVAVLSPRERATLSCASGRTF IYDSTRATVPAVPSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
-2	1				
B11					
752	EDE	62	SOVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	108	DIWVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF IYDSTRATVPAVPSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
-2	1				
C4					
752	EDE	1	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	37	EVLVQSPVAVLSPRERATLSCASGRTF IYDSTRATVPAVPSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
-2	1				
C8					
753	EDE	2	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	38	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
(3)	1				
C10					
753	EDE	63	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	109	DIWVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF IYDSTRATVPAVPSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
(3)	1				
B10					
759	EDE	64	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	110	EVLVQSPVAVLSPRERATLSCASGRTF IYDSTRATVPAVPSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
(3)	1				

亮替文用紙 (規則2.6)

【 29 - 6 】

759	EDE	65	QVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	111	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
3	1				
759	EDE	66	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	112	QVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
3	1				
759	EDE	67	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	113	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
3	1				
759	EDE	68	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	114	DIWVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF IYDSTRATVPAVPSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
3	1				
759	EDE	69	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	115	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
3	1				
759	EDE	70	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	116	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
3	1				

亮替文用紙 (規則2.6)

【 29 - 7 】

747	EDEZ	71	QVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	117	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
B8					
747	EDEZ	72	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	118	DIWVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF IYDSTRATVPAVPSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
C2					
747	EDEZ	73	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	119	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
D8					
747(4)	EDEZ	74	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	120	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
A3					
747(4)	EDEZ	75	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	121	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
A10					
747(4)	EDEZ	3	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	39	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK
A11					

亮替文用紙 (規則2.6)

【 29 - 8 】

747(4)	EDEZ	76	QVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	122	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
B4					
747(4)	EDEZ	77	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	123	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
B6					
747(4)	EDEZ	4	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	40	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
B7					
747(4)	EDEZ	78	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	124	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
D6					
747	EDEZ	79	EVLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF TSLHVRQVPGKLEKLSALITGDSG FVAVSFRFTLSRDSKRTVFNHSLA PFTVFGKTVKLEK	125	QSLVQSGVAVKPGSIVKSCASGRTF LMLDVTBRSQVSRFSGSRSDFTLITSL PFTVFGKTVKLEK
B2					

亮替文用紙 (規則2.6)

【 29 - 9 】

747 C4	EDE2 80	EVQLVDSGKLVQPGGSLRLSASGDFSRHWHVRRQ APGKGLVWVSRINLSDGSSFTYADSVKGRFTISRDNAKRT LSLEGLNSLRREEDTAVYICARDGVRFYIDSTGTPDPIYFQ YGLDWMVGGQTVTVSS	126	QSAITQPASVSGISGQSI TISYTCFALDVGSYMLVVS WYQQKPKGKPKFMILTEGSS KRPSGYSNRFECGSKSGNT ASITISGLASRDEAEYIC CSYGGSRLLLFGGTKLTL VL
747 C7	EDE2 81	EVQLVDSGKLVQPGGSLRLSASGDFSRHWHVRRQ APGKGLVWVSRINLSDGSSFTYADSVKGRFTISRDNAKRT LSLEGLNSLRREEDTAVYICARDGVRFYIDSTGTPDPIYFQ YGLDWMVGGQTVTVSS	127	DIWMTQSPFSLPLPTLGER ASISCSRSSKSLHSNGYN YLDWYLRKPKFQSPQLLY LGSNRASGVPRDFESGSGS GTFDFLTKLSRVEAEIVGL YYCQDARQTPVTFEGGSK VEIK
747 D5	EDE2 82	EVQLVDSGKLVQPGGSLRLSASGDFSRHWHVRRQ APGKGLVWVSRINLSDGSSFTYADSVKGRFTISRDNAKRT LSLEGLNSLRREEDTAVYICARDGVRFYIDSTGTPDPIYFQ YGLDWMVGGQTVTVSS	128	GFFTLSRISVGRVTFICR ASRSINIFLWYQQKRTYS AFKLLLYKASLTQASVYS RFSGSGTDFALITISL QPDDFRAYVCOQSPTPL TFGGTRVEIK

差替え用紙 (規則2.6)

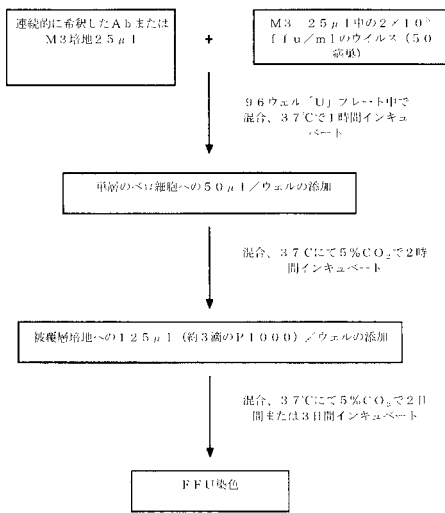
【 29 - 10 】

747 D11	EDE2 83	EVQLVDSGKLVQPGGSLRLSASGDFSRHWHVRRQ APGKGLVWVSRINLSDGSSFTYADSVKGRFTISRDNAKRT LSLEGLNSLRREEDTAVYICARDGVRFYIDSTGTPDPIYFQ YGLDWMVGGQTVTVSS	129	SYELTQPSVSWAQRKTA TITCGDNGIKSTVHWYQ QKCPQAPLIVYINGDRP PGIPEFSGNSGNATL TITVEAGDEADYCCQLW DSRSHPVFGGTRIVL
752 B6	EDE2 84	EVQLVDSGKLVQPGGSLRLSASGDFSRHWHVRRQ APGKGLVWVSRINLSDGSSFTYADSVKGRFTISRDNAKRT LSLEGLNSLRREEDTAVYICARDGVRFYIDSTGTPDPIYFQ YGLDWMVGGQTVTVSS	130	DIWMTQSPFSLPLPTLGER ASISCSRSSKSLHSNGYN YLDWYLRKPKFQSPQLLY LGSNRASGVPRDFESGSGS GTFDFLTKLSRVEAEIVGL YYCQDARQTPVTFEGGSK VEIK
752 D2	EDE2 85	EVQLVDSGKLVQPGGSLRLSASGDFSRHWHVRRQ APGKGLVWVSRINLSDGSSFTYADSVKGRFTISRDNAKRT LSLEGLNSLRREEDTAVYICARDGVRFYIDSTGTPDPIYFQ YGLDWMVGGQTVTVSS	131	DIWMTQSPFSLPLPTLGER ASISCSRSSKSLHSNGYN YLDWYLRKPKFQSPQLLY LGSNRASGVPRDFESGSGS GTFDFLTKLSRVEAEIVGL YYCQDARQTPVTFEGGSK VEIK

差替え用紙 (規則2.6)

【 30 A 】

フォーカス低減中和試験 (FRNT)

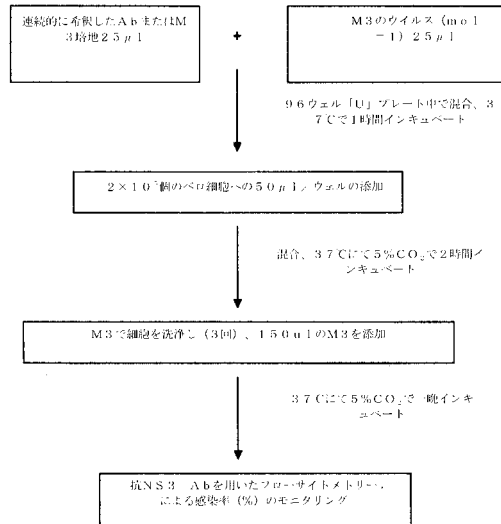


試薬：
 ・M3：3% FCS + L-グルタミン及びペニシリン/ストレプトマイシンを含有するMEM
 ・接種培地：等容積で3% CMC及び完全2倍MEM培地の混合。

差替え用紙 (規則2.6)

【 30 B 】

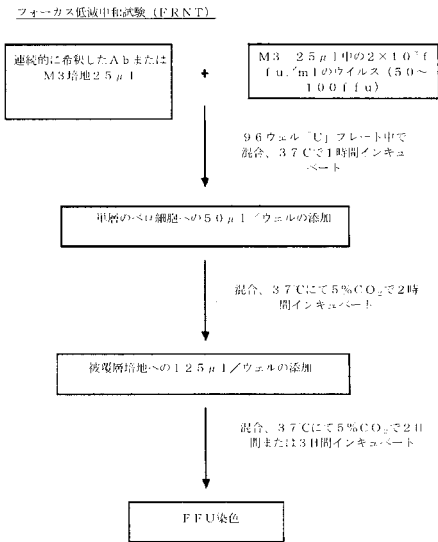
中和アッセイ (FACS)



試薬：
 ・M3：3% FCS + L-グルタミン及びペニシリン/ストレプトマイシンを含有するMEM

差替え用紙 (規則2.6)

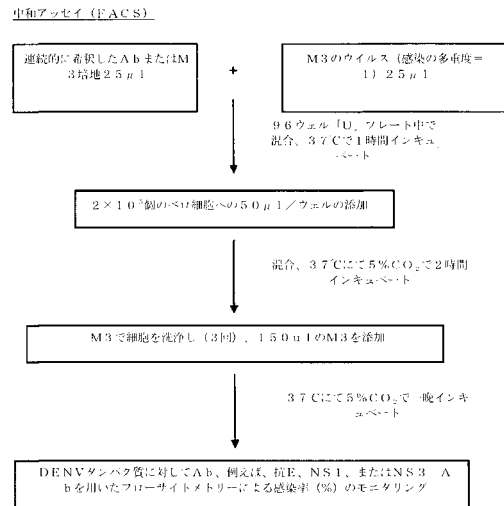
【図30C】



試薬:
 ・M3: 3% FCS + L-グルタミン及びペニシリン/ストレプトマイシンを含有するMEM
 ・被覆培地: 等容積で3% CMC及び完全2倍MEM培地の混合。

差替え用紙 (規則 2.6)

【図30D】



試薬:
 ・M3: 3% FCS + L-グルタミン及びペニシリン/ストレプトマイシンを含有するMEM

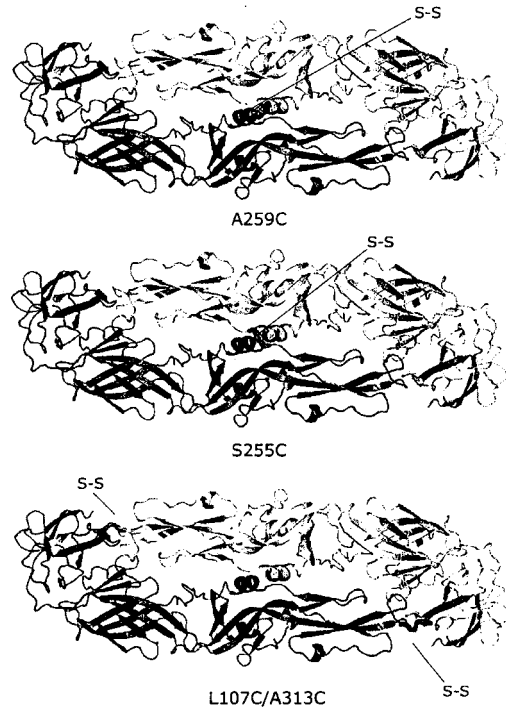
差替え用紙 (規則 2.6)

【図31】

B7_EDE2 (DENV2)	A11_EDE2 (DENV2)	C10_EDE1 (DENV2)	C10_EDE1 (DENV4)	C8_EDE1 (DENV2)
N67	N67	R2	R2	N67
T68	T68	H27	H27	T68
T69	T69	G28	G28	T69
T70	T70	E44	E44	T70
E71	E71	L45	E44	E71
S72	S72	L46	L45	S72
R73	R73	K47	T46	R73
L82	C74	N67	N67	C74
V97	E84	T68	T69	Q77
D98	V97	T69	T70	N83
R99	D98	T70	A71	E84
W101	R99	E71	T72	V97
G102	G102	S72	R73	D98
N103	N103	R73	C74	R99
G104	G104	C74	Q77	W101
I113	C105	Q77	V97	G102
G152	V114	S81	R99	N103
N153	N153	L82	W101	G104
D154	D154	N83	G102	C105
T155	T155	E84	N103	G106
G156	G156	V87	G104	L113
K246	H158	R99	C105	E148
K247	K246	W101	G106	H158
Q248	K247	G102	V113	K246
D249	Q248	N103	R247	K247
	D249	G104	Q248	Q248
	V250	C105	D249	D249
		G106	D271	I308
		L113	M278	K310
		T115	D309	E311
		K246	K310	R323
		K247	V324	D362
		Q248	K323	G374
		Q271	K325	
		V309	T381	
		K310	N362	
		R323		
		Q325		
		D362		

差替え用紙 (規則 2.6)

【図32】



差替え用紙 (規則 2.6)

【 37 】

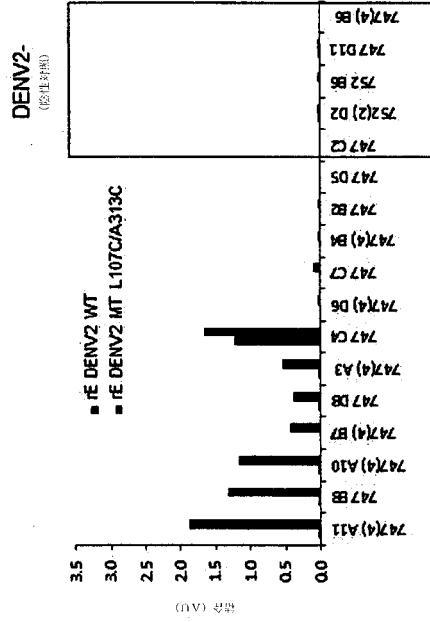
r E DENV2 WT/MT L107C/A313C->FEDELの場合



登録文用紙 (規則2.6)

【 38 】

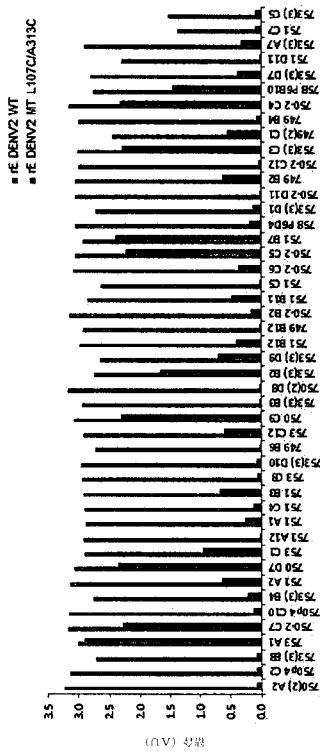
r E DENV2 WT/MT L107C/A313C->ZEDE2の場合



登録文用紙 (規則2.6)

【 39 】

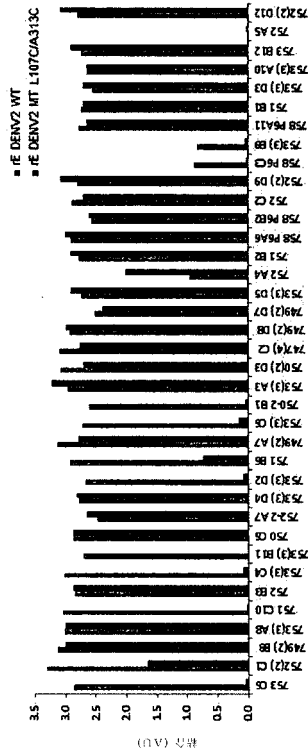
r E DENV2 WT/MT L107C/A313C->FFLEの場合



登録文用紙 (規則2.6)

【 40 】

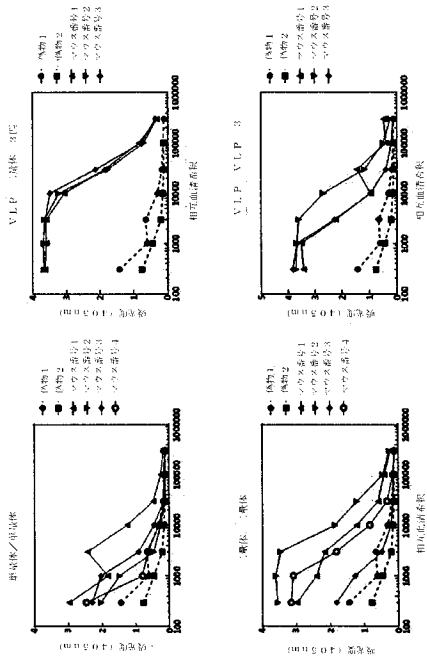
r E DENV2 WT/MT L107C/A313C->FFLEの場合



登録文用紙 (規則2.6)

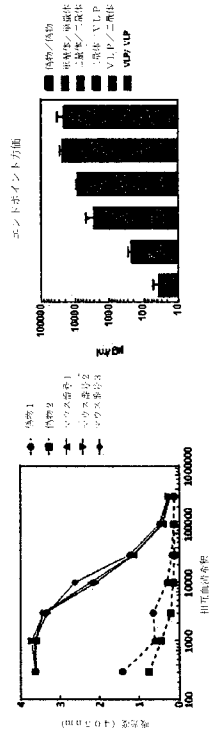
【 図 4 1 - 1 】

C 6 / 3 6 DENV2 における阻害方略



発熱文用紙 (規則 2.6)

【 図 4 1 - 2 】

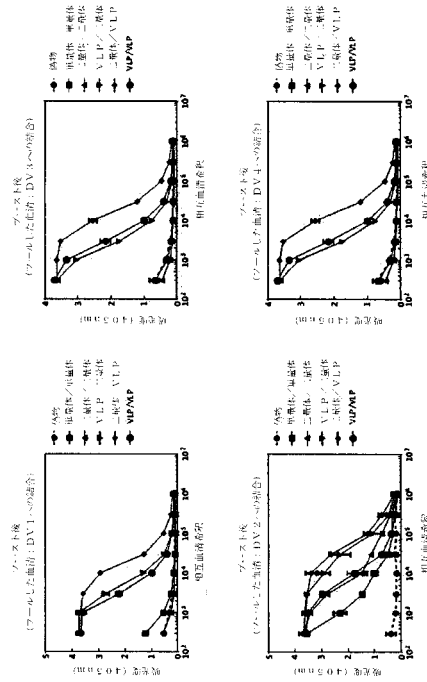


群 1 阻害剤/単量体
 群 2 E-WTを用いたプライム及びブースト E-WT
 群 3 E-A259C 突然変異体を用いたプライム及びブースト
 群 4 VLP/VLP/VLP 突然変異体を用いたプライム及びブースト
 群 5 VLP/VLP/VLP 突然変異体を用いたプライム及びブースト
 群 6 VLP/VLP/VLP 突然変異体を用いたプライム、続いて、VLPを用いたブースト
 群 7 VLP/VLP/VLP 突然変異体を用いたプライム、続いて、E-A259C 突然変異体を用いたブースト
 群 8 偽物
 群 9 非干渉剤

発熱文用紙 (規則 2.6)

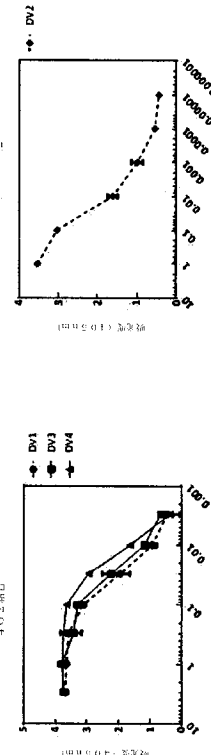
【 図 4 2 - 1 】

交差反応性：生ウイルス (フェールした血清) への紹介



発熱文用紙 (規則 2.6)

【 図 4 2 - 2 】

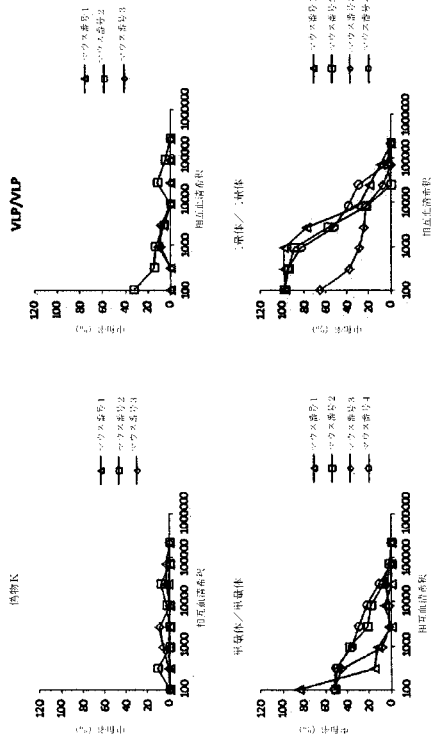


群 1 阻害剤/単量体
 群 2 E-WTを用いたプライム及びブースト E-WT
 群 3 E-A259C 突然変異体を用いたプライム及びブースト
 群 4 VLP/VLP/VLP 突然変異体を用いたプライム及びブースト
 群 5 VLP/VLP/VLP 突然変異体を用いたプライム及びブースト
 群 6 VLP/VLP/VLP 突然変異体を用いたプライム、続いて、VLPを用いたブースト
 群 7 VLP/VLP/VLP 突然変異体を用いたプライム、続いて、E-A259C 突然変異体を用いたブースト
 群 8 偽物
 群 9 非干渉剤

発熱文用紙 (規則 2.6)

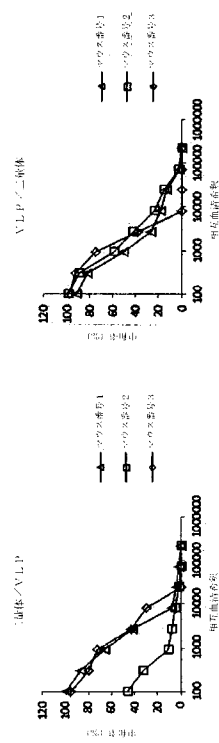
ワクス血清：C/6746 DENV2の中和

【図43-1】



抗原を用紙（図則2.6）

【図43-2】

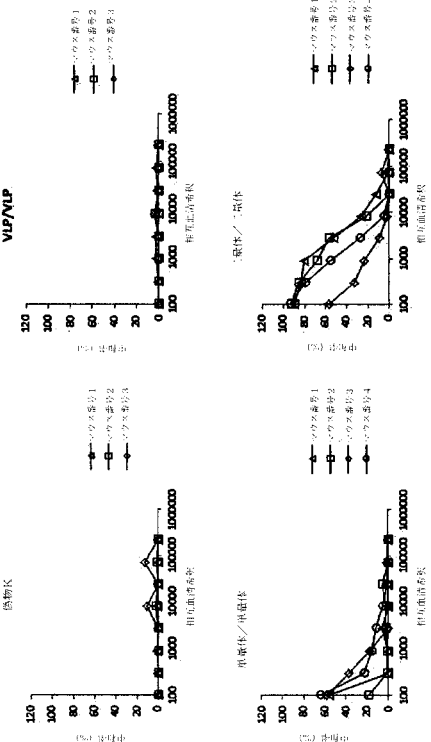


群1 単抗体/二抗体
 E: WTを用いたフライム及びブースト
 群2 二抗体/二抗体
 E: A2.5.9C 突然変異体を用いたフライム及びブースト
 群3 VLP/VLP
 PFM/Eウイルス様粒子 (VLP) を用いたフライム及びブースト
 群4 二抗体/VLP
 E: A2.5.9C 突然変異体を用いたフライム、続いて、VLPを用いたブースト
 群5 VLP/二抗体
 VLPを用いたフライム、続いて、E: A2.5.9C 突然変異体を用いたブースト
 群6 偽物
 非中和接種

抗原を用紙（図則2.6）

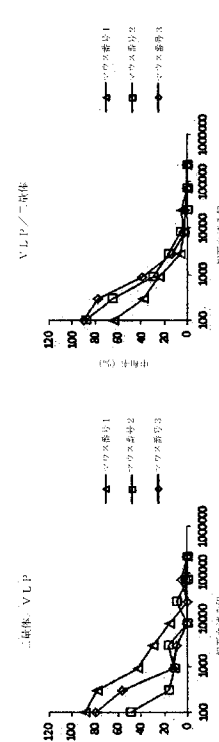
ワクス血清：DC DENV2の中和

【図44-1】



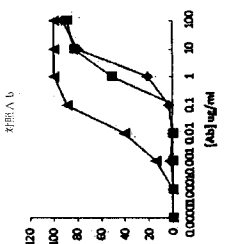
抗原を用紙（図則2.6）

【図44-2】



群1 単抗体/偽抗体
 E: WTを用いたフライム及びブースト
 群2 二抗体/二抗体
 E: A2.5.9C 突然変異体を用いたフライム及びブースト
 群3 VLP/VLP
 PFM/Eウイルス様粒子 (VLP) を用いたフライム及びブースト
 群4 二抗体/VLP
 E: A2.5.9C 突然変異体を用いたフライム、続いて、VLPを用いたブースト
 群5 VLP/二抗体
 VLPを用いたフライム、続いて、E: A2.5.9C 突然変異体を用いたブースト
 群6 偽物
 非中和接種

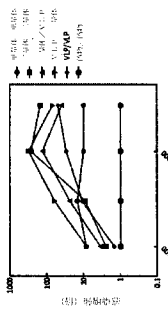
抗原を用紙（図則2.6）



【 図 4 5 】

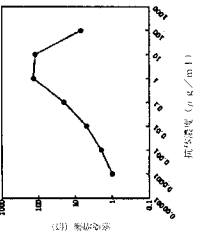
ADE: プールしたマウス血清-U937

ADEアッセイ (U937: プールしたマウス血清 = 4:1)



- 群1 単量体/単量体
- 群2 E-WTを用いたフライム及びブースト
- 群3 E-A259Cを用いたフライム及びブースト
- 群4 E-VLP/VLP
- 群5 E-VLM/E/ウイルス様粒子 (VLP) を用いたフライム及びブースト
- 群6 E-A259Cを用いたフライム、続いて、VLPを用いたブースト
- 群7 E-VLP/単量体
- 群8 VLPを用いたフライム、続いて、E-A259C突然変異体を用いたブースト
- 群9 偽物
- 群10 非付着細胞

ADEアッセイ (U937: 4:1)



光陰反用紙 (組026)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2015/052139

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/10 A61K39/12 A61P31/14 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/06068 A2 (HAWAII BIOTECH GROUP [US]) 11 February 1999 (1999-02-11) page 9, line 14 - line 15 -----	1-59
X	US 2003/175304 A1 (PETERS IAIN D [US] ET AL) 18 September 2003 (2003-09-18) paragraph [0056] -----	1-59
X	WO 2012/154202 A1 (MERCK SHARP & DOHME [US]; COLLIER BETH-ANN GRISWOLD [US]; PAI VIDYA B []) 15 November 2012 (2012-11-15) page 17 -----	1-59
X	WO 2005/056600 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; LAI CHING-JUH [US]; PURCELL ROBERT H) 23 June 2005 (2005-06-23) page 78; table 5 -----	77
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 December 2015		Date of mailing of the international search report 18/12/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wagner, René

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2015/052139

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/052139

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SASAKI TADAHIRO ET AL: "Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 98, no. 3, 29 March 2013 (2013-03-29), pages 423-431, XP028546469, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2013.03.018 page 425	60-66, 68-155
A	----- HONG-EN LIN ET AL: "Analysis of Epitopes on Dengue Virus Envelope Protein Recognized by Monoclonal Antibodies and Polyclonal Human Sera by a High Throughput Assay", PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES, vol. 6, no. 1, 3 January 2012 (2012-01-03), page e1447, XP55171297, DOI: 10.1371/journal.pntd.0001447 the whole document	1-155
A	----- TEOH EE PING ET AL: "The Structural Basis for Serotype-Specific Neutralization of Dengue Virus by a Human Antibody", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, vol. 4, no. 139, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 189-197, XP009177435, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3003888 the whole document	1-155
X,P	----- ALEXANDER ROUVINSKI ET AL: "Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses", NATURE, vol. 520, no. 7545, 12 January 2015 (2015-01-12), pages 109-113, XP055233720, United Kingdom ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature14130 the whole document ----- -/--	1-155

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/052139

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>WANWISA DEJNIRATTISAI ET AL: "A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus", NATURE IMMUNOLOGY, vol. 16, no. 2, 15 December 2014 (2014-12-15), pages 170-177, XP055230957, GB ISSN: 1529-2908, DOI: 10.1038/ni.3058 the whole document -----</p>	1-155

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/052139

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9906068	A2	11-02-1999	AT 321567 T 15-04-2006
			AU 752191 B2 12-09-2002
			AU 8590598 A 22-02-1999
			BR 9815551 A 31-10-2000
			CA 2298538 A1 11-02-1999
			DE 69834041 T2 14-12-2006
			EP 1005363 A2 07-06-2000
			JP 2001511459 A 14-08-2001
			US 6749857 B1 15-06-2004
			US 2003175304 A1 18-09-2003
			WO 9906068 A2 11-02-1999

US 2003175304	A1	18-09-2003	AT 321567 T 15-04-2006
			AU 752191 B2 12-09-2002
			AU 8590598 A 22-02-1999
			BR 9815551 A 31-10-2000
			CA 2298538 A1 11-02-1999
			DE 69834041 T2 14-12-2006
			EP 1005363 A2 07-06-2000
			JP 2001511459 A 14-08-2001
			US 6749857 B1 15-06-2004
			US 2003175304 A1 18-09-2003
			WO 9906068 A2 11-02-1999

WO 2012154202	A1	15-11-2012	AU 2011367817 A1 18-04-2013
			CN 103179983 A 26-06-2013
			EP 2632485 A1 04-09-2013
			JP 2013542224 A 21-11-2013
			KR 20130138789 A 19-12-2013
			SG 189048 A1 31-05-2013
			US 2013216575 A1 22-08-2013
			WO 2012154202 A1 15-11-2012

WO 2005056600	A2	23-06-2005	CA 2548808 A1 23-06-2005
			CA 2894300 A1 23-06-2005
			US 2007134256 A1 14-06-2007
			US 2011008256 A1 13-01-2011
			US 2013089543 A1 11-04-2013
			WO 2005056600 A2 23-06-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K	1/10 (2006.01)	C 0 7 K	1/10	4 C 0 8 7
C 1 2 N	7/04 (2006.01)	C 1 2 N	7/04	4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/12 (2006.01)	C 1 2 N	5/12	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	14/18 (2006.01)	C 0 7 K	14/18	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	47/50 (2017.01)	A 6 1 K	39/395	S
A 6 1 K	47/55 (2017.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/50	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	47/55	
G 0 1 N	33/569 (2006.01)	A 6 1 K	47/60	
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/53	N
		G 0 1 N	33/569	L
		G 0 1 N	33/15	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100090033

弁理士 荒船 博司

(74)代理人 100093045

弁理士 荒船 良男

(72)発明者 スクリートン, ギャビン

イギリス, デュ ケーン ロード ロンドン ダブリュー 1 2 オーエヌエヌ, ハマースミス
キャンパス, コモンウェルス ビルディング, ファカルティ オブ メディシン センタ
ー, ファカルティ オブ メディシン

(72)発明者 モンコンサパヤ, ジュタティップ

イギリス, デュ ケーン ロード ロンドン ダブリュー 1 2 オーエヌエヌ, ハマースミス
キャンパス, コモンウェルス ビルディング, ファカルティ オブ メディシン センタ
ー, ファカルティ オブ メディシン

(72)発明者 ルピンスキー, アレクサンダー

フランス, エフ 7 5 0 1 5 パリ, 2 8 リュー ド ドクトル ルー, アンスティテュ
パストゥール

(72)発明者 グアルダード カルボ, パプロ

フランス, エフ 7 5 0 1 5 パリ, 2 8 リュー ド ドクトル ルー, アンスティテュ
パストゥール

- (72)発明者 バルバ スペース, ジョヴァンナ
フランス, エフ 7 5 0 1 5 パリ, 2 8 リュー ド ドクトル ルー, アンスティテュ
パストゥール
- (72)発明者 ダッケロイ, ステファン
フランス, エフ 7 5 0 1 5 パリ, 2 8 リュー ド ドクトル ルー, アンスティテュ
パストゥール
- (72)発明者 ヴァニー, マリー クリスティーヌ
フランス, エフ 7 5 0 1 5 パリ, 2 8 リュー ド ドクトル ルー, アンスティテュ
パストゥール
- (72)発明者 レイ, フェリックス アウグスト
フランス, エフ 7 5 0 1 5 パリ, 2 8 リュー ド ドクトル ルー, アンスティテュ
パストゥール

F ターム(参考) 4B064 AG27 AG32 CA10 CA19 CC15 CC24 CE11 DA01 DA13
4B065 AA93X AA95Y AB01 AB04 AC14 BA02 CA24 CA25 CA45 CA46
4C076 CC06 CC35 EE23 EE59 FF63
4C084 AA01 AA02 AA19 MA02 NA05 ZB092 ZB331 ZB332
4C085 AA03 AA13 AA14 AA21 AA25 BA51 BB41 CC02 CC03 CC05
CC08 DD62 EE01 EE03 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 NA14 ZB33
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 CA01 DA76 DA86 EA29 EA50
FA74 GA23

【要約の続き】

グリシンセリンリッチなリンカー領域が s E 配列を分離しながら、単一ポリペプチド鎖として形成されることによって、共有結合的に安定化される、かつ/または二量体界面でまたは各単量体のドメイン 1 (D 1) /ドメイン 3 (D 3) リンカーにおいて、少なくとも 1 つの s E 単量体のアミノ酸配列中の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を、少なくとも 1 つのかさ高い側鎖アミノ酸と置換することによって、非共有結合的に安定化される。化合物、例えば、1 種を超える Dengue 熱ウイルス血清型を中和することができる抗体または抗体断片、例えば、本発明の E D E に結合することができる抗体。

【選択図】図 3 2

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017529096A5	公开(公告)日	2018-09-06
申请号	JP2017524124	申请日	2015-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	帝国改革有限公司 巴斯德研究所 单威赛引用巴黎第十一		
申请(专利权)人(译)	帝国创新有限公司 法国巴斯德研究所		
[标]发明人	スクリートンギャビン モンコンサパヤジュタティップ ルビンスキーアレクサンダー グアルダードカルボパブロ バルバスペースジョヴァンナ ダッケロイステファン ヴァニーマリークリスティーヌ レイフェリックスアウグスト		
发明人	スクリートン, ギャビン モンコンサパヤ, ジュタティップ ルビンスキー, アレクサンダー グアルダード-カルボ, パブロ バルバ-スペース, ジョヴァンナ ダッケロイ, ステファン ヴァニー, マリー-クリスティーヌ レイ, フェリックス アウグスト		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/10 A01K67/027 C12N1/19 C12N5/10 C07K1/10 C12N7/04 C12N5/12 C12P21/08 C07K14/18 A61P31/14 A61K39/12 A61K35/76 A61K35/12 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/50 A61K47/ 55 A61K47/60 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/15		
CPC分类号	A61K39/12 A61K2039/5258 A61K2039/545 A61P31/14 C07K14/1825 C07K16/1081 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/34 C12N2770/24122 C12N2770/24134 Y02A50/386 A61K47/6841 C07K14/ 005 C07K2317/56 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/10 A01K67/027 C12N1/19 C12N5/10 C07K1/10 C12N7/04 C12N5/12 C12P21/08 C07K14/18 A61P31/14 A61K39/12 A61K35/76 A61K35/12 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.S A61K45/00 A61K47/50 A61K47/55 A61K47/60 G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/ 569.L G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/AG32 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE11 4B064/ DA01 4B064/DA13 4B065/AA93X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C076/CC06 4C076/CC35 4C076/EE23 4C076/ EE59 4C076/FF63 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/ZB092 4C084/ZB331 4C084/ZB332 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA25 4C085/ BA51 4C085/BB41 4C085/CC02 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C087/ AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZB33 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA01 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/ EA50 4H045/FA74 4H045/GA23		
优先权	2014013086 2014-07-23 GB		

摘要(译)

登革热病毒包膜二聚体表位 (EDE) , 该EDE跨越登革热病毒包膜多肽二聚体的多肽和/或存在于包膜蛋白的二聚体上 和/或c) 由包膜多肽二聚体的连续或非连续残基形成, 该二聚体是DENV-1, DENV-2, DENV-3和DENV-4之一。是来自以下任何一项或两项的天然和/或突变包膜多肽的同源二聚体或异源二聚体 EDE可以是稳定的重组登革热病毒包膜糖蛋白E胞外域 (sE) 二聚体, 其由两个sE单体之间的至少一个二硫键间键共享。通过两个sE单体和/或两个sE单体之间的至少一个巯基反应性交联剂, 通过修饰的糖使结合稳定和/或共价稳定。通过结合单体和/或任选的接头区域, 任选地富含甘氨酸丝氨酸的接头区域而共价稳定, 形成分离sE序列的单个多肽链 通过和/或在每个单体的二聚体界面或结构域1 (D1) /结构域3 (D3) 接头中共价稳定至少一个sE单体氨基酸序列。至少一个氨基酸的残基, 通过至少更换Tsunokasa高支链氨基酸是非共价稳定。化合物, 例如能够中和一种以上登革热病毒血清型的抗体或抗体片段, 例如能够结合本发明的EDE的抗体。 [选择图]图32