

(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2018-500878  
(P2018-500878A)

(43) 公表日 平成30年1月18日(2018.1.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/295 (2006.01)	A 6 1 K 39/295	4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-523804 (P2017-523804)  
 (86) (22) 出願日 平成27年11月2日 (2015.11.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年7月3日 (2017.7.3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/058610  
 (87) 国際公開番号 W02016/070178  
 (87) 国際公開日 平成28年5月6日 (2016.5.6)  
 (31) 優先権主張番号 62/074,053  
 (32) 優先日 平成26年11月2日 (2014.11.2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500093834  
 ザ・ユニヴァーシティ・オブ・ノース・キ  
 ャロライナ・アト・チャペル・ヒル  
 アメリカ合衆国ノースカロライナ州275  
 16, チャペル・ヒル, チャーチ・ストリ  
 ート 109  
 (74) 代理人 100099623  
 弁理士 奥山 尚一  
 (74) 代理人 100096769  
 弁理士 有原 幸一  
 (74) 代理人 100107319  
 弁理士 松島 鉄男  
 (74) 代理人 100125380  
 弁理士 中村 綾子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチンおよび診断開発のための組換えデングウイルスについての方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、デングウイルスE糖タンパク質主鎖のデングウイルス血清型とは異なるデングウイルス血清型由来の、抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含むデングウイルスE糖タンパク質主鎖を含むキメラデングウイルスE糖タンパク質を含む組成物および使用方法を提供する。

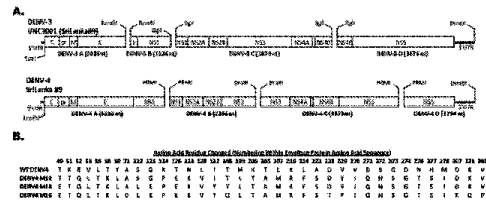


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

デングウイルス E 糖タンパク質主鎖のデングウイルス血清型とは異なるデングウイルス血清型と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含むデングウイルス E 糖タンパク質主鎖を含むキメラデングウイルス E 糖タンパク質であって、前記デングウイルス E 糖タンパク質主鎖がデングウイルス血清型 4 由来であり、前記抗体がデングウイルス血清型 3 と反応性である、キメラデングウイルス E 糖タンパク質。

## 【請求項 2】

前記抗体がモノクローナル抗体 5 J 7 である、請求項 1 に記載のキメラデングウイルス E 糖タンパク質。

10

## 【請求項 3】

アミノ酸配列：

## 【化 1】

```
MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLRT
YCIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKF
SCSGKITGNLVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDTSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGE
LTLDCPRSGIDFNEMILMKMKKKTWLVHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNKYKERMVT
FKVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDSGDGNHMFAGHLKCKVRMEKLRKGM
SYTMCSGKFSIDKEMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLA
ENTNSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNSALTLHWFRKGSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAW
DFGSVGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIA
VGGITLFLGFTVQA (WT_DENV4、配列番号1)
```

20

を含み、前記アミノ酸配列が以下のアミノ酸置換：

T 4 9 E、K 5 1 T、E 5 2 Q、V 5 3 L、L 5 5 T、T 5 8 K、Y 5 9 L、S 1 2 2 L、G 1 2 3 E、K 1 2 4 P、T 1 2 6 E、N 1 2 8 K、L 1 2 9 V、I 1 3 2 Y、M 1 9 9 L、K 2 0 0 T、T 2 0 5 A、L 2 0 7 M、K 2 1 0 R、L 2 1 4 F、A 2 2 2 S、V 2 7 0 I、D 2 7 1 Q、S 2 7 2 N、G 2 7 3 S、D 2 7 4 G、N 2 7 6 T、H 2 7 7 S、および M 2 7 8 I

30

を含み、前記アミノ酸配列が以下のアミノ酸置換：A 7 1 D、T 1 4 8 Q、D 2 2 5 T、V 2 2 9 P、D 3 0 7 K、K 3 2 1 Q、および V 3 6 2 P のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 1 に記載のキメラデングウイルス E 糖タンパク質。

## 【請求項 4】

アミノ酸配列：

## 【化 2】

```
MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTEATQLATLRKL
CIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS
CLEPIEGKVQYENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDTSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGEL
TLDCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGADTSEVHWNKYKERMVTF
KVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRKGMSTY
MCSGKFSIDKEMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLAENT
NSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNSALTLHWFRKGSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG
SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG
ITLFLGFTVQA (DENV_M14、配列番号3)
```

40

を含む、請求項 1 に記載のキメラデングウイルス E 糖タンパク質。

## 【請求項 5】

アミノ酸配列：

50

## 【化 3】

MRCVGVGNRDFVEGVSSGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTEATQLATLRKL  
 CIEASISNITTDTRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CLEPIEGKVQYENLEYTVVVTVHNGDQHAVGNDTSHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGEL  
 TLDCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTSEPHWNYKERMVTF  
 KVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRKIGMSYT  
 MCSGKFSIKKEMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLAENT  
 NSPTNIELEPPFGDSYIVIGVGNSALTLHWFRKGGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
 SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
 ITLFLGFTVQA (DENV4\_M16、配列番号4)

10

を含む、請求項 1 に記載のキメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質。

## 【請求項 6】

Dengue ウイルス E 糖タンパク質主鎖の Dengue ウイルス血清型とは異なる Dengue ウイルス血清型由来のタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む Dengue ウイルス E 糖タンパク質主鎖を含むキメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質であって、前記 Dengue ウイルス E 糖タンパク質主鎖が Dengue ウイルス血清型 4 由来であり、前記タンパク質ドメインが Dengue ウイルス血清型 2 由来である、キメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質。

## 【請求項 7】

前記タンパク質ドメインが E 糖タンパク質ドメイン III である、請求項 6 に記載のキメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質。

20

## 【請求項 8】

アミノ酸配列：

## 【化 4】

MRCVGVGNRDFVEGVSSGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLRT  
 YCIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKF  
 SCSGKITGNLVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDTSHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGE  
 LTLDCEPRSGIDFNEMILMKMKKKTWL VHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNKERMVTF  
 FKVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDSGDGNHMFAGHLKCKVRMEKLRKIGM  
 SYTMCSGKFSIDKEMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLA  
 ENTNSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNSALTLHWFRKGGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAW  
 DFGSVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIA  
 VGGITLFLGFTVQA (WT\_DENV4、配列番号1)

30

を含み、前記アミノ酸配列が、以下のアミノ酸置換：

T 3 0 0 S、S 3 0 3 T、S 3 0 7 K、D 3 0 9 V、M 3 1 2 I、T 3 2 0 I、V 3 2 2  
 I、K 3 2 3 R、K 3 2 5 Q、A 3 2 9 D、A 3 3 1 S、V 3 3 5 I、I 3 3 7 F、R 3  
 4 0 T、V 3 4 2 L、N 3 4 3 E、E 3 4 5 R、K 3 4 6 H、V 3 4 8 L、V 3 5 1 L、  
 S 3 5 3 T、S 3 5 4 V、T 3 5 5 N、L 3 5 7 I、A 3 5 8 V、E 3 5 9 T、N 3 6 0  
 E、T 3 6 1 K、N 3 6 2 D、V 3 6 4 P、T 3 6 5 V、L 3 6 9 A、V 3 7 9 I、G 3  
 8 3 E、N 3 8 4 P、S 3 8 5 G、A 3 8 6 Q、T 3 8 8 K、H 3 9 0 N、R 3 9 3 K

40

を含む、請求項 6 に記載のキメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質。

## 【請求項 9】

アミノ酸配列：

## 【化 5】

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLRT  
 YCIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKF  
 SCSGKITGNLVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGE  
 LTLDCEPSRGIDFNEMILMKMKKKTWLVHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNKERMVT  
 FKVPFAKQRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDSGDGNHMFAGHLKCKVRMEKLRKGM  
 SYSMCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEK  
 DSPVNIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
 SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
 ITLFLGFTVQA (DV4-EDIII-DV2、配列番号5)

10

を含む、請求項 6 に記載のキメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質。

## 【請求項 10】

Dengue ウイルス E 糖タンパク質主鎖の Dengue ウイルス血清型とは異なる Dengue ウイルス血清型と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む Dengue ウイルス E 糖タンパク質主鎖を含むキメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質であって、前記 Dengue ウイルス E 糖タンパク質主鎖が Dengue ウイルス血清型 2 由来であり、前記抗体が Dengue ウイルス血清型 1 と反応性である、キメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質。

20

## 【請求項 11】

前記抗体がモノクローナル抗体 1F4 である、請求項 10 に記載のキメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質。

## 【請求項 12】

アミノ酸配列：

## 【化 6】

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELFKTEVTNPAVLRKYCI  
 EAKLTNTTTSRCPTQGEPSLNEEQDKRFICKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTC  
 KKNMEGKVVQPENLKYSVIVTVHSGEEHAVGNDSNHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALT  
 LECSPTGLDFNEMVLLQMEDKAWLVHRQWFLDLPLPWLPGADTQESNWIQKETLVTFK  
 NPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTLFTGHLKCRRLRMDKLQLKGMSSYS  
 MCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDSP  
 VNIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIQMFETMRGAKRMAILGDTAWDFGSLG  
 GVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTSLSVSLVLVGVVVTLY  
 LGAVVQA (DENV2-1F4E、配列番号6)

30

を含む、請求項 10 に記載のキメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質。

## 【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子またはウイルス様粒子 (VLP)。

40

## 【請求項 14】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質をコードする単離された核酸分子。

## 【請求項 15】

請求項 13 に記載のフラビウイルス粒子または VLP をコードする単離された核酸分子。

## 【請求項 16】

請求項 13 に記載のフラビウイルス粒子を含むフラビウイルス粒子の集団。

## 【請求項 17】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を薬学的に許容される担体中に

50

含む組成物。

【請求項 18】

請求項 14 または 15 に記載の核酸分子を薬学的に許容される担体中に含む組成物。

【請求項 19】

請求項 16 に記載の集団を薬学的に許容される担体中に含む組成物。

【請求項 20】

請求項 13 に記載のフラビウイルス粒子および / または VLP を薬学的に許容される担体中に含む組成物。

【請求項 21】

対象において Dengue ウイルスに対する免疫応答を生じさせる方法であって、前記対象に、有効量の、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質、請求項 13 に記載のフラビウイルス粒子、請求項 13 に記載の VLP、請求項 14 ~ 15 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 16 に記載の集団、および / または請求項 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法。

10

【請求項 22】

対象において Dengue ウイルス感染を処置する方法であって、前記対象に、有効量の、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質、請求項 13 に記載のフラビウイルス粒子、請求項 13 に記載の VLP、請求項 14 ~ 15 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 16 に記載の集団、および / または請求項 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法。

20

【請求項 23】

対象において Dengue ウイルス感染に関連した障害を防止する方法であって、前記対象に、有効量の、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質、請求項 13 に記載のフラビウイルス粒子、請求項 13 に記載の VLP、請求項 14 ~ 15 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 16 に記載の集団、および / または請求項 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法。

【請求項 24】

Dengue ウイルス感染の影響から対象を保護する方法であって、前記対象に、有効量の、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質、請求項 13 に記載のフラビウイルス粒子、請求項 13 に記載の VLP、請求項 14 ~ 15 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 16 に記載の集団、および / または請求項 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法。

30

【請求項 25】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、

a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む組成物を、前記対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、

b) 前記対象由来の生物学的試料を、上記のステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、前記フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、および

c) ステップ (b) における中和を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定するステップ

40

を含む方法。

【請求項 26】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、

a) 請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む組成物を、前記対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、

b) 前記対象由来の生物学的試料を、上記のステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラ

50

ビウイルス粒子と、前記フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、および

c) ステップ (b) における中和を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定するステップ

を含む方法。

【請求項 27】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、

a) 請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む組成物を、前記対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、

b) 前記対象由来の生物学的試料を、上記のステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、前記フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、および

c) ステップ (b) における中和を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体の存在を同定する、ステップ

を含む方法。

【請求項 28】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、

a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、前記フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、および

b) ステップ (a) における中和を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定する、ステップ

を含む方法。

【請求項 29】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、

a) 請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、前記フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、および

b) ステップ (a) における中和を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定する、ステップ

を含む方法。

【請求項 30】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、

a) 請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、前記フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、および

b) ステップ (a) における中和を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体の存在を同定する、ステップ

を含む方法。

【請求項 31】

対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免

10

20

30

40

50

疫原性組成物を同定する方法であって、

- a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を、対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、
  - b) 前記対象由来の生物学的試料を、ステップ ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子と、前記フラビウウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、
  - c) 前記生物学的試料が、ステップ ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに
  - d) 前記生物学的試料が、( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、前記対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体を誘導するものとして前記免疫原性組成物を同定するステップ
- を含む方法。

10

【請求項 3 2】

対象において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

- a) 請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を、対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、
  - b) 前記対象由来の生物学的試料を、ステップ ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子と、前記フラビウウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、
  - c) 前記生物学的試料が、ステップ ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに
  - d) 前記生物学的試料が、( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、前記対象において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体を誘導するものとして前記免疫原性組成物を同定するステップ
- を含む方法。

20

【請求項 3 3】

対象において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

- a) 請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を、対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、
  - b) 前記対象由来の生物学的試料を、ステップ ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子と、前記フラビウウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、
  - c) 前記生物学的試料が、ステップ ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに
  - d) 前記生物学的試料が、( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、前記対象において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導するものとして前記免疫原性組成物を同定するステップ
- を含む方法。

30

40

【請求項 3 4】

対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

- a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子と、前記フラビウウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、
- b) 前記生物学的試料が、ステップ ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに
- c) 前記生物学的試料が、( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子を中和する

50

抗体を含む場合には、前記対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体を誘導するものとして前記免疫原性組成物を同定するステップを含む方法。

**【請求項 35】**

対象において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

a) 請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、前記フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、

b) 前記生物学的試料が、ステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに

c) 前記生物学的試料が、(a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、前記対象において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体を誘導するものとして前記免疫原性組成物を同定するステップを含む方法。

**【請求項 36】**

対象において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

a) 請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、前記フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、

b) 前記生物学的試料が、ステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに

c) 前記生物学的試料が、(a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、前記対象において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導するものとして前記免疫原性組成物を同定するステップを含む方法。

**【請求項 37】**

試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を検出する方法であって、

a) 前記試料を請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに

b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を検出するステップを含む方法。

**【請求項 38】**

試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を検出する方法であって、

a) 前記試料を請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに

b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を検出するステップを含む方法。

**【請求項 39】**

試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を検出する方法であって、

a) 前記試料を請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに

b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記試料において Dengue ウイルス血

10

20

30

40

50

清型 1 および / または 2 に対する抗体を検出するステップを含む方法。

【請求項 40】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を同定する方法であって、

- a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む組成物を、前記対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、
- b) 前記対象由来の生物学的試料を (a) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに
- c) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を同定するステップ

10

【請求項 41】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を同定する方法であって、

- a) 請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む組成物を、前記対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、
- b) 前記対象由来の生物学的試料を (a) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに
- c) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を同定するステップ

20

【請求項 42】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を同定する方法であって、

- a) 請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む組成物を、前記対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、
- b) 前記対象由来の生物学的試料を (a) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに
- c) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を同定するステップ

30

【請求項 43】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を同定する方法であって、

- a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに
- b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を同定するステップ

40

【請求項 44】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を同定する方法であって、

- a) 請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに
- b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を同定するステップ

50

**【請求項 4 5】**

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を同定する方法であって、

a) 請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに

b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を同定するステップを含む方法。

**【請求項 4 6】**

対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに

b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法。

**【請求項 4 7】**

対象において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

a) 請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに

b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法。

**【請求項 4 8】**

対象において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

a) 請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、前記 E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに

b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法。

**【請求項 4 9】**

対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を、対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、

b) 前記対象由来の生物学的試料を ( a ) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに

c) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法。

**【請求項 5 0】**

対象において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

a) 請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を、対象

10

20

30

40

50

に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、  
 b) 前記対象由来の生物学的試料を (a) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに  
 c) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法。

【請求項 51】

対象において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、

a) 請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を、対象に、前記 E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、

b) 前記対象由来の生物学的試料を (a) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに

c) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、前記対象において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の言明

この出願は、2014年11月2日に提出された米国仮出願第62/074,053号の35U.S.C. § 119(e)による恩典を主張し、その仮出願の全内容は引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【0002】

政府支援の言明

この発明は、National Institutes of Healthにより授与された認可番号 AI 057157、AI 097560、AI 107731、および AI 109761 による政府支援で行われた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

本発明は、単一の供給源由来の複数の Dengue ウイルス血清型に対する中和抗体を誘導する Dengue ウイルスワクチンを対象とする。

【背景技術】

【0004】

Dengue ウイルス (DENV) は、かつてないほどの速さで広がっている蚊媒介性フラビウイルスであり、50を超える国において、重大な健康および経済的負担に発展している。全ての4つの DENV 血清型から保護する現在の DENV ワクチンは、それぞれがその血清型に対する保護を与えることを意図された、4つのウイルスまたは4つの組換えタンパク質の「四価」製剤として送達されなければならない。バランスのとれた抗体応答を達成するための四価カクテルにおける血清型の正しい混合は知られておらず、最も進歩した四価の弱毒化キメラ生ウイルスが、タイにおいて大きな第2B相試験で臨床的に有意な保護を提供することに最近、失敗したことにより、浮き彫りにされた (S a b c h a r e o n e t a l . , 2012)。1つまたは複数のウイルス血清型がその他の血清型を打ち負かすというウイルス干渉が失敗に寄与すると考えられている。

【0005】

本発明は、単一の供給源由来の複数の Dengue ウイルス血清型に対する中和抗体を誘導するキメラ Dengue ウイルスを提供することにより、当技術分野における前の欠点を克服する。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

## 【0006】

一態様において、本発明は、 Dengueウイルス E糖タンパク質主鎖の Dengueウイルス血清型とは異なる Dengueウイルス血清型と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む Dengueウイルス E糖タンパク質主鎖を含むキメラ Dengueウイルス E糖タンパク質であって、 Dengueウイルス E糖タンパク質主鎖が Dengueウイルス血清型 4由来であり、抗体が Dengueウイルス血清型 3と反応性である、キメラ Dengueウイルス E糖タンパク質を提供する。

## 【0007】

さらなる態様において、本発明は、 Dengueウイルス E糖タンパク質主鎖の Dengueウイルス血清型とは異なる Dengueウイルス血清型由来のタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む Dengueウイルス E糖タンパク質主鎖を含むキメラ Dengueウイルス E糖タンパク質であって、 Dengueウイルス E糖タンパク質主鎖が Dengueウイルス血清型 4由来であり、タンパク質ドメインが Dengueウイルス血清型 2由来である、キメラ Dengueウイルス E糖タンパク質を提供する。

10

## 【0008】

別の態様において、本発明は、 Dengueウイルス E糖タンパク質主鎖の Dengueウイルス血清型とは異なる Dengueウイルス血清型と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む Dengueウイルス E糖タンパク質主鎖を含むキメラ Dengueウイルス E糖タンパク質であって、前記 Dengueウイルス E糖タンパク質主鎖が Dengueウイルス血清型 2由来であり、抗体が Dengueウイルス血清型 1と反応性である、キメラ Dengueウイルス E糖タンパク質を提供する。

20

## 【0009】

対象（例えば、それを必要としている対象）において Dengueウイルスに対する免疫応答を生じさせる方法であって、対象に、有効量の、この発明の E糖タンパク質、この発明のフラビウイルス粒子、この発明の VLP、この発明の核酸分子、この発明の集団、および/またはこの発明の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法もまたここに提供される。

## 【0010】

追加として、対象（例えば、それを必要としている対象）において Dengueウイルス感染を処置する方法であって、対象に、有効量の、この発明の E糖タンパク質、この発明のフラビウイルス粒子、この発明の VLP、この発明の核酸分子、この発明の集団、および/またはこの発明の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法がここに提供される。

30

## 【0011】

さらに、対象（例えば、それを必要としている対象）において Dengueウイルス感染に関連した障害を防止する方法であって、対象に、有効量の、この発明の E糖タンパク質、この発明のフラビウイルス粒子、この発明の VLP、この発明の核酸分子、この発明の集団、および/またはこの発明の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法がここに提供される。

40

## 【0012】

追加の態様として、本発明は、 Dengueウイルス感染の影響から対象を保護する方法であって、対象に、有効量の、この発明の E糖タンパク質、この発明のフラビウイルス粒子、この発明の VLP、この発明の核酸分子、この発明の集団、および/またはこの発明の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法を提供する。

## 【0013】

さらなる態様において、本発明は、対象由来の生物学的試料において特定の Dengueウイルス血清型またはその組み合わせ（例えば、4/3、4/2、2/1）に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、a) この発明の特定の E糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を、上記の特定の E糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子

50

と、フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、およびc)ステップ(b)における中和を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせに対する中和抗体の存在を同定するステップを含む方法を提供する。

【0014】

本発明は、追加として、対象由来の生物学的試料において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせ(例えば、4/3、4/2、2/1)に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、a)この発明の特定のE糖タンパク質を投与されている対象由来の生物学的試料を、E糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、およびb)ステップ(a)にお

10

【0015】

他の実施形態において、本発明は、対象において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせ(例えば、4/3、4/2、2/1)に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a)この発明の特定のE糖タンパク質を含む免疫原性組成物を、対象に、E糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b)対象由来の生物学的試料を、ステップ(a)のE糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させる

20

【0016】

対象において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせ(例えば、4/3、4/2、2/1)に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a)この発明の特定のE糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、E糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、フラビウイルス粒子の中和

30

【0017】

本発明はまた、試料において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせに対する抗体を検出する方法であって、a)試料をこの発明の特定のE糖タンパク質と、抗原/抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、およびb)抗原/抗体複合体の形成を検出し、それにより、試料において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせに対する抗体を検出するステップを含む方法を提供する。

40

【0018】

追加として、対象由来の生物学的試料において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせに対する抗体を同定する方法であって、a)この発明の特定のE糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b)対象由来の生物学的試料を(a)のE糖タンパク質と、抗原/抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、およびc)抗原/抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型3および/または4に対する抗体を同定するステップを含む方法がここに提供される。

50

## 【 0 0 1 9 】

本発明のさらなる態様は、対象由来の生物学的試料において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせに対する抗体を同定する方法であって、a) この発明の特定の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、および b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を同定するステップを含む方法を提供する。

## 【 0 0 2 0 】

本発明は、追加として、対象において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせに対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a) この発明の特定の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、および b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせに対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法を提供する。

10

## 【 0 0 2 1 】

本発明のさらなる実施形態は、対象において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせに対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a) 特定の E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を ( a ) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、および c) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象において特定の Dengue ウイルス血清型またはその組み合わせに対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法である。

20

## 【 0 0 2 2 】

この発明の E 糖タンパク質を含む Dengue ウイルス粒子、フラビウイルス粒子、および / または ウィルス様粒子 ( V L P ) が、追加としてここに提供される。

## 【 0 0 2 3 】

この発明の E 糖タンパク質をコードする単離された核酸分子、加えて、この発明の Dengue ウイルス粒子、フラビウイルス粒子、または V L P をコードする単離された核酸分子もまたここに提供される。

30

## 【 0 0 2 4 】

本発明はまた、この発明の E 糖タンパク質を薬学的に許容される担体中に含む組成物を提供し、この発明の核酸分子、この発明のベクター、この発明の粒子、および / またはこの発明の集団を薬学的に許容される担体中に含む組成物もまた提供する。

## 【 0 0 2 5 】

本発明はさらに、対象において Dengue ウイルスに対する免疫応答を生じさせるための薬物の製造における使用のための、Dengue ウイルス感染の処置を、それを必要としている対象において行うための、対象において Dengue ウイルス感染を防止するための、および / または Dengue ウイルス感染の影響から対象を保護するための、単独での、または任意の組み合わせでの、この発明の E 糖タンパク質、この発明の Dengue ウイルス粒子、この発明のフラビウイルス粒子、この発明の V L P、この発明の核酸分子、この発明のベクター、この発明の集団、および / またはこの発明の組成物を提供する。

40

## 【 0 0 2 6 】

対象において Dengue ウイルスに対する免疫応答を生じさせること、Dengue ウイルス感染の処置を、それを必要としている対象において行うこと、対象において Dengue ウイルス感染を防止すること、および / または Dengue ウイルス感染の影響から対象を保護することに用いるための、単独での、または任意の組み合わせでの、この発明の E 糖タンパク質、この発明の Dengue ウイルス粒子、この発明のフラビウイルス粒子、この発明の V L P、この

50

発明の核酸分子、この発明のベクター、この発明の集団、および/またはこの発明の組成物の使用もまたここに提供される。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】DENV3および4の感染性cDNAクローンの設計ならびに組換えDENV4/3ウイルスの作製を示す図である。(A)サブゲノム断片を作製するために用いられる制限エンドヌクレアーゼを含む、DENV3およびDENV4感染性クローン設計のゲノム概略図。サブゲノム断片のサイズは、細菌の不安定性および毒性を回避するために切断されるDENVゲノムにおける位置を示す。(B)DENV4 M12、M14、およびM16、それぞれを作製するためのDENV3配列の移植によりDENV4 Eタンパク質において変化したアミノ酸。アミノ酸番号は、DENV4のEタンパク質の開始地点からの残基を表す。DENV4 M12(C; 緑色残基)、DENV4 M14(D; 緑色+シアン色残基)、およびDENV4 M16(E; 緑色+シアン色+オレンジ色残基)へ転移されるAAが示されている、DENV3 Eタンパク質二量体のリボン構造。色は、(B)における強調されたAA残基に対応する。

10

【図2】哺乳類細胞におけるrDENV4/3の成長特性を示す図である。(A)DENV3、DENV4、DENV4 M12、DENV4 M14、およびDENV4 M16をC6/36細胞において、最大の細胞病理が観察されるまで(典型的には、接種から4日後)増殖させ、ベロ-81細胞における力価測定のために収集した。感染力価は、ffu/ml細胞培養上清として表されている。(B)ベロ-81細胞におけるWTウイルスおよびrDENVウイルスの感染巣サイズおよび形態。

20

【図3】節足動物細胞におけるrDENV4/3の成長特性を示す図である。(A)MOI=0.01でC6/36細胞において接種されたDENV3、DENV4、DENV4 M12、DENV4 M14、およびDENV4 M16の多段階成長曲線分析。細胞培養上清を、記載されているように、C6/36細胞において力価測定した。(B)C6/36細胞におけるWTおよびrDENVの感染巣サイズおよび形態。

【図4】rDENV4/3におけるhmAb 5J7の結合および中和を示す図である。(A)DENV3、DENV4、DENV4 M14、およびDENV4 M16におけるDENV3特異的hmAb 5J7についてのELISA OD値。5J7は、DENV4 M12と結合せず、WT DENV4と同一の曲線を示した(データ未呈示)。DENV3、DENV4、DENV4 M12、M14、およびM16についてのベロ-81(B)およびU937-DC-SIGN(C)における中和アッセイ。データは、ウイルス感染力の50%を中和するのに必要とされる $\mu\text{g/ml}$ として示されている。

30

【図5】ポリクローナルDENV3血清中和を示す図である。(A~D)一次DENV3感染から回復したヒトドナーから収集された血清を、ベロ-81細胞においてDENV3、DENV4、DENV4 M12、およびDENV4 M14に対してアッセイして、DENV3体液性免疫応答に対する感受性を評価した。(E~G)一次DENV3感染から回復したヒトドナーから収集された血清を、U937-DC-SIGN細胞においてDENV3、DENV4、DENV4 M14、およびDENV4 M16に対してアッセイして、DENV3体液性免疫応答に対する感受性を評価した。

40

【図6】ポリクローナルDENV4血清中和を示す図である。(A)一次DENV4感染から回復したヒトドナーから収集された血清を、ベロ-81細胞においてDENV3、DENV4、DENV4 M12、およびDENV4 M14に対してアッセイして、DENV4体液性免疫応答に対する感受性を評価した。(B~D)一次DENV4感染から回復したヒトドナーから収集された血清を、U937-DC-SIGN細胞においてDENV3、DENV4、DENV4 M14、およびDENV4 M16に対してアッセイして、DENV4体液性免疫応答に対する感受性を評価した。

【図7】ヘテロタイプ血清中和を示す図である。(A、B)一次DENV1感染から回復したヒトドナーから収集された血清を、ベロ-81細胞においてDENV1、DENV3、DENV4 M12、およびDENV4 M14に対してアッセイして、非特異的体液

50

性免疫応答に対する感受性を評価した。(C、D)一次DENV2感染から回復したヒトドナーから収集された血清を、ベロ-81細胞においてDENV2、DENV3、DENV4 M12、およびDENV4 M14に対してアッセイして、DENV4体液性免疫応答に対する感受性を評価した。

【図8】DENV1および2の感染性cDNAクローンの設計ならびに組換えDENV2/1ウイルスの作製を示す図である。(A)サブゲノム断片を作製するために用いられる制限エンドヌクレアーゼを含む、DENV1およびDENV2感染性クローン設計のゲノム概略図。サブゲノム断片のサイズは、細菌の不安定性および毒性を回避するために切断されたDENVゲノムにおける位置を示す。(B)DENV2-1F4Eを作製するためのDENV1配列の移植によりDENV2 Eタンパク質において変化したアミノ酸。アミノ酸番号は、DENV2のEタンパク質の開始地点からの残基を表す。(C)DENV2-1F4Eへ転移されるAAを有するDENV2 Eタンパク質二量体のリボン構造。

【図9】rDENV2/1の成長特性を示す図である。DENV1、DENV2、およびDENV2-1F4Eを、C6/36細胞上で、最大細胞病理が観察されるまで(典型的には、接種から4日後)増殖させ、ベロ-81細胞(A)またはC6/36細胞(B)における力価測定のために収集した。感染力価は、ffu/ml細胞培養上清として表されている。(C)C6/36細胞にMOI=0.01で接種されたDENV1、DENV2、およびDENV2-1F4Eの多段階成長曲線分析。細胞培養上清を、記載されているように、C6/36細胞において力価測定した。(D)C6/36細胞におけるWTウイルスおよびDENV2-1F4Eウイルスの感染巣サイズおよび形態。

【図10】rDENV2/1におけるhmAb 1F4の結合および中和を示す図である。(A)DENV1、DENV2、およびDENV2-1F4EにおけるDENV1特異的hmAb 1F4についてのELISA OD値。DENV1、DENV2、およびDENV2-1F4EについてのC6/36(B)およびU937-DC-SIGN(C)における中和アッセイ。データは、ウイルス感染力の50%を中和するのに必要とされる $\mu\text{g/ml}$ として表されている。

【図11】ポリクローナルDENV1およびDENV2血清中和を示す図である。(AおよびB)一次DENV1感染から回復したヒトドナーから収集された血清を、U937-DC-SIGN細胞においてDENV1、DENV2、およびDENV2-1F4Eに対してアッセイして、DENV1体液性免疫応答に対する感受性を評価した。(C~E)一次DENV2感染から回復したヒトドナーから収集された血清を、U937-DC-SIGN細胞においてDENV1、DENV2、およびDENV2-1F4Eに対してアッセイして、DENV2体液性免疫応答に対する感受性を評価した。

【図12】マウス生存を示す図である。C57BL/6背景におけるインターフェロン//欠損マウスに、 $3.3 \times 10^6$  ffu DENV1、DENV2、またはDENV2-1F4Eを腹腔内に接種した。マウスを、56日間、体重減少および臨床的病気についてモニターした。

【図13】DV4-EDIII-DV2ウイルスの設計および構築を示す図である。(A)DENV2およびDENV4の直鎖状エンベロプドメインIII(EDIII)配列(全E配列の残基296~395(合計99aa))のアミノ酸アラインメント。DENV2とDENV4の間で異なる残基は灰色で強調されている。DENV3由来のEDIIIを含有する組換えDENV4ウイルス、rDENV4/2は、DENV4由来の異なる残基を、明るい灰色で強調された、DENV2由来の残基と置き換えている。(B)DENV2 Eタンパク質二量体のカートン型(左)および空間充填型(右)結晶構造モデル。交換された残基は色づけされている。(C)DENVゲノムを操作するための逆遺伝学系、上=DENV2、下=DENV4。DENVゲノムは4つのプラスミドカセットへ分割され、そのプラスミドカセットは、個々に突然変異させ、合わせてライゲーションし、細胞へ電気穿孔して、組換えウイルスを生じることができる。DENV4-Aカセットは、エンベロプ遺伝子を含有し、EDIIIは灰色で強調されている。DENV4主鎖においてEDIII残基をDENV2由来のそれらで置き換えることにより、DV4-E

10

20

30

40

50

D I I I - D V 2 ウイルスが生じる。

【図 1 4】D E N V および D V 4 - E D I I I - D V 2 ビリオンは類似した成熟プロフェールを有することを示す図である。ウイルスを C 6 / 3 6 細胞において成長させ、培養上清を収集し、遠心分離していかなる細胞片も除去した。試料を、1 2 % S D S - P A G E ゲル上に流し、プロットを、抗 E 抗体 ( 4 G 2 ) および抗 P r M 抗体 ( 2 H 1 2 および 5 L 2 0 ) で探索した。D E N V 2 は実質的レベルの P r M が存在し、不完全なフェューリンプロセッシングまたは P r M 解離のいずれかを示している。P r M バンドは、D E N V 4 試料または D V 4 - E D I I I - D V 2 試料のいずれにおいても検出できない。

【図 1 5】D V 4 - E D I I I - D V 2 は親ウイルスと比較してペロ細胞において 2 1 0 g の成長減弱を生じることを示す図である。( A ) ペロ - 8 1 細胞を、M O I = 0 . 0 1 で感染させた。ウイルス上清を 2 4 時間ごとに収集し、その後、ペロ - 8 1 細胞において力価測定した。( B ) D E N V はペロ - 8 1 細胞において感染巣を形成する ( D E N V 2 、 D E N V 4 、 および D V 4 - E D I I I - D V 2 をそれぞれ、感染から 5 日後、4 日後、および 6 日後、固定した)。D V 4 - E D I I I - D V 2 病巣は、どちらの親ウイルスよりも小さい。

【図 1 6】D V 4 - E D I I I - D V 2 は C 6 / 3 6 細胞において成長減弱を生じないことを示す図である。( A ) C 6 / 3 6 細胞を、M O I = 0 . 0 1 で感染させた。ウイルス上清を 2 4 時間ごとに収集し、その後、C 6 / 3 6 細胞において力価測定した。( B ) D E N V は C 6 / 3 6 細胞において感染巣を形成する ( D E N V 2 、 D E N V 4 、 および D V 4 - E D I I I - D V 2 をそれぞれ、感染から 4 日後、3 日後、および 5 日後、固定した)。さらに何日間かの成長で、D V 4 - E D I I I - D V 2 病巣は親ウイルスに匹敵するサイズに達する。

【図 1 7】型特異的 D E N V 2 ヒト M A b による D V 4 - E D I I I - D V 2 の結合および中和の転移を示す図である。( A ) 四次エピトープと結合する強中和性 D V 2 M A b であるヒト M A b 2 D 2 2 の概要の表。( B ) 以前に作製された 2 D 2 2 エスケープ突然変異体は、E D I I I に位置する 1 つのエスケープ突然変異、R 3 2 3 G を生じた。( C ) E L I S A アッセイにより、親 D V 4 のレベルより上であるが、D V 2 レベルには達していない、2 D 2 2 の D V 4 - E D I I I - D V 2 との転移された部分的結合が、示されている。( D ) 交差反応性対照抗体 2 J 2 0 の E L I S A 結合は、存在し、かつウイルスの構造的完全性を維持したウイルスが同等レベルであることを示している。( E ) ペロ - 8 1 に基づいた病巣低下中和試験 ( F R N T ) を、2 D 2 2 を用いて実施し、F R N T <sub>50</sub> ( 感染の 5 0 % を中和するのに必要とされる抗体の濃度 ) 値を計算した。( F ) U 9 3 7 + D C - S I G N に基づいた中和アッセイ ( N e u t ) を、2 D 2 2 を用いて実施し、N e u t <sub>50</sub> 値を計算した。両方のアッセイ ( E 、 F ) において、D V 4 - E D I I I - D V 2 は、2 D 2 2 による中和を、D V 2 より高いレベルで獲得した。D V 4 は、いずれのアッセイにおいても、2 D 2 2 の最高濃度で中和されなかった。

【図 1 8】D V 4 - E D I I I - D V 2 が、多くの追加の D V 2 型特異的 M A b による中和を獲得したことを示す図である。( A 、 B 、 E ) エスケープ突然変異体または ( 表 2 からの ) アラニンスキャニング突然変異残基、それぞれ、D V C 3 . 7 について残基 3 8 2 、 D V C 1 0 . 1 6 について残基 3 1 1 、 ならびに D V C 1 3 . 6 について残基 1 0 1 および 1 0 8 が示されている、D E N V E タンパク質二量体結晶構造。( C 、 D 、 F ~ I ) 各 M A b についてのペロ - 8 1 F R N T アッセイ。3 F 9 を例外として、示された M A b による D V 4 - E D I I I - D V 2 中和が、親 D V 2 ウイルスのレベルの同等以上のレベルで転移された。3 F 9 は、D V 4 - E D I I I - D V 2 と結合しない ( E L I S A 結合データは未呈示 ) 。

【図 1 9】D V 4 - E D I I I - D V 2 は D V 4 型特異的 E D I I I M A b により中和されないことを示す図である。( A ) ( 表 2 からの ) アラニンスキャニング突然変異残基が残基 3 3 1 および 3 6 1 に示されている、D E N V E タンパク質二量体結晶構造。( B ) ペロ - 8 1 F R N T アッセイにより、D V - E 8 8 は、D V 4 - E D I I I - D V 2 も D V 2 も中和する能力がないが、親 D V 4 を中和することができることが示されてい

10

20

30

40

50

る。

【図20】DV4-EDIII-DV2は、ポリクローナルDENV2免疫血清による中和を獲得したことを示す図である。(A~L)ペロ-81FRNTアッセイにより、DV2中和のレベルに匹敵する、DV4-EDIII-DV2に対するポリクローナル免疫血清中和の獲得が示されており、EDIIIのDV2からDV4への転移が、DENV2中和の大部分を転移するのに十分であることを示している。 $* = FRNT_{50} < 20$

【図21】DV4-EDIII-DV2は、ポリクローナルDENV4免疫血清による中和を維持したことを示す図である。(A~F)ペロ-81FRNTアッセイにより、DV4-EDIII-DV2が大部分の中和を維持することが示され、DV2由来のEDIIIの転移が、DV4中和エピトープを破壊しないことを示している。 $* = FRNT_{50} < 20$

【図22】DV4-EDIII-DV2はDV2血清中和を獲得し、かつDV4血清中和を保存することを示す図である。(A)図19に提示されたDV2ポリクローナル中和データの概要。(B)図20に提示されたDV4ポリクローナル中和データの概要。FRNT<sub>50</sub> < 20を有する試料は19の血清希釈係数にグラフ化されている。

【図23】DV4-EDIII-DV2は、ヘテロタイプのポリクローナル免疫血清による中和を獲得しないことを示す図である。ペロ-81FRNTアッセイにより、親DV2またはDV4中和価のいずれよりも上の、ヘテロタイプの(A)DENV1または(B)DENV3ポリクローナル免疫血清による中和の獲得はないことが示されている。FRNT<sub>50</sub> < 20を有する試料は19の血清希釈係数にグラフ化されている。

【図24】rDENV4/2ウイルスの設計および構築を示す図である。(A)DENV2(右)由来の残基を、DENV4主鎖へ移動させて、組換えDENV4/2ウイルス(rDENV4/2)を生じさせることができる。(B)DENVゲノムを操作するための逆遺伝学系。上=DENV2、下=DENV4。DENVゲノムは4つのプラスミドカセットへ分割され、そのプラスミドカセットは、個々に突然変異させ、合わせてライゲーションし、細胞へ電気穿孔して、組換えウイルスを生じることができる。DENV4-Aカセットは、変異が生じているエンベロープ遺伝子を含む。DENV4残基をDENV2由来のそれらと置き換えることにより、全体的にDENV4遺伝子主鎖上に構築されたrDENV4/2ウイルスが生じる。

【図25】RT-PCRによる血清型同定のための新しい方法およびDENV4主鎖組換えウイルスの確認を示す図である。(A)血清型特異的RT-PCRのためのRT-PCRプライマーの設計。プライマーは、高度に保存された3'末端NS1遺伝子を標的にする共通のセンスオリゴヌクレオチドを利用する。血清型特異的アンチセンスプライマーは、高度に多様なNS2A遺伝子を標的にする。(B)ウイルスをC6/36細胞において成長させ、培養上清を収集し、遠心分離して、いかなる細胞片も除去した。ウイルスRNAを、QIAGEN QIAmpウイルスRNA Miniprepキットを用いて単離した。PCRを35サイクル、実行し、PCR産物を1.5%超高純度アガロースゲル上で分析した。対照RNA(DV1/DV2/DV3/DV4)および水を、陽性および陰性対照として流した。予想される産物サイズ：DV1 = 205 bp、DV2 = 539 bp、DV3 = 455 bp、DV4 = 401 bp。

【図26】制限断片長多型はrDENV4/2を親DENV4から識別することを示す図である。(A)rDENV4/2(下部)を親DENV4(上部)から識別するために設計された制限断片長多型(RFLP)。rDENV4/2を作製するためにDENV4Eゲノムへ導入された変異(アスタリスクとして表されている)は、DENV4に存在するXmnI制限酵素部位を破壊する。(B)PCR産物をゲル精製し、XmnIで消化する。消化産物を、1.5%超高純度アガロースゲル上で分析した。予想される産物サイズ：消化されていない完全長 = 1031 bp、消化された産物 = 931 bpおよび113 bp。

【図27】DENV4およびrDENV4/2ピリオンは類似した成熟プロフィールを有することを示す図である。ウイルスをC6/36細胞において成長させ、培養上清を収集

10

20

30

40

50

し、遠心分離していかなる細胞片も除去した。試料を、12% SDS-PAGEゲル上に流し、プロットを、抗E抗体(4G2)および抗PrM抗体(2H12および5L20)で探索した。DENV2は実質的レベルのPrMが存在し、不完全なフーリンプロセシングまたはPrM解離のいずれかを示している。PrMバンドは、DENV4試料またはrDENV4/2試料のいずれにおいても検出されない。

【図28】rDENV4/2は、親ウイルスと比較してベロ細胞において2logの成長減弱を生じることを示す図である。(A)ベロ-81細胞を、MOI=0.01で感染させた。ウイルス上清を24時間ごとに収集し、その後、ベロ-81細胞において力価測定した。(B)DENVはベロ-81細胞において感染巣を形成する(DENV2、DENV4、およびrDENV4/2をそれぞれ、感染から5日後、4日後、および6日後、固定した)。rDENV4/2病巣は、どちらの親ウイルスよりも小さい。

【図29】rDENV4/2はC6/36細胞において成長減弱を生じず、親ウイルスと比較して類似した感染巣を形成することを示す図である。(A)C6/36細胞を、MOI=0.01で感染させた。ウイルス上清を24時間ごとに収集し、その後、C6/36細胞において力価測定した。(B)DENVはC6/36細胞において感染巣を形成する(DENV2、DENV4、およびrDENV4/2をそれぞれ、感染から4日後、3日後、および5日後、固定した)。さらに何日間かの成長で、rDENV4/2病巣は親ウイルスに匹敵するサイズに達する。

【図30】型特異的DENV2ヒトMAbによるrDENV4/2の結合および中和の転移を示す図である。(A)四次エピトープと結合する強中和性DV2 MA bであるヒトMA b 2D22の概要の表。(B)ELISAアッセイにより、親DV4のレベルより上であるが、DV2レベルには達していない、2D22のrDENV4/2との、転移された部分的結合が、示されている。(C)交差反応性対照抗体2J20のELISA結合は、存在し、かつウイルス完全性を維持したウイルスが同等レベルであることを示している。(D)ベロ-81に基づいた病巣低下中和試験(FRNT)を、2D22を用いて実施し、FRNT<sub>50</sub>(感染の50%を中和するのに必要とされる抗体の濃度)値を計算した。(E)U937+DC-SIGNに基づいた中和アッセイ(Neut)を、2D22を用いて実施し、Neut<sub>50</sub>値を計算した。両方のアッセイ(D、E)において、rDENV4/2は、2D22による中和を、DV2より高いレベルで獲得した。DV4は、いずれのアッセイにおいても、2D22の最高濃度で中和されなかった。

【図31】rDENV4/2は、DENV4ポリクローナル血清による中和を保存しながら、DENV2ポリクローナル免疫血清による中和を獲得することを示す図である。ベロ-81 FRNTアッセイにより、(A)rDENV4/2が、親DENV2に匹敵するレベルでDENV2ポリクローナル免疫血清による中和を獲得することが示されている。(B)rDENV4/2は、DENV4ポリクローナル免疫血清による中和の喪失を示さない。rDENV4/2は、親のDENV2またはDENV4中和価のいずれよりも上の、ヘテロタイプの(C)DENV1および(D)DENV3ポリクローナル免疫血清による中和の獲得を示していない。自然感染または実験的ワクチン接種のいずれかを有する個体由来の血清は、示されているようにコードされている。FRNT<sub>50</sub><20を有する試料は19の血清希釈係数にグラフ化されている。

【図32A】組換えDENV4/2配列のアラインメントを示す図である。野生型DENV2、組換えDV4-EDIII-DV2、および野生型DENV4のアミノ酸配列が、コンセンサス配列およびアミノ酸保存パーセンテージと共に示されている。

【図32B】組換えDENV2/1配列のアラインメントを示す図である。野生型DENV1、組換えDENV2-1F4E、および野生型DENV2のアミノ酸配列が、コンセンサス配列およびアミノ酸保存パーセンテージと共に示されている。

【図32C】組換えDENV4/3配列のアラインメントを示す図である。野生型DENV3、組換えDENV4 M12、DENV4 M14、DENV4 M16、および野生型DENV4のアミノ酸配列が、コンセンサス配列およびアミノ酸保存パーセンテージと共に示されている。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0028】

本発明は、1つまたは複数のDENV血清型を定義する1つまたは複数のエピトープ領域を、異なるDEN血清型のタンパク質主鎖へ転移させて、複数の血清型についての抗体標的を含有するキメラ分子が生成され得、それにより、単一の供給源または4つ未満の供給源由来の2つ、3つ、または4つの異なるDEN血清型に対する中和抗体を誘導することができる多価（例えば、二価、三価、または四価）のワクチンとして機能するという予期せぬ発見に基づいている。したがって、本発明は、デングウイルスE糖タンパク質主鎖のデングウイルス血清型とは異なる1つ、または複数のデングウイルス血清型と反応性であるそれぞれの抗体により認識される1つまたは複数のエピトープを導入するアミノ酸置換を含むキメラデングウイルスE糖タンパク質主鎖の構築のためのプラットフォームを提供する。

10

## 【0029】

いくつかの実施形態において、そのデングウイルスE糖タンパク質主鎖は、デングウイルス血清型1由来である。いくつかの実施形態において、デングウイルスE糖タンパク質主鎖は、デングウイルス血清型2、デングウイルス血清型3、またはデングウイルス血清型4由来であり得る。

## 【0030】

いくつかの実施形態において、デングウイルスE糖タンパク質主鎖のデングウイルス血清型とは異なるデングウイルス血清型と反応性である抗体は、デングウイルス血清型1、デングウイルス血清型2、デングウイルス血清型3、またはデングウイルス血清型4と反応性である抗体である。

20

## 【0031】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のそれぞれのデングウイルス血清型由来の1つまたは複数のデングウイルスタンパク質ドメインは、異なるデングウイルス血清型のデングウイルスE糖タンパク質主鎖へ導入することができる。

## 【0032】

デングウイルスE糖タンパク質主鎖についての第1のデングウイルス血清型、ならびに第2、第3、および/または第4のデングウイルス血清型、それぞれにおいて同定されているようなデングウイルスエピトープまたはデングウイルスタンパク質ドメインの任意の組み合わせが、第1のデングウイルス血清型、ならびに第2、第3、および/または第4のデングウイルス血清型が異なる（すなわち、第2、第3、および/もしくは第4の血清型が、第1のデングウイルス血清型と同じ血清型ではなく、ならびに/または第2、第3、および/もしくは第4のデングウイルス血清型がお互いに異なる）という条件で、用いることができることは理解されるであろう。

30

## 【0033】

したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、デングウイルスE糖タンパク質主鎖のデングウイルス血清型とは異なるデングウイルス血清型と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含むデングウイルスE糖タンパク質主鎖を含むキメラデングウイルスE糖タンパク質主鎖であって、デングウイルスE糖タンパク質主鎖がデングウイルス血清型4由来であり、抗体がデングウイルス血清型3と反応性である、キメラデングウイルスE糖タンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体5J7であり、いくつかの実施形態において、E糖タンパク質は、アミノ酸配列：

40

## 【化 1】

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLRT  
 YCIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKF  
 SCSGKITGNLVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDTSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGE  
 LTLDCPRSGIDFNEMILMKMKKKTWLVHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNYKERMVT  
 FKVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDSGDGNHMFAGHLKCKVRMEKLRKGM  
 SYTMCSGKFSIDKEMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLA  
 ENTNSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLSALTLHWFRKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAW  
 DFGSVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIA  
 VGGITLFLGFTVQA (WT\_DENV4、配列番号1)

10

を含み得、それから本質的になり得、またはそれからなり得、前記アミノ酸配列が、以下のアミノ酸置換：

T 4 9 E、K 5 1 T、E 5 2 Q、V 5 3 L、L 5 5 T、T 5 8 K、Y 5 9 L、S 1 2 2 L  
 、G 1 2 3 E、K 1 2 4 P、T 1 2 6 E、N 1 2 8 K、L 1 2 9 V、I 1 3 2 Y、M 1 9  
 9 L、K 2 0 0 T、T 2 0 5 A、L 2 0 7 M、K 2 1 0 R、L 2 1 4 F、A 2 2 2 S、V  
 2 7 0 I、D 2 7 1 Q、S 2 7 2 N、G 2 7 3 S、D 2 7 4 G、N 2 7 6 T、H 2 7 7 S  
 、およびM 2 7 8 I

の全部を含み、または全部ではない任意の組み合わせで含み、前記アミノ酸配列が、以下のアミノ酸置換：A 7 1 D、T 1 4 8 Q、D 2 2 5 T、V 2 2 9 P、D 3 0 7 K、K 3 2  
 1 Q、およびV 3 6 2 Pのうちの1つまたは複数を任意の組み合わせでさらに含み得る。

20

## 【0034】

いくつかの実施形態において、4/3デングウイルス糖タンパク質として上で記載されたキメラデングウイルスE糖タンパク質は、アミノ酸配列：

## 【化 2】

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTATQLATLRKL  
 CIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CSGPIEGKVVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDTSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGEL  
 TLDCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGADTSEVHWNYKERMVTF  
 KVPKAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRKGMST  
 MMSGKFSIDKEMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLAENT  
 NSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLSALTLHWFRKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
 SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
 ITLFLGFTVQA (DENV4\_M12、配列番号2)

30

またはアミノ酸配列：

## 【化 3】

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTEATQLATLRKL  
 CIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CLEPIEGKVVQYENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDTSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGEL  
 TLDCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGADTSEVHWNYKERMVTF  
 KVPKAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRKGMST  
 MMSGKFSIDKEMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLAENT  
 NSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLSALTLHWFRKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
 SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
 ITLFLGFTVQA (DENV4\_M14、配列番号3)

40

50

またはアミノ酸配列：

【化4】

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTEATQLATLRKL  
CIEASISNITTDTRCPTQGEPYLKEEQDQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
CLEPIEGKVQYENLEYTVVVTVHNGDQHAVGNDTSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGEL  
TLDCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTSEPHWNYKERMVTF  
KVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRKIGMSYT  
MCSGKFSIKKEMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLAENT  
NSPTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLSALTLHWFRKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
ITLFLGFTVQA (DENV4\_M16、配列番号4)

10

を含み得、それから本質的になり得、またはそれからなり得る。

【0035】

いくつかの実施形態において、本発明は、 Dengue ウイルス E 糖タンパク質主鎖の Dengue ウイルス血清型とは異なる Dengue ウイルス血清型由来のタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む Dengue ウイルス E 糖タンパク質主鎖を含むキメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質であって、 Dengue ウイルス E 糖タンパク質主鎖が Dengue ウイルス血清型 4 由来であり、タンパク質ドメインが Dengue ウイルス血清型 2 由来である、キメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質を提供する。

20

【0036】

いくつかの実施形態において、 Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルス E 糖タンパク質主鎖が、 Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、抗体はモノクローナル抗体 2D22 である。

【0037】

いくつかの実施形態において、タンパク質ドメインは E 糖タンパク質ドメイン III であり、いくつかの実施形態において、4/2 として上で記載されたキメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質は、アミノ酸配列：

30

【化5】

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLRT  
YCIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKF  
SCSGKITGNLVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDTSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGE  
LTLDCPRSGIDFNEMILMKMKKKTWLVHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNYKERMVT  
FKVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDSGDGNHMFAGHLKCKVRMEKLRRLKGM  
SYSMCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEK  
DSPVNIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
ITLFLGFTVQA (DV4-EDIII-DV2、配列番号5)

40

を含み得、それから本質的になり得、またはそれからなり得る。

【0038】

いくつかの実施形態において、キメラ Dengue ウイルス E 糖タンパク質は、アミノ酸配列：

## 【化6】

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLRT  
 YCIEASISNITTATRCPTQGEPLYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKF  
 SCSGKITGNLVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDTSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGE  
 LTLDCPRSGIDFNEMILMKMKKKTWLVHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNKYKERMVT  
 FKVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDSGDGNHMFAGHLKCKVRMEKLRIGM  
 SYTMCSGKFSIDKEMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLA  
 ENTNSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLSALTLHWFRKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAW  
 DFGSVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIA  
 VGGITLFLGFTVQA (WT\_DENV4、配列番号1)

10

を含み得、前記アミノ酸配列が、以下のアミノ酸置換：

T 3 0 0 S、S 3 0 3 T、S 3 0 7 K、D 3 0 9 V、M 3 1 2 I、T 3 2 0 I、V 3 2 2  
 I、K 3 2 3 R、K 3 2 5 Q、A 3 2 9 D、A 3 3 1 S、V 3 3 5 I、I 3 3 7 F、R 3  
 4 0 T、V 3 4 2 L、N 3 4 3 E、E 3 4 5 R、K 3 4 6 H、V 3 4 8 L、V 3 5 1 L、  
 S 3 5 3 T、S 3 5 4 V、T 3 5 5 N、L 3 5 7 I、A 3 5 8 V、E 3 5 9 T、N 3 6 0  
 E、T 3 6 1 K、N 3 6 2 D、V 3 6 4 P、T 3 6 5 V、L 3 6 9 A、V 3 7 9 I、G 3  
 8 3 E、N 3 8 4 P、S 3 8 5 G、A 3 8 6 Q、T 3 8 8 K、H 3 9 0 NおよびR 3 9 3  
 K

20

の全部を含み、または全部ではない任意の組み合わせで含む。

## 【0039】

この発明のさらなる実施形態は、相互交換ウイルス、すなわち、デングウイルス血清型  
 4由来のデングウイルスタンパク質ドメイン（例えば、ドメインIII）を導入するアミ  
 ノ酸置換を有するデングウイルス血清型2のデングウイルスE糖タンパク質を含む。デ  
 ングウイルス血清型主鎖、および異なるデングウイルス血清型由来の置換デングウイル  
 スタンパク質ドメインの任意の他の組み合わせがこの発明の実施形態として含まれ、例  
 えば、組み合わせ1/2、1/3、1/4、1/2/3、1/2/4、1/3/4、1/2/3  
 /4、2/1、2/3、2/4、2/1/3、2/1/4、2/3/4、2/1/3/4  
 、3/1、3/2、3/4、3/1/2、3/1/4、3/2/4、3/1/2/4、4  
 /1、4/2、4/3、4/1/3、4/1/2、4/3/2、または4/3/2/1（  
 各組み合わせの1番目の数は主鎖の血清型を定義し、各組み合わせの2番目、3番目、ま  
 たは4番目の数は、主鎖へ導入されているエピトープまたはドメインの血清型を定義する  
 ）が挙げられる。

30

## 【0040】

本発明のいくつかの実施形態は、デングウイルスE糖タンパク質主鎖のデングウイルス  
 血清型とは異なるデングウイルス血清型と反応性である抗体により認識されるエピト  
 ープを導入するアミノ酸置換を含むデングウイルスE糖タンパク質主鎖を含むキメラデ  
 ングウイルスE糖タンパク質であって、デングウイルスE糖タンパク質主鎖がデング  
 ウイルス血清型2由来であり、抗体がデングウイルス血清型1と反応性である、キ  
 メラデングウイルスE糖タンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、抗体  
 はモノクローナル抗体1F4であり、いくつかの実施形態において、キメラデング  
 ウイルスE糖タンパク質は、アミノ酸配列：

40

## 【化 7】

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELFKTEVTNPAVLRKYCI  
 EAKLTNTTTSRCPTQGEPSLNEEQDKRFICKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTC  
 KKNMEGKVVQPENLKYSVIVTVHSGEEHAVGNDTTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALT  
 LECSPTGLDFNEMVLLQMEDKAWLVHRQWFLDLPLPWLPGADTQESNWIQKETLVTFK  
 NPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTTLFTGHLKCRRLRMDKLQLKGMSYS  
 MCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPCKIPFEITDLEKRHVLRGLITVNPVTEKDSP  
 VNIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLG  
 GVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTLSVSLVVLVGVVTLY  
 LGAVVQA (DENV2-1F4E、配列番号6)

10

を含み、それから本質的になり、またはそれからなる。

## 【0041】

この発明のいくつかの実施形態において、キメラE糖タンパク質は、モノクローナル抗体5H2と反応性であるデングウイルス血清型4由来のエピトープを導入するために、任意の組み合わせでの、以下のアミノ酸置換：残基155におけるA、残基160におけるV、残基161におけるT、残基162におけるA、残基163におけるM、残基168におけるS、残基170におけるS、残基171におけるV、残基173におけるV、残基174におけるK、残基176におけるP、残基177におけるD、残基180におけるE、残基291におけるK、および残基293におけるRのうちの1個または複数（例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、または15個全部）を含む、デングウイルス血清型1、デングウイルス血清型2、またはデングウイルス血清型3のデングウイルスE糖タンパク質主鎖を含み得る。アミノ酸ナンバリングは、ここに提供されたWT\_\_DENV4のアミノ酸配列に基づいている。

20

## 【0042】

本発明は、ここに提供された配列表セクションにおいて、本明細書に記載された組成物および方法に用いることができる、この発明のキメラデングウイルスE糖タンパク質の追加の非限定的例を提供する。

30

## 【0043】

本発明はまた、例えば、対象においてデングウイルスに対する免疫応答を生じさせる方法であって、対象に、有効量の、この発明のE糖タンパク質、この発明のフラビウイルス粒子、この発明のVLP、この発明の核酸分子、この発明の集団、および/またはこの発明の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法を含めた様々な治療的方法を提供する。

## 【0044】

対象においてデングウイルス感染を処置する方法であって、対象に、有効量の、この発明のE糖タンパク質、この発明のフラビウイルス粒子、この発明のVLP、この発明の核酸分子、この発明の集団、および/またはこの発明の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法が、追加としてここに提供される。

40

## 【0045】

さらなる実施形態において、本発明は、対象においてデングウイルス感染に関連した障害を防止する方法であって、対象に、有効量の、この発明のE糖タンパク質、この発明のフラビウイルス粒子、この発明のVLP、この発明の核酸分子、この発明の集団、および/またはこの発明の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法を提供する。

## 【0046】

デングウイルス感染の影響から対象を保護する方法であって、対象に、有効量の、この発明のE糖タンパク質、この発明のフラビウイルス粒子、この発明のVLP、この発明の

50

核酸分子、この発明の集団、および/またはこの発明の組成物、ならびにそれらの任意の組み合わせを投与することを含む方法もまたここに提供される。

【0047】

本発明はまた、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および/または 4 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、例えば、a) Dengue ウイルス血清型 3 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/または Dengue ウイルス血清型 3 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/または Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を、上記のステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子と、フラビウウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、ならびに c) ステップ (b) における中和を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および/または 4 に対する中和抗体の存在を同定するステップを含む方法を含めた様々な診断方法を提供する。

10

【0048】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および/または 4 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/または Dengue ウイルス血清型 2 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/または Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を、上記のステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子と、フラビウウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、ならびに c) ステップ (b) における中和を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および/または 4 に対する中和抗体の存在を同定するステップを含む方法が本明細書にさらに提供される。

20

30

【0049】

本発明はまた、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および/または 2 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 1 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/または Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/または Dengue ウイルス血清型 1 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/または Dengue ウイルス血清型 2 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を、上記のステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウウイルス粒子と、フラビウウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、ならびに c

40

50

)ステップ(b)における中和を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体の存在を同定するステップを含む方法を提供する。

【0050】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 3 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 3 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、ならびに b) ステップ(a)における中和を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定するステップを含む方法もまたここに提供される。

10

【0051】

さらに、本発明は、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、ならびに b) ステップ(a)における中和を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体の存在を同定するステップを含む方法を提供する。

20

30

【0052】

追加の実施形態において、本発明は、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体の存在を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 1 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 1 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、ならびに b) ステップ(a)における中和を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体の存在を同定するステップを含む方法を提供する。

40

【0053】

本発明はさらに、対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和

50

抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a) デングウイルス血清型 3 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/またはデングウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/またはデングウイルス血清型 3 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/またはデングウイルス血清型 4 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を、ステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、c) 生物学的試料が、ステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに d) 生物学的試料が、(a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、対象においてデングウイルス血清型 3 および/または 4 に対する中和抗体を誘導するものとして免疫原性組成物を同定するステップを含む方法を提供する。

10

**【0054】**

さらに、本発明は、対象においてデングウイルス血清型 2 および/または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a) デングウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/またはデングウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/またはデングウイルス血清型 2 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/またはデングウイルス血清型 4 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を、ステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、c) 生物学的試料が、ステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに d) 生物学的試料が、(a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、対象においてデングウイルス血清型 2 および/または 4 に対する中和抗体を誘導するものとして免疫原性組成物を同定するステップを含む方法を提供する。

20

30

**【0055】**

本発明はさらに、対象においてデングウイルス血清型 1 および/または 2 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a) デングウイルス血清型 1 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/またはデングウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/またはデングウイルス血清型 1 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および/またはデングウイルス血清型 2 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を、ステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、c) 生物学的試

40

50

料が、ステップ ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに d ) 生物学的試料が、 ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、対象において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導するものとして免疫原性組成物を同定するステップを含む方法を提供する。

【 0 0 5 6 】

追加の実施形態において、本発明は、対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、 a ) Dengue ウイルス血清型 3 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 3 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、 E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、 b ) 生物学的試料が、ステップ ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに c ) 生物学的試料が、 ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体を誘導するものとして免疫原性組成物を同定するステップを含む方法を提供する。

10

20

【 0 0 5 7 】

追加として、本発明は、対象において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、 a ) Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、 E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、 b ) 生物学的試料が、ステップ ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに c ) 生物学的試料が、 ( a ) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、対象において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体を誘導するものとして免疫原性組成物を同定するステップを含む方法を提供する。

30

40

【 0 0 5 8 】

追加として、対象において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、 a ) Dengue ウイルス血清型 1 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 1 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または

50

デングウイルス血清型 2 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子と、フラビウイルス粒子の中和を検出することができる条件下で接触させるステップ、b) 生物学的試料が、ステップ (a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含むかどうかを決定するステップ、ならびに c) 生物学的試料が、(a) の E 糖タンパク質を含むフラビウイルス粒子を中和する抗体を含む場合には、対象においてデングウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導するものとして免疫原性組成物を同定するステップを含む方法がここに提供される。

【0059】

本発明はさらに、試料においてデングウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を検出する方法であって、a) デングウイルス血清型 3 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血清型 3 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血清型 4 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物と試料を、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、試料においてデングウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を検出するステップを含む方法を提供する。

【0060】

本発明はまた、試料においてデングウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を検出する方法であって、a) デングウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血清型 2 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血清型 4 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物と試料を、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、試料においてデングウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を検出するステップを含む方法を提供する。

【0061】

試料においてデングウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を検出する方法であって、a) デングウイルス血清型 1 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血清型 1 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血清型 2 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物と試料を、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、試料においてデングウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を検出するステップを含む方法もまたここに

10

20

30

40

50

提供される。

【0062】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 3 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 3 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を ( a ) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに c ) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を同定するステップを含む方法がさらにここに提供される。

10

【0063】

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を ( a ) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに c ) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を同定するステップを含む方法が、追加としてここに提供される。

20

30

【0064】

なおさらなる実施形態において、本発明は、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 1 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 1 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を ( a ) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに c ) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を同定するステップを含む方法を提供する。

40

【0065】

50

対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 3 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 3 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を同定するステップを含む方法が、追加としてここに提供される。

10

**【0066】**

本発明はさらに、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を同定するステップを含む方法を提供する。

20

**【0067】**

本発明はさらに、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 1 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 1 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 2 の Dengue ウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに b) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象由来の生物学的試料において Dengue ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を同定するステップを含む方法を提供する。

30

40

**【0068】**

本発明はさらに、対象において Dengue ウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a) Dengue ウイルス血清型 3 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物、および / または Dengue ウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を

50

含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または  
デングウイルス血清型 3 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を  
含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または  
デングウイルス血清型 4 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を  
含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を投与されている  
対象由来の生物学的試料を、E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で  
接触させるステップ、ならびに b ) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象  
においてデングウイルス血清型 3 および / または 4 に対する抗体を誘導する免疫原性組成  
物を同定するステップを含む方法を提供する。

【 0 0 6 9 】

対象においてデングウイルス血清型 2 および / または 4 に対する抗体を誘導する免疫原  
性組成物を同定する方法であって、a ) 請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の E 糖タンパ  
ク質を含む免疫原性組成物を投与されている対象由来の生物学的試料を、E 糖タンパク質  
と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに b ) 抗原 / 抗  
体複合体の形成を検出し、それにより、対象においてデングウイルス血清型 2 および / ま  
たは 4 に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法がさらにこ  
こに提供される。

【 0 0 7 0 】

対象においてデングウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を誘導する免疫原  
性組成物を同定する方法であって、a ) デングウイルス血清型 1 と反応性である抗体により  
認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を  
含む E 糖タンパク質を含む免疫原性組成物、および / またはデングウイルス血清型 2 と反  
応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E  
糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血  
清型 1 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E  
糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / またはデングウイルス血  
清型 2 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E  
糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を投与されている対象由来の生物  
学的試料を、E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステ  
ップ、ならびに b ) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象においてデング  
ウイルス血清型 1 および / または 2 に対する抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステ  
ップを含む方法もまたここに提供される。

【 0 0 7 1 】

本発明のいくつかの実施形態において、対象においてデングウイルス血清型 3 および /  
または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a ) デン  
グウイルス血清型 3 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸  
置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および /  
またはデングウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入す  
るアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物  
、および / またはデングウイルス血清型 3 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入す  
るアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物  
、および / またはデングウイルス血清型 4 のデングウイルスタンパク質ドメインを導入す  
るアミノ酸置換を含む血清型 3 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物  
を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステ  
ップ、b ) 対象由来の生物学的試料を ( a ) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成  
し得る条件下で接触させるステップ、ならびに c ) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、そ  
れにより、対象においてデングウイルス血清型 3 および / または 4 に対する中和抗体を誘  
導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法が提供される。

【 0 0 7 2 】

本発明は、対象においてデングウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体を

10

20

30

40

50

誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a) デングウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または デングウイルス血清型 4 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または デングウイルス血清型 2 の デングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 4 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または デングウイルス血清型 4 の デングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を ( a ) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに c ) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象においてデングウイルス血清型 2 および / または 4 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法を、追加として提供する。

10

20

30

40

50

**【 0 0 7 3 】**

対象においてデングウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定する方法であって、a) デングウイルス血清型 1 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または デングウイルス血清型 2 と反応性である抗体により認識されるエピトープを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または デングウイルス血清型 1 の デングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 2 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物、および / または デングウイルス血清型 2 の デングウイルスタンパク質ドメインを導入するアミノ酸置換を含む血清型 1 の E 糖タンパク質主鎖を含む E 糖タンパク質を含む組成物を、対象に、E 糖タンパク質に対する抗体応答を誘導するのに有効な量で投与するステップ、b) 対象由来の生物学的試料を ( a ) の E 糖タンパク質と、抗原 / 抗体複合体が形成し得る条件下で接触させるステップ、ならびに c ) 抗原 / 抗体複合体の形成を検出し、それにより、対象においてデングウイルス血清型 1 および / または 2 に対する中和抗体を誘導する免疫原性組成物を同定するステップを含む方法もまた、ここに提供される。

**【 0 0 7 4 】**

いくつかの実施形態において、本発明は、移植されたエピトープまたはドメインに対して産生される抗体の量を決定する方法を提供する。例えば、5 J 7 領域を標的にする DEN V 3 抗体は、DEN V 4 M 1 4 の中和を親 DEN V 4 の中和と比較することにより測定することができ、DEN V 3 抗体が、DEN V 4 M 1 4 の一部を中和することができるが、親 DEN V 4 を中和することができないと予想される。

**【 0 0 7 5 】**

本発明はまた、この発明のキメラ E 糖タンパク質を含むデングウイルス粒子、フラビウイルス粒子、およびウイルス様粒子 ( V L P ) を提供する。本発明のデングウイルス E 糖タンパク質は、無傷のウイルス粒子 ( 例えば、死滅した、もしくは生きた弱毒化ウイルス粒子、または組換えデングウイルスベクター ) またはウイルス様粒子 ( V L P ) ( それらは、任意で、無傷のデングウイルス粒子またはデングウイルス V L P であってもよい ) 内に存在し得る。

**【 0 0 7 6 】**

この発明の E 糖タンパク質をコードする単離された核酸分子、この発明のデングウイルス粒子、フラビウイルス粒子、または V L P をコードする単離された核酸分子、この発明の核酸分子を含むベクター、ならびにこの発明のデングウイルス粒子および / またはフラビウイルス粒子を含むデングウイルス粒子および / またはフラビウイルス粒子の集団もまた、提供される。

**【 0 0 7 7 】**

この発明のE糖タンパク質を薬学的に許容される担体中に含む組成物、この発明の核酸分子を薬学的に許容される担体中に含む組成物、この発明のウイルス粒子を含む組成物、この発明の集団を薬学的に許容される担体中に含む組成物、およびこの発明のVLPを薬学的に許容される担体中に含む組成物がさらにここに提供される。

【0078】

いくつかの実施形態において、この発明のキメラの作製は、デングウイルスエピトープおよび/またはデングウイルスタンパク質ドメインの部分として同定されるアミノ酸置換の一部(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個など)または全部を、デングウイルスE糖タンパク質主鎖またはフラビウイルスE糖タンパク質主鎖へ導入することにより行うことができる。デングウイルスエピトープまたはデングウイルスタンパク質ドメインの部分として同定されるあらゆるアミノ酸が、この発明のキメラタンパク質を作製するために置換されることを必要とされるとは限らない。例えば、いくつかの実施形態において、デングウイルスエピトープまたはデングウイルスドメインの部分として同定される連続したアミノ酸配列の一方の末端における約1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸のさらなる置換および/または置換の排除が、この発明のキメラの作製において含まれ得る。望ましい高次構造的エピトープまたはドメインを生じるのに必要な置換の数は、本明細書における教示に従い、かつ当技術分野においてよく知られたプロトコールに従って、当業者により容易に決定することができる。本明細書に示されるアミノ酸配列に提供されるアミノ酸残基ナンバリングは、ここに提供されているように、それぞれのDENV血清型のそれぞれの非改変型(例えば、野生型)E糖タンパク質アミノ酸配列に基づいている。しかしながら、他のデングウイルスE糖タンパク質アミノ酸配列または他のフラビウイルスE糖タンパク質アミノ酸配列における等価のアミノ酸位置が、この発明のキメラタンパク質の作製において容易に同定および使用され得ることは当業者により容易に理解されるだろう。

【0079】

いくつかの実施形態において、本発明は、1つまたは複数のデングウイルスエピトープを、デングウイルスではないフラビウイルス由来のフラビウイルスE糖タンパク質へ導入するためにアミノ酸置換が生じている、キメラフラビウイルスE糖タンパク質を提供する。したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、デングウイルスE糖タンパク質主鎖ではないフラビウイルスE糖タンパク質主鎖を含むキメラE糖タンパク質を含むフラビウイルスE糖タンパク質であって、フラビウイルスE糖タンパク質主鎖が、デングウイルスと反応性であるそれぞれの抗体により認識される1つまたは複数のエピトープを導入するアミノ酸置換を含む、フラビウイルスE糖タンパク質を提供する。

【0080】

用いることができるフラビウイルスの非限定的例には、黄熱病ウイルス(YFV)(例えば、GenBank(登録商標)データベースアクセッション番号JX503529)、日本脳炎ウイルス(JEV)(例えば、GenBank(登録商標)データベースアクセッション番号U14163)、ウエストナイルウイルス(WNV)(例えば、GenBank(登録商標)データベースアクセッション番号DQ211652)、および現在知られた、または後で同定される任意の他のフラビウイルスが挙げられる。

【0081】

デングウイルスワクチンを作製しようとする多くの試みが、結果として、自然感染またはワクチンへのその後の曝露で病態の可能性を増加させ得る、非中和抗体の産生を生じることが、当技術分野において知られている。操作されたエピトープを提供するための別のアプローチは、別のフラビウイルス粒子またはVLPへ組み込まれたデングウイルスEタンパク質の全部または一部を送達することである。代表的な実施形態において、異種性フラビウイルスは、ウエストナイルウイルスまたは黄熱病ウイルスである。Eタンパク質の部分は、例えば、デングウイルスEタンパク質および/または他のデングウイルス構造タンパク質に存在する中和していないエピトープに対する非中和デングウイルス抗体の産生を低下させるために、異種性フラビウイルス主鎖のEタンパク質へ移植することができる

。

## 【0082】

したがって、キメラフラビウイルスまたはキメラフラビウイルスVLPは、キメラフラビウイルスまたはフラビウイルスVLPに存在していないデングウイルスEタンパク質の他の部分および/または他の構造タンパク質に対する非中和抗体の産生を低下させながら、四次デングウイルスエピトープを適切な高次構造で提示することができる。

## 【0083】

本発明のいくつかの実施形態において、フラビウイルスE糖タンパク質またはデングウイルスE糖タンパク質の個々のエピトープおよび高次構造的エピトープが、合成主鎖または支持構造上に、合成主鎖または支持構造内のエピトープが、E糖タンパク質、ウイルス粒子、またはVLPの構造内のエピトープの高次構造および配置を模倣するように、提示され得る。

10

## 【0084】

本発明のなおさらなる実施形態において、本発明は、本発明のE糖タンパク質の個々のエピトープおよび高次構造的エピトープを模倣するペプチドミモトープ(Meloen et al. (2000) J. Mol. Recognit. 13, 352-359を参照)を提供する。ミモトープは当技術分野において知られた任意の技術を用いて同定され得、その技術には、表面刺激、ランダムペプチドライブラリーまたはファージディスプレイライブラリー、加えて、本発明のE糖タンパク質の個々のエピトープおよび高次構造的エピトープに対する抗体が挙げられるが、それらに限定されない。

20

## 【0085】

本発明はさらに、本発明のデングウイルスペプチド、デングウイルスタンパク質ドメイン、デングウイルスポリペプチド、またはフラビウイルスポリペプチドをコードする核酸分子(例えば、単離された核酸分子)を提供する。

## 【0086】

本発明はさらに、本発明のキメラフラビウイルス粒子またはキメラフラビウイルス様粒子(VLP)(例えば、フラビウイルス粒子のウイルスコート)をコードする核酸分子(例えば、単離された核酸分子)を提供する。

## 【0087】

本発明の核酸分子を含む核酸ベクターもまた提供される。

30

## 【0088】

この発明の、ベクター、核酸分子、デングウイルスタンパク質、デングウイルスペプチド、デングウイルスタンパク質ドメイン、フラビウイルスタンパク質、フラビウイルスペプチド、フラビウイルスタンパク質ドメイン、キメラデングウイルス粒子、キメラデングウイルスVLP、キメラフラビウイルスVLP、および/またはキメラフラビウイルス粒子を単独で、または任意の組み合わせで含む細胞(例えば、単離された細胞)もまた提供される。

## 【0089】

本発明はまた、本発明の、細胞、ベクター、核酸分子、デングウイルスタンパク質、キメラデングウイルスVLP、キメラデングウイルス粒子、キメラフラビウイルスVLP、および/またはキメラフラビウイルス粒子を単独で、または任意の組み合わせで含む免疫原性組成物を提供する。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は一価である。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は、デングウイルス血清型DEN1、DEN2、DEN3、および/またはDEN4の任意の組み合わせについての多価(例えば、二価、三価、または四価)である。この発明のデングウイルスキメラE糖タンパク質は、対象に単独で、または任意の組み合わせで投与することができ、その組み合わせには、プライムおよびブーストの、当技術分野において知られているそのような免疫化プロトコールによる任意の組み合わせが挙げられる。この発明のデングウイルスキメラE糖タンパク質は、1/2、1/3、1/4、1/2/3、1/2/4、1/3/4、1/2/3/4、2/1、2/3、2/4、2/1/3、2/1/4、2/3/4、2/1/3/4、3/

40

50

1、3/2、3/4、3/1/2、3/1/4、3/2/4、3/1/2/4、4/1、4/2、4/3、4/1/3、4/1/2、4/3/2、または4/3/2/1（各組み合わせの1番目の数は主鎖の血清型を定義し、各組み合わせの2番目、3番目、または4番目の数は、主鎖へ導入されているエピトープまたはドメインの血清型を定義する）であり得る。いくつかの実施形態において、全ての4つの Dengue ウイルス血清型を代表する抗原の投与を生じるプライム/ブーストの組み合わせが用いられる。そのようなプライム/ブーストレジメンは、この結果を達成し得る任意の順序での抗原の任意の組み合わせの投与を含み得る。プライム/ブーストプロトコルの非限定的例には、それぞれ、0日目におけるプライム、および3ヶ月目と6ヶ月目におけるブースト、または6ヶ月目と1年目におけるブーストが挙げられる。このプロトコルはまた、3ヶ月目、6ヶ月目、または1年目のいずれかにおける1回みのブーストを含むように変更することもできる。

10

**【0090】**

本発明は、対象において Dengue ウイルスに対する免疫応答を生じさせる方法であって、対象に、有効量の、本発明の Dengue ウイルスタンパク質、キメラ Dengue ウイルス粒子、キメラ Dengue ウイルス VLP、キメラフラビウイルス VLP、キメラフラビウイルス粒子、核酸分子、ベクター、細胞、および/または免疫原性組成物を単独で、または任意の組み合わせで投与することを含む方法を包含する。

**【0091】**

いくつかの実施形態において、本発明は、有利には、DEN1、DEN2、DEN3、および DEN4 血清型のうちの1つ、2つ、3つ、または4つ全部に対する免疫応答を誘導するように実行することができる。いくつかの実施形態において、この発明の Dengue ウイルスキメラE糖タンパク質および/またはこの発明の Dengue ウイルスキメラE糖タンパク質をコードする核酸分子が、全ての4つの DENV 血清型に対する免疫応答（例えば、測定されることになっている Dengue 免疫のパラメータが、全ての4つの DENV 血清型についてほとんど等価である、バランスのとれた免疫応答）を誘導するために、単独で、または任意の組み合わせおよび/もしくは順序で、対象に投与することができる。有効かつ安全な多価 Dengue ワクチンが、血清型間の干渉という問題のために設計するのに課題を抱えていることは当技術分野においてよく知られている。例えば、免疫応答は、標的血清型の一部のみに対して主に向けられ得る。その後、全ての血清型に対する応答を達成するように試みるために、複数のワクチン接種が必要とされる；しかしながら、Dengue ウイルスの場合、このアプローチは、既存の抗体を有する対象への反復投与が、Dengue 出血熱などのより重篤な合併症および/または疾患をもたらし得るため、危険であり得る。

20

30

**【0092】**

本発明のなおさらなる態様は、Dengue ウイルス感染を処置する方法であって、対象に、有効量の、この発明の Dengue ウイルスタンパク質、Dengue ウイルスタンパク質ドメイン、Dengue ウイルスペプチド、キメラ Dengue ウイルス粒子、キメラ Dengue ウイルス VLP、キメラフラビウイルス VLP、キメラフラビウイルス粒子、核酸分子、ベクター、細胞、および/または免疫原性組成物を単独で、または任意の組み合わせで、もしくは組み合わせの任意の順序で投与することを含む方法である。

**【0093】**

本発明のなおさらなる態様は、Dengue ウイルス感染を防止する方法であって、対象に、有効量の、この発明の Dengue ウイルスタンパク質、Dengue ウイルスタンパク質ドメイン、Dengue ウイルスペプチド、キメラ Dengue ウイルス粒子、キメラ Dengue ウイルス VLP、キメラフラビウイルス VLP、キメラフラビウイルス粒子、核酸分子、ベクター、細胞、および/または免疫原性組成物を単独で、または任意の組み合わせで、もしくは組み合わせの任意の順序で投与することを含む方法である。

40

**【0094】**

本発明のなおさらなる態様は、Dengue ウイルス感染の影響から対象を保護する方法であって、対象に、有効量の、この発明の Dengue ウイルスタンパク質、Dengue ウイルスタンパク質ドメイン、Dengue ウイルスペプチド、キメラ Dengue ウイルス粒子、キメラ Dengue ウイ

50

ルスVLP、キメラフラビウイルスVLP、キメラフラビウイルス粒子、核酸分子、ベクター、細胞、および/または免疫原性組成物を単独で、または任意の組み合わせで、もしくは組み合わせの任意の順序で投与することを含む方法である。

【0095】

「 Dengueウイルス感染の影響から対象を保護すること」とは、対象が、 Dengueウイルス感染によって引き起こされる疾患または障害を発症しないこと、あるいは、対象が Dengueウイルス感染によって引き起こされる疾患または障害を発症した場合には、この発明の Dengueウイルスタンパク質、 Dengueウイルスタンパク質ドメイン、 Dengueウイルスペプチド、キメラ Dengueウイルス粒子、キメラ DengueウイルスVLP、キメラフラビウイルスVLP、キメラフラビウイルス粒子、核酸分子、ベクター、細胞、および/または免疫原性組成物の投与の非存在下で Dengueウイルスによる感染で対象が経験するだろうものと比較して、対象において、疾患もしくは障害の重症度がより低く、ならびに/または症状が減少し、および/もしくは重症度が低いことを意味する。

10

【0096】

Dengueウイルスの4つの血清型(DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4)がある。各血清型内には、いくつかの異なる菌株または遺伝子型がある。この発明の Dengueウイルスエピトープおよびタンパク質ドメインは、現在知られた、または後で同定される、全ての血清型、菌株、および遺伝子型を含む、任意の Dengueウイルス由来であり得る。

【0097】

本発明の実施形態において、 Dengueウイルスは、UNC1017株(DEN1)、ウエストパシフィック(West Pacific)74株(DEN1)、S16803株(DEN2)、UNC2005株(DEN2)、S16803株(DEN2)、UNC3001株(DEN3)、UNC3043(1984年フィリピンから採取されたDEN3株059.AP-2)、UNC3009株(DEN3、D2863、スリランカ、1989)、UNC3066(1977年プエルトリコから採取されたDEN3、1342株)、CH53489株(DEN3)、UNC4019株(DEN4)、またはTVP-360(DEN4)である。

20

【0098】

本発明の実施形態において、 Dengueウイルスポリペプチド(例えば、Eタンパク質)の「免疫学的活性断片」は、少なくとも約6個、8個、10個、12個、15個、20個、30個、50個、75個、100個、125個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個もしくはそれ以上のアミノ酸、任意で、連続したアミノ酸、および/または約495個未満、475個未満、450個未満、425個未満、400個未満、350個未満、300個未満、250個未満、200個未満、150個未満、100個未満、75個未満、もしくは50個未満のアミノ酸、任意で、連続したアミノ酸、加えて、下限が上限より少ない限り、前述の任意の組み合わせを含み、それらから本質的になり、またはそれらからなり、「免疫学的活性断片」は、宿主において Dengueウイルスに対する免疫応答(例えば、天然抗原と反応するIgGおよび/またはIgA)、任意で、防御免疫応答を誘導し、本明細書に記載された四次 Dengueウイルスエピトープと特異的に結合する抗体(例えば、中和抗体)の産生を誘導する。

30

40

【0099】

本明細書に用いられる場合、用語「エピトープ」は、適切な高次構造で存在する場合、抗体(例えば、B細胞エピトープ)またはT細胞受容体(例えば、T細胞エピトープ)に対して反応部位を提供する、アミノ酸配列におけるアミノ酸残基の特定の組み合わせを意味する。

【0100】

B細胞エピトープを含む所定のポリペプチドの部分は、当技術分野において知られているエピトープマッピング技術(例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol

50

66, Glenn E. Morris, Ed., 1996, Humana Press, Totowa, N.J. 参照) のいくつかでも用いて、同定することができる。例えば、直鎖状エピトープは、例えば、多数のペプチド(そのペプチドは、タンパク質分子の部分に対応している)を固体支持体上で同時に合成し、ペプチドが支持体にまだ付着したまま、ペプチドを抗体と反応させることにより、決定することができる。そのような技術は当技術分野において知られており、例えば、米国特許第4,708,871号; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715に記載されている。

10

**【0101】**

同様に、高次構造的エピトープは、例えば、X線結晶解析および2次元核磁気共鳴などのアミノ酸の空間的高次構造を決定することにより容易に同定することができる。タンパク質の抗原性領域もまた、例えば、Oxford Molecular Groupから入手できるOmigaバージョン1.0ソフトウェアプログラムを用いて計算されるものなど、標準の抗原性およびヒドロパシーのプロットを用いて同定することができる。このコンピュータプログラムは、抗原性プロフィールを決定するためにHopp/Woods method (Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:3824-3828) およびヒドロパシープロットのためにKyte-Doolittle技術(Kyte et al., J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132)を用いる。

20

**【0102】**

一般的に、対象の細胞性免疫系を刺激することに関与するT細胞エピトープは、約8~25個のアミノ酸の短いペプチドである。T細胞エピトープを同定する一般的な方法は、重複合成ペプチドを用いて、例えば、酵素結合イムノスポットアッセイ(ELISPOT)を用いて、関心対象となる抗原に対して免疫性である動物由来のT細胞によって認識されるこれらのペプチドのプール、または個々のペプチドを分析することである。これらの重複ペプチドはまた、サイトカイン放出もしくは分泌の刺激などの他のアッセイに用いることができ、またはそのペプチドを含有する主要組織適合性(MHC)四量体を構築することにより評価することができる。そのような免疫原的活性断片はまた、関心対象となる抗原由来の様々な断片による刺激に应答してリンパ球増殖を刺激するそれらの能力に基づいて同定することができる。

30

**【0103】**

本発明は、予防、治療、および/または診断を目的として実施することができる。加えて、本発明は、診断もしくは研究目的などの任意の目的のために、または別の対象への移入による受動免疫のために、抗体を産生するように実施することができる。

**【0104】**

本発明はさらに、この発明の1つまたは複数の組成物を含むキットを提供する。この発明のキットが、当技術分野においてよく知られているように、適切なバッファーおよび/または希釈剤および/または他の溶液、ならびにそのキットを用いるための説明書と共にキットの試薬(例えば、抗体、抗原、核酸)を保持する1つまたは複数の入れ物および/または容器を含み得ることは、当業者によりよく理解されている。そのようなキットはさらに、当技術分野においてよく知られているように、アジュバントおよび/または他の免疫刺激剤もしくは免疫調節剤を含み得る。

40

**【0105】**

本発明の組成物およびキットはまた、他の薬用作用物質、薬学的作用物質、担体、希釈剤、免疫刺激性サイトカインなどを含み得る。そのような剤形を調製する実際の方法は、当業者に知られており、または明らかであろう。

**【0106】**

対象への投与は、当技術分野において知られた任意の経路により得る。非限定的例とし

50

て、投与の経路は、吸入（例えば、経口のおよび／または経鼻的吸入）、経口、頬側（例えば、舌下）、直腸、腔、（気道への投与を含む）局所的、眼内、経皮、非経口による（例えば、筋肉内〔骨格筋への投与〕）、静脈内、動脈内、腹腔内など）、（足蹠への投与を含む）皮下、皮内、胸膜内、脳内、および／またはくも膜下腔内の経路により得る。

【0107】

本発明のエピトープ、ポリペプチド、VLP、およびウイルスベクターは、それ自体で、またはそれをコードする核酸（例えば、DNA）を送達することにより、送達することができる。

【0108】

免疫調節性ケモカインおよびサイトカイン（好ましくは、CTL誘導性サイトカイン）などの免疫調節性化合物を対象へ同時に投与することができる。

10

【0109】

サイトカインは、当技術分野において知られた任意の方法により投与され得る。外因性サイトカインは、対象へ投与され得、または代替として、サイトカインをコードする核酸が、適切なベクターを用いて対象へ送達され得、サイトカインがインビボで産生され得る。特定の実施形態において、ウイルスアジュバントがサイトカインを発現する。

【0110】

本発明の実施形態において、本発明の組成物の複数回用量（例えば、2回、3回、またはそれ以上）を、検出可能な病原性（デングショック症候群／デング出血熱）なしに投与することができる。

20

【0111】

本発明の実施形態において、本発明の多価ワクチンは、免疫干渉を生じず、例えば、提示された全ての抗原に対して、バランスのとれた免疫応答が誘導される。本発明の実施形態において、バランスのとれた応答は、DENV-1、DENV-2、DENV-3、およびDENV-4に対する防御免疫を生じる。

【0112】

本発明の実施形態において、多価ワクチンは、抗デングの母親由来抗体が存在する対象へ投与することができる。

【0113】

本発明が異なる形で具体化することができ、かつ本明細書に示された実施形態に限定されると解釈されるべきではないことは、理解されているはずである。むしろ、これらの実施形態は、この開示が徹底的かつ完全であり、かつ本発明の範囲を当業者に完全に伝えるだろうように、提供される。

30

【0114】

他に規定がない限り、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野における当業者により一般的に理解されているのと同じ意味をもつ。本明細書において本発明の説明に用いられる用語法は、特定の実施形態のみを記載することを目的とし、本発明を限定することを意図するものではない。

【0115】

本明細書で用いられる場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」、または「その(the)」は、1つまたは複数を意味し得る。例えば、「1つの(a)」細胞は、単一細胞または複数の細胞を意味し得る。

40

【0116】

また本明細書で用いられる場合、「および／または」は、関連して列挙された項目の1つまたは複数のありとあらゆる可能な組み合わせ、加えて、離接的接続詞（「または(or)」）において解釈される場合の組み合わせの欠如を指し、かつ包含する。

【0117】

用量の量（例えば、脂肪酸の量）などの測定可能な値を指す時、本明細書で用いられる場合、用語「約」は、特定化された量の $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、またはさらに $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。

50

## 【0118】

本明細書で用いられる場合、移行句「から本質的になること」とは、特許請求の範囲の範囲が、特許請求の範囲に列挙された特定化材料またはステップ、および主張された発明の基本的かつ新規の特徴に実質的には影響しないものを包含すると解釈されるべきであることを意味する。In re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (CCPA 1976) (原文における強調) 参照; MPEP § 2111.03 もまた参照。したがって、この発明の特許請求の範囲において用いられる時の用語「から本質的になること」は、「を含むこと (comprising)」と等価であると解釈されることを意図するものではない。

## 【0119】

本明細書で用いられる場合、用語「核酸」は、cDNA、ゲノムDNA、合成(例えば、化学合成された)DNA、およびRNAとDNAのキメラを含む、RNAおよびDNAの両方を包含する。核酸は二本鎖または一本鎖であり得る。核酸は、ヌクレオチド類似体または誘導体(例えば、イノシン、またはホスホロチオエートヌクレオチド)を用いて合成され得る。そのようなヌクレオチドは、例えば、塩基対形成能力の変化、またはヌクレアーゼに対する抵抗性の増加を有する核酸を調製するために、用いることができる。

## 【0120】

本明細書で用いられる場合、用語「ポリペプチド」は、他に指示がない限り、ペプチドおよび(融合タンパク質を含む)タンパク質の両方を包含する。

## 【0121】

「融合タンパク質」は、天然では一緒に融合しては見出されない2つ(またはそれ以上の)異なるポリペプチドをコードする2つの異種性ヌクレオチド配列またはその断片が、正しい翻訳リーディングフレームで一緒に融合している場合に産生されるポリペプチドである。

## 【0122】

「組換え」核酸、ポリヌクレオチド、またはヌクレオチド配列は、遺伝子工学技術によって作製されるものである。

## 【0123】

「組換え」ポリペプチドは、組換え核酸、ポリペプチド、またはヌクレオチド配列から産生される。

## 【0124】

本明細書で用いられる場合、「単離された」ポリヌクレオチド(例えば、「単離された核酸」または「単離されたヌクレオチド配列」)は、天然に存在する生物体またはウイルスの他のコンポーネントの少なくとも一部、例えば、そのポリヌクレオチドに付随して一般に見出される細胞もしくはウイルスの構造コンポーネントまたは他のポリペプチドもしくは核酸から少なくとも部分的に分離されたポリヌクレオチドを意味する。必ずではないが、任意で、「単離された」ポリヌクレオチドは、出発材料と比較して、より高い濃度(例えば、少なくとも約2倍、3倍、4倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10000倍、またはそれ以上の濃度)で存在する(すなわち、濃縮されている)。それぞれの実施形態において、単離されたポリヌクレオチドは、少なくとも約1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上純粋である。

## 【0125】

「単離された」ポリペプチドは、天然に存在する生物体またはウイルスの他のコンポーネントの少なくとも一部、例えば、そのポリペプチドに付随して一般に見出される細胞もしくはウイルスの構造コンポーネントまたは他のポリペプチドもしくは核酸から少なくとも部分的に分離されているポリペプチドを意味する。必ずではないが、任意で、「単離された」ポリペプチドは、出発材料と比較して、より高い濃度(例えば、少なくとも約2倍、3倍、4倍、10倍、20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10000倍、またはそれ以上の濃度)で存在する(すなわち、濃縮されている)。それぞれの実

10

20

30

40

50

施形態において、単離されたポリペプチドは、少なくとも約 1 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、またはそれ以上純粋である。

【0126】

さらに、「単離された」細胞は、それが天然で、通常、付随している他のコンポーネントから部分的に、または完全に分離されている細胞である。例えば、単離された細胞は、培地中の細胞、および/または薬学的に許容される担体中の細胞であり得る。

【0127】

用語「免疫原」および「抗原」は、本明細書で交換可能に用いられ、細胞性および/または体液性免疫応答が向けられる任意の(ポリペプチドを含む)化合物を意味する。特定の  
10 実施形態において、免疫原または抗原は、デングウイルス感染の影響に対する防御免疫応答を誘導することができる。

【0128】

本明細書で用いられる場合、「有効量」は、治療的および/または有益な効果であり得る所望の効果を生じるのに十分である、本発明のベクター、核酸、エピトープ、ポリペプチド、細胞、粒子、VLP、組成物、または製剤の量を指す。有効量は、対象の年齢、全身状態、処置されることになっている状態の重症度、投与される特定の作用物質、処置の期間、任意の併用処置の性質、用いられる薬学的に許容される担体、および当業者の知識および専門知識の範囲内の同様の因子によって変わる。必要に応じて、任意の個々の場合における「有効量」は、関連のあるテキストおよび文献を参照することにより、ならび  
20 に/または日常の実験を用いることにより、当業者により決定することができる。

【0129】

本明細書で用いられる場合、用語「免疫原性量」または「有効免疫用量」は、他に指示がない限り、非免疫化対象の生来の免疫より大きい(任意で、防御応答であり得る)免疫応答を、処置される対象において誘導するのに十分な量または用量を意味する。任意の特定の状況における免疫原性量または有効免疫用量は、当技術分野において知られた方法を用いて日常的に決定することができる。

【0130】

用語「ワクチン」、「ワクチン接種」、および「免疫化」は当技術分野においてよく理解されており、本明細書で交換可能に用いられる。例えば、ワクチン、ワクチン接種、または免疫化という用語は、免疫原に対する対象の免疫反応(例えば、能動免疫応答をもたらすことによる)、ならびにそれにしたがって、感染に抵抗し、それを克服し、および/またはそれから回復するその対象の能力(すなわち、防御免疫応答)を増加させる方法または組成物であると理解することができる。  
30

【0131】

用語「処置する」、「処置すること」、または「の処置」(およびその文法的語尾変化)とは、対象の状態の重症度が、低下し、少なくとも部分的に改善し、もしくは寛解すること、ならびに/あるいは少なくとも1つの臨床症状のいくらかの軽減、緩和、もしくは減少が達成され、および/または疾患もしくは障害の進行の遅延があることを意味する。それぞれの実施形態において、用語「処置する」、「処置すること」、または「の処置」(およびその文法的語尾変化)は、臨床疾患の他の徴候の有無に関わらず、ウイルス血症の重症度の低下、および/またはウイルス血症の進行の遅延を指す。  
40

【0132】

本明細書で用いられる場合、「処置有効」量は、対象を(本明細書で定義されているように)処置するのに十分である量である。いくらかの利益が対象にもたらされる限り、治療的効果が完全または治癒的である必要はないことを当業者は理解しているだろう。

【0133】

用語「防止する」、「防止すること」、または「の防止」(およびその文法的語尾変化)は、対象における疾患、障害、および/もしくは臨床症状の発生および/もしくは進行の防止および/もしくは遅延、ならびに/または本発明の方法の非存在下で起こるである  
50

うものと比較して、疾患、障害、および/もしくは臨床症状の発生および/もしくは進行の重症度の低下を指す。代表的な実施形態において、用語「防止する」、「防止すること」、または「の防止」（およびその文法的語尾変化）は、臨床疾患の他の徴候の有無に関わらず、対象におけるウイルス血症の発生および/または進行の防止および/または遅延を指す。防止は、完全、例えば、疾患、障害、および/または臨床症状の全部の欠如であり得る。防止はまた、対象における疾患、障害、および/もしくは臨床症状の出現、ならびに/または発生および/もしくは進行の重症度が、本発明の非存在下で起こるであろうものより低いような部分的であり得る。

【0134】

本明細書で用いられる場合、「防止有効」量は、対象において疾患、障害、および/または臨床症状を（本明細書で定義されているように）防止するのに十分である量である。いくらかの利益が対象にもたらされる限り、防止のレベルが完全である必要はないことを当業者は理解しているだろう。

10

【0135】

本発明の方法により Dengue ウイルス感染を処置および/または防止する効力は、当業者によりよく知られているように、対象の症状および/または臨床的パラメータ（例えば、ウイルス血症）の変化により示されるような臨床的向上を検出することにより決定することができる。

【0136】

他に指示がない限り、用語「保護する」、「保護すること」、「保護」、および「防御的」（およびその文法的語尾変化）は、Dengue ウイルスの菌株、遺伝子型、または血清型の1つに対するものであろうと、複数に対するものであろうと、対象において Dengue ウイルス感染を防止する方法と処置する方法の両方を包含する。

20

【0137】

本明細書で用いられる場合、用語「防御」免疫応答または「防御」免疫は、免疫応答が、それが疾患、または感染の任意の他の徴候の発生率および/または重症度および/または持続期間を防止し、または低下させる点において、対象にいくらかの利益を与えることを示す。例えば、代表的な実施形態において、防御免疫応答または防御免疫は、臨床疾患を伴う、伴わないに関わらず、ウイルス血症の低下を生じる。あるいは、防御免疫応答または防御免疫は、既存の疾患の治療的処置において有用であり得る。

30

【0138】

「能動免疫応答」または「能動免疫」は、免疫原との遭遇後の宿主組織および細胞の関与により特徴づけられる。それは、リンパ細胞組織における免疫担当細胞の分化および増殖を含み、それが、抗体の合成、もしくは細胞性反応の発生、または両方をもたらす。Herbert B. Herscovitz, Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation, in IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985)。別の言い方をすれば、能動免疫応答は、感染またはワクチン接種による免疫原への曝露後、宿主により開始される。能動免疫は、受動免疫と対照をなし、受動免疫は、「能動免疫された宿主由来のあらかじめ形成された物質（抗体、トランスファー因子、胸腺移植片、インターロイキン2）の非免疫宿主への移入」を通して獲得される。同上。

40

【0139】

本発明の「対象」には、Dengue ウイルスに感染しやすい任意の動物が挙げられる。そのような対象は、一般的に、哺乳類の対象（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、霊長類などの実験動物）、農業用もしくは商業用動物（例えば、ウシ、ウマ、ヤギ、ロバ、ヒツジなど）、または家庭用動物（例えば、ネコ、イヌ、フェレットなど）である。特定の実施形態において、対象は、霊長類の対象、非ヒト霊長類の対象（例えば、チンパンジー、ヒヒ、サル、ゴリラなど）、またはヒトである。本発明の対象は、Dengue ウイル

50

スによる感染のリスクがあることが知られた、または考えられる対象であり得る。あるいは、本発明による対象にはまた、デングウイルスに感染していること、またはデングウイルス感染についての処置を必要としていることを以前には知られても、もしくは疑われもしていない対象も挙げることができる。

【0140】

対象は、防御免疫応答を誘発するため、またはその対象において抗体の産生を誘発するためなどの任意の目的のために処置され得、その抗体は、収集されて、研究目的もしくは診断目的などの他の目的に、または他の対象に投与して、そこに受動免疫を生じさせるために用いることができる。

【0141】

対象には、新生児、若年、成熟、および老齢の対象を含む任意の年齢の男性および/または女性が挙げられる。ヒト対象に関して、代表的な実施形態において、対象は、乳児（生後約12ヶ月未満、10ヶ月未満、9ヶ月未満、8ヶ月未満、7ヶ月未満、6ヶ月未満、またはそれ未満）、幼児（例えば、少なくとも生後約12ヶ月、18ヶ月、もしくは24ヶ月、および/または約36ヶ月未満、30ヶ月未満、もしくは24ヶ月未満）、または小児（例えば、少なくとも約1歳、2歳、3歳、4歳、もしくは5歳、および/または約14歳未満、12歳未満、10歳未満、8歳未満、7歳未満、6歳未満、5歳未満、もしくは4歳未満）であり得る。本発明の実施形態において、対象は、生後約0ヶ月から3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、15ヶ月、18ヶ月、24ヶ月、30ヶ月、36ヶ月、48ヶ月、もしくは60ヶ月まで、約3ヶ月から6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、15ヶ月、18ヶ月、24ヶ月、30ヶ月、36ヶ月、48ヶ月、もしくは60ヶ月まで、約6ヶ月から9ヶ月、12ヶ月、15ヶ月、18ヶ月、24ヶ月、30ヶ月、36ヶ月、48ヶ月、もしくは60ヶ月まで、約9ヶ月から12ヶ月、15ヶ月、18ヶ月、24ヶ月、30ヶ月、36ヶ月、48ヶ月、もしくは60ヶ月まで、約12ヶ月から18ヶ月、24ヶ月、36ヶ月、48ヶ月、もしくは60ヶ月まで、約18ヶ月から24ヶ月、30ヶ月、36ヶ月、48ヶ月、もしくは60ヶ月まで、または約24ヶ月から30ヶ月、36ヶ月、48ヶ月、もしくは60ヶ月までであるヒト対象である。

【0142】

本発明の実施形態において、対象は、デングウイルスに対する母親由来抗体を有する。

【0143】

本発明の方法を「必要としている対象」は、デングウイルスに感染していることが知られた、もしくは感染しているのではないかと疑われる対象、または感染するリスクがある対象であり得る。

【0144】

本発明のデングウイルスのエピトープ、ポリペプチド、キメラフラビウイルスVLPもしくはキメラフラビウイルス粒子、核酸、ベクター、細胞、または組成物、および薬学的に許容される担体を含む薬学的製剤（例えば、免疫原性製剤）もまた提供され、知られた技術に従って、薬学的担体において、投与のために製剤化することができる。例えば、Remington, The Science And Practice of Pharmacy（最新版）を参照。本発明の実施形態による薬学的組成物の製造において、本発明の組成物は、典型的には、とりわけ、薬学的に許容される担体と混合される。「薬学的に許容される担体」とは、薬学的組成物における他の成分と適合性があり、その上、対象に対して危害(harmful)を加えず、有害(deleterious)でもない担体を意味する。担体は、固体もしくは液体、または両方であり得、好ましくは、本発明の組成物と共に、単位用量製剤、例えば、錠剤として製剤化され、その単位用量製剤は、約0.01重量%または0.5重量%から約95重量%または99重量%までの組成物を含有し得る。薬学的組成物は、薬学によく知られた技術のいずれかにより調製され、その技術には、任意で1つまたは複数の補助的成分を含む、コンポーネントを混合することが挙げられるが、それに限定されない。ある特定の実施形態において、薬学的に許容される担体は、無菌であり、担体を含む薬学的組成物についての規制ガイドラインに従って、ヒト対象への投与に

10

20

30

40

50

適しているとみなされる。

【0145】

さらに、本発明による組成物の塩、担体、賦形剤、または希釈剤などの「薬学的に許容される」コンポーネントは、(i)それが、意図された目的に適さない組成物を与えることなく、本発明の組成物と組み合わせることができる点において、組成物の他の成分と適合性であり、かつ(ii)過度の有害な副作用(例えば、毒性、刺激作用、およびアレルギー応答)なしに、ここに提供されているような対象に用いるのに適しているコンポーネントである。副作用は、それらのリスクが、その組成物によりもたらされる利益より上回る場合、「過度」である。薬学的に許容されるコンポーネントの非限定的例には、リン酸緩衝食塩水、水、油/水型乳濁液、マイクロエマルジョンなどの乳濁液、および様々な型の湿潤剤などの標準薬学的担体のいずれかが挙げられる。

10

【0146】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、1つまたは複数のアジュバントをさらに含み得る。本発明のアジュバントは、アミノ酸配列の形、および/またはアジュバントをコードする核酸の形をとり得る。核酸の形をとる場合、アジュバントは、本発明のポリペプチドもしくは断片もしくはエピトープをコードする核酸の構成要素、および/または本発明のポリペプチドもしくは断片もしくはエピトープをコードする核酸を含む組成物の別個の構成要素であり得る。本発明によれば、アジュバントはまた、アジュバントとして機能するペプチド、タンパク質断片、もしくはタンパク質全体であるアミノ酸配列であり得、および/またはアジュバントは、アジュバントとして機能するペプチド、タンパク質断片、もしくはタンパク質全体をコードする核酸であり得る。本明細書で用いられる場合、「アジュバント」は、対象において免疫応答を増強し、向上させ、または別なふうに調節するために、本発明の組成物と組み合わせることができる任意の免疫調節物質であり得る物質を表す。

20

【0147】

さらなる実施形態において、アジュバントは、免疫刺激性サイトカイン(例えば、GM-CSF、インターロイキン-2、インターロイキン-12、インターフェロン-、インターロイキン-4、腫瘍壊死因子-、インターロイキン-1、造血因子flt3L、CD40L、B7.1共刺激分子およびB7.2共刺激分子が挙げられるが、それらに限定されない)、リン酸緩衝食塩水中、5パーセント(重量/体積)スクアレン(DASF、Parsippany, N.J.)、2.5パーセントPluronic、L121ポリマー(Aldrich Chemical, Milwaukee)、および0.2パーセントポリソルベート(Tween 80, Sigma)で構成されるSYNTEXアジュバント製剤1(SAF-1)であり得るが、それらに限定されない。適切なアジュバントにはまた、水酸化アルミニウムゲル(ミョウバン)、リン酸アルミニウム、またはアルガムリン(algammulin)などのアルミニウム塩が挙げられるが、カルシウム、鉄、もしくは亜鉛の塩でもよく、あるいは、アシル化チロシン、またはアシル化糖、陽イオン性もしくは陰イオン性に誘導体化された多糖、またはポリホスファゼンの不溶性懸濁液であり得る。

30

【0148】

他のアジュバントは当技術分野においてよく知られており、それには、非限定的に、MF59、LT-K63、LT-R72(Pal et al., Vaccine 24(6):766-75(2005))、QS-21、フロイントアジュバント(完全および不完全)、水酸化アルミニウム、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(nor-MDPと呼ばれる、CGP 11637)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(MTP-PEと呼ばれる、CGP 19835A)、およびRIBI(2%スクアレン/Tween 80乳濁液中に、細菌から抽出された3つのコンポーネント、モノホスホリルリピド

40

50

A、トレハロースジミコレート、および細胞壁骨格（MPL + TDM + CWS）を含有する）が挙げられる。

【0149】

追加のアジュバントには、例えば、アルミニウム塩とのモノホスホリルリピドA、好ましくは3-デ-0-アシル化モノホスホリルリピドA（3D-MPL）の組み合わせを挙げることができる。増強されたアジュバント系は、モノホスホリルリピドAとサポニン誘導体の組み合わせ、特に、国際公開第94/00153号に開示されているようなQS21と3D-MPLの組み合わせ、または国際公開第96/33739号に開示されているような、QS21がコレステロールでクエンチされている、より反応源性が低い組成物を含む。水中油型乳濁液においてQS21 3D-MPLおよびトコフェロールを含む特に強力なアジュバント製剤は、国際公開第95/17210号に記載されている。加えて、本発明の核酸組成物は、抗原をコードするヌクレオチド配列、およびCpG配列などのアジュバント機能を提供するヌクレオチド配列を含むことによりアジュバントを含むことができる。そのようなCpG配列またはモチーフは当技術分野においてよく知られている。

10

【0150】

例えば、免疫刺激性サイトカインなどの、本発明と共に用いられるアジュバントは、対象への本発明の組成物の投与の前に、投与と同時に、ならびに/または投与前および/もしくは投与後の2、3時間、数時間、および/もしくは1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、および/もしくは10日以内に投与することができる。

【0151】

さらに、免疫刺激性サイトカインなどのアジュバントの任意の組み合わせは、本発明の免疫原性組成物の投与前、投与後、および/または投与と同時に対象へ併用投与することができる。例えば、免疫刺激性サイトカインの組み合わせは、GM-CSF、インターロイキン-2、インターロイキン-12、インターフェロン-、インターロイキン-4、腫瘍壊死因子-、インターロイキン-1、造血因子flt3L、CD40L、B7.1共刺激分子およびB7.2共刺激分子などの2つ以上の免疫刺激性サイトカインからなり得る。アジュバントまたはアジュバントの組み合わせの有効性は、本明細書に記載されているように、および当技術分野において知られているように、標準手順を用いて、アジュバントまたはアジュバントの組み合わせと共に、またはなしで、対象へのこの発明の組成物の投与に反応して生じた免疫応答を測定することにより決定することができる。

20

30

【0152】

本発明の実施形態において、アジュバントは、例えば、米国特許第7,862,829号に記載されているようにアルファウイルスアジュバントを含む。

【0153】

ブースト用量を、数日間、数週間、数か月間、または数年間の時間経過にわたってさらに投与することができる。慢性感染において、最初の高用量、続いてブースト用量が有利であり得る。

【0154】

本発明の薬学的製剤は、任意で、他の薬用作用物質、薬学的作用物質、安定化剤、バッファー、担体、希釈剤、塩、等張化剤、湿潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエートなどを含むことができる。

40

【0155】

注射について、担体は、典型的には、液体である。投与の他の方法について、担体は、固体または液体のいずれでもよい。吸入投与について、担体は呼吸用であり、典型的には、固体粒子または液体粒子の形をとる。

【0156】

本発明の組成物は、知られた技術に従って、薬学的担体中に、投与のために製剤化することができる。例えば、Remington, The Science And Practice of Pharmacy (9th Ed. 1995)を参照。本発明

50

による薬学的組成物の製造において、VLPは、典型的には、とりわけ、許容される担体と混合される。担体は、固体もしくは液体、または両方であり得、任意で、単位用量製剤、例えば、錠剤として化合物と製剤化される。様々な薬学的に許容される水性担体を用いることができ、例えば、水、緩衝用水、0.9%食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸、発熱物質を含まない水、発熱物質を含まないリン酸緩衝食塩水、静菌水、またはCremonophor EL（登録商標）（BASF、Parsippany、N.J.）などである。これらの組成物は、通常の技術により滅菌することができる。本発明の製剤は、薬学によく知られた技術のいずれかにより調製することができる。

#### 【0157】

薬学的製剤は、そのまま用いるために、または凍結乾燥されて、パッケージングすることができ、凍結乾燥された調製物は、一般的に、投与前に無菌水溶液と混合される。組成物はさらに、単位用量または複数回用量の容器内、例えば、密封アンプルおよびバイアル内に、パッケージングすることができる。

10

#### 【0158】

薬学的製剤は、薬学の通常の技術による当技術分野において知られた任意の方法により、投与のために製剤化することができる。例えば、組成物は、鼻腔内に、吸入（例えば、経口吸入）により、経口的に、頬側に（例えば、舌下に）、直腸性に、経腔的に、局所的に、くも膜下腔内に、眼内に、経皮的に、非経口投与により（例えば、筋肉内〔例えば、骨格筋〕、静脈内、皮下、皮内、胸膜内、脳内、および動脈内、くも膜下腔内）、または局所的に（例えば、気道表面を含む皮膚表面と粘膜表面の両方に）、投与されるように製剤化することができる。

20

#### 【0159】

鼻腔内または吸入の投与について、薬学的製剤は、エアロゾル（この用語は、液体エアロゾルと乾燥粉末エアロゾルの両方を含む）として製剤化することができる。例えば、薬学的製剤は、界面活性剤および噴霧剤と共に微粉化された形で提供することができる。組成物の典型的なパーセンテージは、0.01~20重量%、好ましくは1~10重量%である。界面活性剤は、一般的に、無毒であり、噴霧剤中に溶ける。そのような作用物質の代表は、脂肪族多価アルコールまたはその環状無水物との、カプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリン酸（olesteric acid）、およびオレイン酸などの6個から22個までの炭素原子を含有する脂肪酸のエステルまたは部分的エステルである。混合された、または天然のグリセリドなどの混合されたエステルが用いられ得る。界面活性剤は、組成物の0.1~20重量%、好ましくは0.25~5重量%である。組成物のその残りは通常、噴霧剤である。鼻腔内送達用のレシチンのように、担体もまた、必要に応じて、含むことができる。当業者に知られているように、圧力駆動型エアロゾル噴霧器または超音波噴霧器を用いるなどの任意の適切な手段によって液体粒子のエアロゾルを生じさせることができる。例えば、米国特許第4,501,729号参照。同様に、固体粒子のエアロゾルを、薬学分野で知られた技術により、任意の固体粒子薬物エアロゾル発生装置で生じさせることができる。鼻腔内投与はまた、鼻腔表面への液滴投与によることができる。

30

#### 【0160】

注射製剤は、液体の溶液もしくは懸濁液、注射前の液体中の溶解もしくは懸濁に適した固形として、または乳濁液としてのいずれかの通常の形で調製することができる。あるいは、全身の様式よりむしろ局所の様式に、例えば、デポーまたは徐放性製剤において、薬学的製剤を投与することができる。

40

#### 【0161】

即時的注射溶液および懸濁液は、前に記載された種類の無菌粉末、顆粒、および錠剤から調製することができる。例えば、密封容器内の単位剤形での本発明の注射可能な安定な無菌製剤を提供することができる。製剤は、凍結乾燥物の形で提供することができ、その凍結乾燥物を、対象への注射に適した液体組成物を形成するように、適切な薬学的に許容される担体で復元することができる。単位剤形は、約1μgから約10グラムまでの製剤

50

であり得る。製剤が、実質的に不水溶性である場合、薬学的に許容されている十分な量の乳化剤が、水性担体において製剤を乳化するのに十分な量で含まれ得る。1つのそのような有用な乳化剤はホスファチジルコリンである。

【0162】

経口投与に適した薬学的製剤は、カプセル剤、カシェ剤、ロゼンジ、もしくは錠剤などの別々の単位で、粉末もしくは顆粒として、水性もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁液として、または水中油型もしくは油中水型乳濁液として提供することができる。経口送達は、動物の腸における消化酵素による分解に耐える能力がある担体へ本発明の化合物を複合体化させることにより実施することができる。そのような担体の例には、当技術分野において知られているように、プラスチックのカプセル剤または錠剤が挙げられる。そのような製剤は、そのタンパク質と適切な担体（上で言及されているように1つまたは複数の補助的成分を含有してもよい）を会合させるステップを含む、薬学の任意の適切な方法により調製される。一般的に、薬学的製剤は、化合物を液体担体もしくは微粉化された固体担体、または両方と均一かつ密接に混合し、その後、必要になれば、生じた混合物を成形することにより調製される。例えば、錠剤は、任意で1つまたは複数の補助的成分と共に、粉末または顆粒を圧縮または成型することにより調製することができる。圧縮化錠剤は、適切な機械において、任意で結合剤、潤滑剤、不活性な希釈剤、および/または表面活性剤/分散剤と混合された粉末または顆粒などの自由流動性の形をとる製剤を圧縮することにより調製される。成型化錠剤は、適切な機械において、不活性な液体結合剤で湿った粉末タンパク質を成型することにより作製される。

10

20

【0163】

頬側（舌下）投与に適した薬学的製剤には、香味つけた基剤、通常にはスクロース、およびアラビアゴムまたはトラガカントゴム中に化合物を含むロゼンジ、ならびにゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアラビアゴムなどの不活性な基剤中のトローチ剤が挙げられる。

【0164】

非経口投与に適した薬学的製剤は、無菌水性および非水性注射液を含み得、その調製物は、好ましくは、意図されたレシピエントの血液と等張である。これらの調製物は、抗酸化剤、バッファー、静菌剤、および（組成物を、意図されたレシピエントの血液と等張にする）溶質を含有することができる。水性および非水性の無菌の懸濁液、溶液、および乳濁液は、懸濁剤および増粘剤を含むことができる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、水、アルコール性/水性溶液、食塩水および緩衝媒体を含む、乳濁液または懸濁液が挙げられる。非経口媒介物には、塩化ナトリウム溶液、リンゲル液デキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、または固定油が挙げられる。静脈内媒介物には、流動性栄養補充液、電解質補充液（例えば、リンゲル液デキストロースに基づいたものなど）などが挙げられる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤、および不活性ガスなどの保存剤および他の添加剤もまた、存在し得る。

30

【0165】

直腸投与に適した薬学的製剤は、任意で、単位用量坐剤として提供される。これらは、活性物質を、例えば、カカオバターなどの1つまたは複数の通常の固体担体と混合し、その後、生じた混合物を成形することにより調製することができる。

40

【0166】

皮膚への局所投与に適した薬学的製剤は、好ましくは、軟膏、クリーム、ローション、ペースト、ゲル、スプレー、エアロゾル、またはオイルの形をとる。用いることができる担体には、石油ゼリー、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコール、経皮吸収促進剤、およびそれらの2つ以上の組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。いくつかの実施形態において、例えば、局所送達は、本発明の薬学的製剤を、皮膚を通過する能力がある親油性試薬（例えば、DMSO）と混合することにより実施することができる

50

。

## 【0167】

経皮投与に適した薬学的製剤は、対象の表皮と密接に接触して、長期間、留まるのに適した別々のパッチの形をとり得る。経皮投与に適した製剤はまた、イオン泳動により送達することができ（例えば、Pharmaceutical Research 3:318 (1986) 参照）、典型的には、化合物の緩衝水溶液の形をとる。適切な製剤は、クエン酸バッファーもしくはビス/トリスバッファー（pH 6）、またはエタノール/水を含むことができ、0.1 Mから0.2 Mまでの活性成分を含有することができる。

## 【0168】

本発明の実施形態において、この発明のウイルス粒子の用量は、約 $10^3$ ～約 $10^8$ のプラーク形成単位/フォーカス形成単位（PFU/FFU）の範囲であり得る。この発明の実施形態において、この発明のVLPの用量は、約500マイクログラム～約5ミリグラムの範囲であり得る。この発明の実施形態において、この発明のタンパク質の用量は、約 $10^0$ ～約 $10^4$ マイクログラム+/-アジュバントの範囲であり得る。

10

## 【0169】

さらに、組成物は、リポソーム製剤として製剤化することができる。用いられる脂質層は、任意の便利な組成であり得、コレステロールを含有することも、またはコレステロールを含まないこともいずれでもあり得る。生成されるリポソームは、例えば、標準超音波処理およびホモジナイゼーション技術の使用によって、サイズを減少させることができる。

20

。

## 【0170】

リポソーム製剤は、水などの薬学的に許容される担体で復元されて、リポソーム懸濁液を再生することができる凍結乾燥物を生じるように、凍結乾燥することができる。

## 【0171】

本発明の免疫原性組成物は、任意で、無菌であり得、さらに、密閉された病原体不透過性容器内で提供することができる。

## 【実施例】

## 【0172】

## [実施例1]

デング3とデング4の間の複雑な四次血清型特異的中和抗体エピトープの移植が、ポリクローナル中和応答の決定基を明らかにする

30

デングウイルス（DENV）は、世界中で最も重大なヒトアルボウイルス疾患であり、毎年、3億人以上の感染者がいる。しかしながら、DENV感染に対するヒト免疫応答の決定基はほとんど不明のままである。したがって、本発明者らは、ヒトにおけるDENV感染に対する抗体（Ab）応答を特徴づけるためのツールを開発することに着手した。逆遺伝学を用いて、本発明者らは、Ab-ウイルス相互作用を研究することを可能にする全ての4つのDENV血清型についての感染性クローン（IC）を開発した。モノクローナルAb（mAb）のパネルの特徴づけにより、DENV3の強い型特異的中和Abが同定された。構造情報に基づくアプローチを用いて、中和のエスケープをもたらす突然変異を含むエンベロープ（E）タンパク質ドメインI/II（EDI/II）ヒンジ領域の12

40

領域を同定し、ヒトにおけるこのエピトープのポリクローナル免疫応答への寄与を評価するために、DENV4からDENV3へ移植した（rDENV3/4）。興味深いことに、このrDENV3/4は、DENV3血清に対して抵抗性になると同時に、ヒトDENV4免疫血清による中和に対する完全な感受性を獲得し、このEDI/IIヒンジ領域が、型特異的中和応答の主要な決定基を含有することを示している。DENV4への相互移植を行った時、mAb結合は、保持されず、中和プロファイルの有意なシフトはなく、レシピエントDENV血清型における隣接残基が、ビリオン表面上のエピトープ提示において役割を果たすことを示している。DENV3からDENV4への5個のアミノ酸残基の追加は、mAb結合および中和を回復させることができたが、ポリクローナル血清中和はほとんど変化しないままであった。最後に、本発明者らは、複数のE二量体に及ぶ残基

50

を含む複雑な四次エピトープをDENV4へ移動させた(rDENV4/3)。このDENV4/3は、生存可能であり、高い感染力価へと成長し、DENV3免疫血清に対する感受性を示し、同時に、DENV4に対する中和応答は、ほとんど変化しないままであった。これらの結果は、合理的に設計されたDENVワクチンプラットフォームの未来開発を導くことができる型特異的中和応答の決定基への洞察を与えている。

#### 【0173】

##### 「実施例2」

デング3およびデング4の両方の型特異的中和決定基を捕獲する組換えデング4ウイルスの開発および特徴づけ

組換えDENV4作製のための逆遺伝学プラットフォームの開発

本発明者らは、組換えDENV3(rDENV3)の産生のための逆遺伝学系の作製および特徴づけを前に記載している(図1、パネルA)。同様の技術を利用して、本発明者らは、1989年にスリランカで単離され、かつジェノグループ(genogroup)Iに属するDENV4の臨床分離株についてのcDNA感染性クローン(IC)系を開発している。大腸菌における細菌プラスミド増幅中の不安定性および毒性を回避するために、DENV4ゲノムを4個の異なる断片へサブクロニングした(図1、パネルA)。DENV4ゲノムにおけるヌクレオチド(NT)位置3216(Pf1MI;認識配列:CCAAACAGTGG、配列番号7)、位置5482(DraIII;CACCAAGGTG)、および位置8855(Pf1MI;CCAGATTTTG、配列番号8)での天然に存在するクラスII制限エンドヌクレアーゼ部位を利用して、ゲノムcDNAを分割した。さらに、その細菌ベクター内で、かつT7プロモーター配列の上流のEcoRV部位を用いて、ゲノムの5'末端を生じさせ、一方、ベクターにおけるBsmBI部位を3'ゲノム末端のために用いた(図1、パネルA)。ゲノムcDNA断片を含有するプラスミドの細菌増幅後、プラスミドを、適切な制限エンドヌクレアーゼで消化し、アガロースゲル電気泳動により精製し、T4DNAリガーゼでライゲーションし、5'キャップ類似体を含むT7RNAポリメラーゼで転写した。その後、インビトロで転写されたRNAを、ペロ-81細胞またはBHK-21細胞のいずれかへ電気穿孔した。細胞を4~6日間、培養し、その時点で上清を収集し、遠心分離により清澄化し、さらに4日間、C6/36(ヒトスジシマカ(Aedes albopictus))細胞上へ継代した。再び、上清を収集し、清澄化し、作業用ウイルスストックとして用いるために力価測定した。rDENV4は、親の天然分離株の同一の表現型性質(成長速度、ピーク感染力価、および感染巣形態/サイズ)を示した。

#### 【0174】

型特異的中和DENV3 mAbエピトープのDENV4への移植

前の研究は、DENV3に特異的な、強く型特異的なヒトモノクローナル抗体(hmAb)(5J7)を同定した。しかしながら、これらの研究は、このhmAbからのDENV3中和のエスケープをもたらす単一の点突然変異を同定しただけだった。このhmAbエピトープをさらに特徴づけるために、本発明者らは、本発明者らの新規の逆遺伝学プラットフォームを用いて、このエピトープを含むアミノ酸(AA)残基をDENV3からDENV4へ移植しようとした。公開されたエスケープ突然変異と未公開のエスケープ突然変異の両方をガイドとして用いて、エンペロブドメインI/II(EDI/II)ヒンジ領域を含む約12オングストローム周径を、DENV3Eタンパク質結晶構造上に、抗体エピトープ:パラトープ結合領域のフットプリントに近づくように重ねた。DENV3とDENV4の間のAAおよびNTアラインメント後、血清型間バリエーションAAを同定し、DENV3からDENV4への移植用を選択した。DENV4ICにおけるNT配列を、DENV3に適合するAA変化を促進するように改変し、これらの変化を捕獲するサブゲノムcDNAを合成した(BioBasic;Amherst, NY)。rDENVを上記のように作製し、回収されたウイルスを表現型特徴づけのために用いた。エピトープ移植の成功の可能性を最大限にするために、3個の異なるrDENVを作製し、それぞれが、連続的追加のDENV3残基を含有し、したがって、より大きい理論上のエピ

10

20

30

40

50

トープフットプリントを移植する。これらの r D E N V は、D E N V 4 M 1 2、D E N V 4 M 1 4、および D E N V 4 M 1 6 と名付けられており、増加性サイズの D E N V 3 配列がそれぞれ、移植されている（図 1、パネル B ~ C）。注目すべきことには、D E N V 4 M 1 6 への D E N V 3 移植は、5 J 7 の仮説上の複雑な四次エピトープを含み、本発明者らの知る限りでは、この手のエピトープが初めて、異なるウイルス間で移植されていることを表している。

#### 【 0 1 7 5 】

r D E N V 4 / 3 ウイルスは生存可能であり、インビトロで明確な適応度特性を示す r D E N V 4 / 3 ウイルス（D E N V 4 M 1 2、M 1 4、および M 1 6）の 3 つ全ては、エレクトロポレーションおよびその後の C 6 / 3 6 細胞上での継代後、回収に成功した。C 6 / 3 6 細胞からの（およびベロ - 8 1 細胞上での病巣形成アッセイにより測定された）ピーク感染力価は、親の W T D E N V 3 および D E N V 4 I C のそれに匹敵することが見出された（図 2、パネル A）。D E N V 4 M 1 2 および M 1 4 は、W T D E N V 3 のと類似したピーク力価を示し、それらの全部が、この系において W T D E N V 4 のそれよりおよそ  $1 \log_{10}$  の低下である。しかしながら、D E N V 4 M 1 6 は、より減弱した成長表現型を示し、ピーク力価は、約  $2 \times 10^6$  f f u / m l （W T D E N V 3 の約 50 分の 1、W T D E N V 4 の約 300 分の 1）に達した（図 2、パネル A）。それに応じて、感染巣サイズもまた、r D E N V において、それらの W T 親と比較して小さかった。D E N V 4 M 1 2 および M 1 4 病巣は、W T より小さいが、それでも、D E N V 4 M 1 6 より有意に大きく、D E N V 4 M 1 6 は、ベロ - 8 1 細胞上に非常に小さいピンポイント病巣を形成している（図 2、パネル B）。

#### 【 0 1 7 6 】

同様の適応度分析を、C 6 / 3 6 蚊細胞上で行った。多段階成長曲線（M O I = 0 . 0 1）を、D E N V 4 M 1 2、M 1 4、M 1 6、ならびに親 W T D E N V 3 および親 W T D E N V 4 上で実施した（図 3、パネル A）。一般的に、初期時点（< 9 6 接種後時間（h p i））において有意な適応度欠損は見られないが、D E N V 4 M 1 4 は、1 4 4 h p i におけるバーストを示す前に、9 6 h p i および 1 2 0 h p i において W T より遅れた。さらに、D E N V 4 M 1 6 は、1 2 0 h p i 以降、成長速度の減少を示し、感染力価は、他の株より約  $2 \log_{10}$  の低下であった。各場合において、細胞の健康がこの減弱の一因となっている可能性があり、それゆえに、さらなる調査が必要とされる。しかしながら、これらのデータは、感染における少なくとも初期時点において、r D E N V が、W T D E N V と比較して、節足動物細胞において有意な成長減弱を示さないことを示している。興味深いことに、ベロ細胞とは対照的に、D E N V 4 M 1 2、M 1 4、M 1 6 の感染巣（図 3、パネル B）は、W T D E N V 3 もしくは 4 と比較して、またはお互いに、サイズまたは形態の実質的違いを示していない。これは、成長曲線データとよく相関しており、r D E N V 減弱の決定因子が、一般的に、ベロ - 8 1 細胞および / または哺乳類細胞に特異的な細胞型であり得ることを示唆している。これらのデータは、D E N V 3 の移植された領域を含有する r D E N V 4 ウイルスが、生存可能であり、かつさらなる特徴づけのための適切な成長特性を示すことを示している。

#### 【 0 1 7 7 】

r D E N V 4 / 3 は h m A b 5 J 7 に対する様々な程度の反応性を示す 3 つの r D E N V における、h m A b 5 J 7 に対するエピトープが D E N V 3 から D E N V 4 へ移植されたレベルを決定するためにアッセイを実施した。D E N V 3 特異的 h m A b 5 J 7 の、W T ウイルスおよび r D E N V ウイルスの両方との結合を評価するために E L I S A を行った。これらにより、5 J 7 は W T D E N V 3 と結合したが、W T D E N V 4 と結合せず、前のデータと一致することが明らかにされた。興味深いことに、5 J 7 は、D E N V 4 M 1 2 を全く結合することができなかったが、D E N V 4 M 1 4 および M 1 6 の両方は、W T D E N V 3 のレベルに近く、またはそれを超えるレベルで 5 J 7 結合を促進するのに D E N V 3 エピトープを十分、提示した（図 4、パネル A）。これらのデータは、わずか 4 個の A A （D E N V 4 M 1 2 と M 1 4 の間での移植さ

れたAAにおける違い)が、5J7のDENV4 M14との結合を与えるのに関与したことを示している。これらの結合研究への推論として、ウイルス中和アッセイを、5J7を用いて実施し、rDENV4パネルの中和に対する感受性を評価した。ELISA結合データと一致して、DENV4 M12は、5J7で中和され得ず、一方、DENV4 M14およびM16の両方は、5J7により、WT DENV3のAb濃度に匹敵するAb濃度で中和された(図4BおよびC)。意義深いことには、これらの結果は、高度に異なる(成熟対未成熟)ウイルス粒子について中和感受性を獲得していると考えられた2つの異なる細胞株(ベロ-81、およびDC-SIGNを発現するU937)において、(DENV4 M14について)一貫性があり、これらのrDENVの粒子成熟状態が5J7中和に影響を及ぼし得ないことを示している。

10

## 【0178】

rDENV4/3はポリクローナル血清中和に対する二価感受性を有する

本発明者らのrDENV4/3パネルの、ポリクローナル抗体中和に対する感受性を評価するために、一次DENV感染後の回復期患者から収集されたドナー血清を、病巣低下アッセイ(ベロ-81)およびフローサイトメトリに基づいたアッセイ(U937-DC-SIGN)に用いた。ELISA結合アッセイおよび5J7 hmAb中和アッセイと同様に、DENV4 M12は、ベロ細胞においてDENV3特異的血清による中和に対する感受性の増加を示さなかった(図5、パネルD)。しかしながら、DENV4 M14は、ベロ細胞において、WT DENV3のとほとんど同一で、かつWT DENV4のより有意に高い中和表現型を示し(図5、パネルA~C)、このrDENV4/3ウイルスが、ヒトにおける自然DENV3感染により生じたポリクローナル抗体応答による中和に対する感受性を獲得したことを示している。さらに、この表現型は、U937-DC-SIGN細胞において確認され、DENV4 M16に広げられ(図5、パネルE~G)、その場合、どちらのrDENVについても、DENV3抗血清によるポリクローナル中和は、WT DENV3に匹敵したが、WT DENV4は、最低の血清希釈度(1:20)においてさえも中和されなかった。ベロ細胞におけるDENV4 M16の小さい病巣表現型のために、この細胞型における中和アッセイは技術的に困難であり、それゆえに、このrDENVについての中和データは、U937-DC-SIGNに制限され、そのフローサイトメトリに基づいたアッセイは、減弱したウイルスにおいてさえも容易に実施されるからである。まとめると、これらのデータは、DENV4 M14およびM16は、DENV3型特異的中和のポリクローナル決定基を捕獲しており、中和感受性において二価を示すことを示している。

20

30

## 【0179】

本発明者らのrDENVのDENV3ポリクローナル中和に対する感受性の獲得に加えて、本発明者らは、DENV4 M12、M14、およびM16のDENV4中和感受性の保持および/または喪失を決定することに関心をもった。この目的を達成するために、回復期の一次DENV4患者から収集された血清を用いて、ベロ(図6、パネルA)およびU937-DC-SIGN(図6、パネルB~D)において中和アッセイを実施した。DENV4 M12は、ベロ細胞においてWT DENV4よりわずかに低い中和価を示したが(図6、パネルA)、DENV4 M14およびM16は、どちらの細胞型においても、WT DENV4と等しく、またはそれを超える中和価を有した(図6、パネルA~D)。この重要な所見は、DENV3およびDENV4についての型特異的中和の決定基が、E糖タンパク質上の別々のエレメントであること、ならびにその2つの決定基AA配列が、お互いを変化させることなく、組み合わせられ得ることを示唆している。それゆえに、DENV4 M14およびM16は、両方のワクチン診断学のための重要な試薬として、または新しく、および/もしくは向上したワクチン候補の開発を導くために利用される可能性がある。

40

## 【0180】

rDENV4/3ポリクローナル中和感受性は特異的である

rDENV4/3ウイルスのパネルが、非特異的様式での中和に対するそれらの感受性

50

を増加させるように改変されている可能性を排除するために、回復期のヒト患者から収集された一次 DENV 1 および DENV 2 血清での中和アッセイを実施した。一次 DENV 1 血清は、高レベルで中和された WT DENV 1 とは正反対に、ベロ細胞において DENV 4 M12 または M14 のいずれも全く中和できなかった (図 7、パネル A ~ B)。さらに、DENV 2 血清もまた、DENV 4 M14 を中和できなかったが、試験された 1 つの試料は、WT DENV 2 のよりはるかに低いレベルではあるが、DENV 4 M12 を中和した (図 7、パネル C ~ D)。まとめると、これらの結果は、DENV 4 背景における DENV 3 中和感受性の獲得は DENV 3 特異的であり、rDENV パネルをヘテロタイプの血清による中和に対して感受性をより高くさせる全体的な構造変化の結果ではないことを示している。

【0181】

[実施例 3]

デング 1 およびデング 2 の両方の型特異的中和決定基を捕獲する組換えデング 2 ウイルスの開発および特徴づけ

組換え DENV 1 および DENV 2 作製のための逆遺伝学プラットフォームの開発

本発明者らは、組換え DENV 3 (rDENV 3) の産生のための逆遺伝学系の作製および特徴づけを前に記載している。同様の技術を利用して、本発明者らは、2007 年のニカラグアにおけるエピデミックから単離された DENV 2 の臨床分離株 (V1210) と共に、DENV 1 Western Pacific 1974 (West Pac 74) についての cDNA 感染性クローン (IC) 系を開発している。大腸菌における細菌プラスミド増幅中の不安定性および毒性を回避するために、両方のゲノムを 4 個の異なる断片へサブクローニングした (図 8、パネル A)。DENV 1 ゲノムにおけるヌクレオチド (NT) 位置 2052 (PflMI; 認識配列: CCACCTTTTG G、配列番号 9)、4215 (PflMI; CCACTAGCTGG、配列番号 10)、および 8563 (PflMI; CCAAACCATGG、配列番号 11) での天然に存在するクラス II 制限エンドヌクレアーゼ部位を利用して、ゲノム cDNA を分割した。さらに、その細菌ベクター内で、かつ T7 プロモーター配列の上流の EcoRV 部位を用いて、ゲノムの 5' 末端を生じさせ、一方、ベクターにおける SapI 部位を 3' ゲノム末端のために用いた (図 8、パネル A)。DENV 2 について、第 1 のゲノム分割は、位置 2340 (断片 A とベクターの間の DraIII; 認識配列: CACTGTGTG) で生じた。ゲノム配列を保存するために、DraIII 部位 (CACnnnGTG) を、A 断片の 3' 末端に利用し、一方、AlwNI (CAGnnnCTG) 部位を、B 断片の 5' 末端に用いた。認識部位のベクター領域 (かつ DENV ゲノム配列ではない) におけるエンドヌクレアーゼ認識配列を突然変異させることにより、これらの 2 つの制限エンドヌクレアーゼ消化物のライゲーションされた生成物は、消化を促進するための DENV ゲノムへの突然変異の導入なしに、天然 DENV 2 ゲノム配列を保存する。NT 4662 (DraIII; CACGTGGTG)、および 7414 (DraIII; CACACTGTG) における追加のゲノム接合部を利用して、ゲノム cDNA を分割した。さらに、その細菌ベクター内で、かつ T7 プロモーター配列の上流の SpeI 部位を用いて、ゲノムの 5' 末端を生じさせ、一方、ベクターにおける EciI 部位を 3' ゲノム末端のために用いた (図 8、パネル A)。ゲノム cDNA 断片を含有するプラスミドの細菌増幅後、プラスミドを、適切な制限エンドヌクレアーゼで消化し、アガロースゲル電気泳動により精製し、T4 DNA リガーゼでライゲーションし、5' キャップ類似体を含有する T7 RNA ポリメラーゼで転写した。その後、インビトロで転写された RNA を、ベロ-81 細胞または BHK-21 細胞のいずれかへ電気穿孔した。細胞を 4 ~ 6 日間、培養し、その時点で上清を収集し、遠心分離により清澄化し、さらに 4 日間、C6/36 (ヒトスジシマカ) 細胞上へ継代した。再び、上清を収集し、清澄化し、作業用ウイルスストックとして用いるために力価測定した。rDENV 1 および rDENV 2 は、親の天然分離株の同一の表現型性質 (成長速度、ピーク感染力価、および感染巣形態 / サイズ) を示した (データ未呈示)。

【0182】

10

20

30

40

50

### 強中和性 DENV 1 mAb エピトープの DENV 2 IC への移植

前の研究は、DENV 1 に特異的な、強く型特異的なヒトモノクローナル抗体 (hmAb) (1F4) を同定した。DENV 1 と結合したこの hmAb の結晶構造、および同定された接触アミノ酸 (AA) 残基を利用して、本発明者らは、本発明者らの新規の逆遺伝学プラットフォームを用いて、このエピトープを含む AA 残基を DENV 1 から DENV 2 へ移植しようとした。DENV 1 と DENV 2 の間の AA および NT アラインメント後、血清型間バリエーション AA を同定し、DENV 1 から DENV 2 への移植のために選択した。DENV 2 IC における NT 配列を、DENV 1 に適合する AA 変化を促進するように改変し (図 8、パネル B ~ C)、これらの変化を捕獲するサブゲノム cDNA を合成した (BioBasic; Amherst, NY)。rDENV を上記のように作製し、回収されたウイルスを表現型特徴づけに用いた。この rDENV は、DENV 2 - 1F4 E と名付けられている (図 8、パネル B ~ C)。

10

#### 【0183】

rDENV 2 / 1 ウイルスは、生存可能であり、インビトロで明確な適応度特性を示す。rDENV 2 / 1 は、エレクトロポレーションおよびその後の C6 / 36 細胞上での継代後、回収に成功した。C6 / 36 細胞からのピーク感染力価が測定され、C6 / 36 細胞における親の WT DENV 1 および DENV 2 IC のそれに匹敵することを見出されたが (図 9、パネル B)、ベロ細胞において非常に減弱していた (およそ  $3 \log_{10}$ ) (図 9、パネル A)。適応度分析を、C6 / 36 蚊細胞上で、多段階成長曲線 (MOI = 0.01) を用いて行った (図 9、パネル C)。一般的に、初期時点 (< 96 接種後時間 (hpi)) では、有意な適応度欠損は見られなかった。DENV 2 - 1F4 E は、96 hpi における力価の降下を示したが、これは、120 hpi 以降、力価は WT DENV 1 および 2 と等価であったため、その場限りの遅れであった (図 9、パネル C)。細胞の健康が、このその場限りの減弱した時点において影響を及ぼしている可能性があり、それゆえに、さらなる調査が必要とされる。しかしながら、これらのデータは、DENV 2 - 1F4 E が、WT DENV 1 および 2 と比較して、節足動物細胞において有意な成長減弱を示さないことを示している。成長速度データに応じて、DENV 2 - 1F4 E (図 9、パネル D) は、WT DENV 1 および 2 と比較して、感染巣のサイズまたは形態の実質的違いを示していない。これらのデータは、DENV 1 の移植された領域を含有する rDENV 2 - 1F4 E が生存可能であり、さらなる特徴づけのための適切な成長特性を示すことを示している。

20

30

#### 【0184】

hmAb 1F4 は rDENV 2 / 1 と結合する

DENV 2 - 1F4 E における、hmAb 1F4 に対するエピトープが DENV 1 から DENV 2 へ移植されたレベルを決定するためにアッセイを実施した。DENV 1 特異的 hmAb 1F4 の、WT ウイルスおよび rDENV ウイルスの両方との結合を評価するために ELISA を行った。これらにより、1F4 は WT DENV 1 と結合したが、WT DENV 2 と結合せず、前のデータと一致することが明らかにされた。興味深いことに、1F4 は、WT DENV 1 に匹敵するレベルで DENV 2 - 1F4 E と結合した (図 10、パネル A)。これらのデータは、DENV 1 と結合した 1F4 の結晶構造において同定された残基が、DENV 1 と DENV 2 の間で、モノクローナル Ab 結合を移植するのに十分であることを示している。これらの結合研究への推論として、ウイルス中和アッセイを、1F4 および DENV 2 - 1F4 E を用いて実施した。ELISA 結合データと一致して、DENV 2 - 1F4 E は、WT DENV 1 の Ab 濃度に匹敵する Ab 濃度での 1F4 により中和された (図 10、パネル B ~ C)。意義深いことには、これらの結果は、2 つの異なる細胞株 (C6 / 36、および DC - SIGN を発現する U937) において、一貫性がある。

40

#### 【0185】

rDENV 2 / 1 はポリクローナル血清中和に対する二価感受性を有する

本発明者らの rDENV 2 / 1 ウイルスの、ポリクローナル抗体中和に対する感受性を

50

評価するために、一次DENV1感染後の回復期患者から収集されたドナー血清を、フローサイトメトリに基づいた(U937-DC-SIGN)アッセイに用いた。ペロ細胞におけるDENV2-1F4Eの小さい病巣表現型のために、この細胞型における中和アッセイは技術的に困難であり、それゆえに、このrDENV1についての中和データは、U937-DC-SIGNに制限され、そのフローサイトメトリに基づいたアッセイは、減弱したウイルスにおいてさえも容易に実施されるからである。ELISA結合アッセイおよび1F4-hmAb中和アッセイと同様に、DENV2-1F4Eは、U937-DC-SIGN細胞において、WT DENV1とほぼ同一で、かつWT DENV2より有意に高い、中和表現型を示し(図11、パネルA~B)、このrDENV2/1ウイルスが、ヒトにおける自然DENV1感染により生じたポリクローナル抗体応答による中和に対する感受性を獲得していることを示している。hmAb 1F4データと共にこれらのデータは、DENV2-1F4EがDENV1型特異的中和のポリクローナル決定基を獲得し、中和感受性において二価性を示すことを示している。

10

#### 【0186】

本発明者らのrDENVのDENV1ポリクローナル中和に対する感受性の獲得に加えて、本発明者らは、DENV2-1F4EのDENV2中和感受性の保持および/または喪失を決定することに関心をもった。この目的を達成するために、回復期の一次DENV2患者から収集された血清を用いて、U937-DC-SIGNにおいて中和アッセイを実施した(図11、パネルC~E)。意義深いことには、DENV2-1F4Eは、全ての場合において、WT DENV2と等しく、またはそれを越える中和価を有した。この所見は、DENV1およびDENV2についての型特異的中和の決定基が、E糖タンパク質上の別々のエレメントであること、ならびにその2つの決定基AA配列が、お互いを変化させることなく、組み合わせられ得ることを示唆している。それゆえに、DENV2-1F4Eは、両方のワクチン診断学のための重要な試薬として、または新しく、および/もしくは向上したワクチン候補の開発を導くために利用される可能性がある。

20

#### 【0187】

rDENV2/1は、DENV発病のマウスモデルにおいて減弱する

本発明者らのキメラrDENVの減弱のレベルを評価するために、本発明者らは、DENV疾患の免疫不全マウスモデルにおいて、DENV2-1F4Eの死亡率をその親のWT DENV1およびDENV1と比較した。インターフェロン $\gamma$ 受容体およびインターフェロン $\alpha$ 受容体の両方が欠損したC57BL/6に、 $3.3 \times 10^6$  f f u (C6/36力価)のDENV1、DENV2、またはDENV2-1F4Eを腹腔内に接種した。マウスの体重を計り、研究の終了まで56dpiの間、マウスをモニターした。図12に示されているように、WT DENV1およびDENV2を接種されたマウスは、80%より高い死亡率を示したが、等価用量のDENV2-1F4Eを受けたマウスのいずれも、感染に屈せず( $p = 0.0076$ )、このrDENV1についての高程度の減弱を示している。これらのデータは、二価ウイルスを作製するためのDENVのキメラ化が、ワクチン開発に適し得るインビボ弱毒のレベルを導入することを示している。

30

#### 【0188】

##### [実施例4]

血清型2中和ヒト抗体応答をマッピングするためのキメラ組換えデングウイルスの使用  
デングウイルス(DENV; DV)は、世界中で最も重大なヒトアルボウイルス病原体であり、毎年、推定3億9千万人の感染者と9千6百万人の症候性症例がある。世界人口のほぼ半分が、疾患のリスクがあり、まだなお、デング疾患を処置または防止する認可されたワクチンまたは治療用物質がない。デング感染は、デング熱(激しい骨および関節の痛みによって特徴づけられる自己限定的発熱性疾患)、または不適切な凝固、血管漏出、および最も重篤な例においては、典型的には致死性である多臓器不全によって強調されるデング出血熱およびデングショック症候群として知られたより重篤な形として現れ得る。デングウイルスは、4つの異なる血清型として存在し、1つの血清型による感染は、その後の他のものによる感染からの保護を与えない。それどころか、単一のデング血清型に対

40

50

する免疫は、別の血清型による感染で重篤な疾患のリスクの増加と関連しており、ワクチン設計にとって、困惑させる因子となっている。伝統的なワクチン接種戦略は、各血清型に対して等価の免疫応答を誘発するために4つの異なるウイルスのカクテルを利用しているが、これまで、相変わらずこの目標を達成することには至っていない。それゆえに、デング感染に対する複雑な免疫応答の我々の理解を助けるための診断ツール、および新しいワクチン設計を導き、かつ作製するための新しいテクノロジーの切羽詰まった必要性がある。この発明報告は、複数の血清型に対するヒト抗体応答を特徴づけるために、およびまた、単一のウイルス接種菌液の状況内で、複数の血清型に対する免疫応答を誘発する能力がある新しい多価ワクチン候補を作製するために用いることができる、異種性血清型の重要な抗原性コンポーネントを含有する新規の組換えキメラデングウイルスのパネルの作製を記載する。本発明者らは、抗原移植のこの戦略が、他のヒトおよび動物病原体についての複数のワクチンプラットフォームに適合し、重要なことには、デングウイルスワクチン開発の大きなブレークスルーを表すと考えている。

10

20

30

40

50

#### 【0189】

##### rDENV4/2ウイルスの作製

DENV2とDENV4の間で異なるアミノ酸残基を同定するために、エンペロブドメインIII(EDIII)領域のアミノ酸配列(アミノ酸位置296~395)をアラインメントした(図13、パネルA)。DENV2とDENV4の間で異なる残基は、強調されており、合計40個であり、DENV4由来のそれらの残基は、できる限り最少のヌクレオチド変化を生じさせることにより、DENV2由来のそれらと置き換えられた。40個の異にするアミノ酸は、EDIII全体に及び、そのドメインの表面露出残基、内部残基、および端の残基を含み、おそらく、他の単量体および二量体と相互作用する(図13、パネルB)。組換えウイルスの作製は、親の野生型ウイルスを生み出すために用いられる4断片のクローニング戦略を利用する。DENV-4Aプラスミドカセットは、エンペロブ糖タンパク質を含有し、EDIIIは灰色で強調されている(図13、パネルC)。組換えDENV-4Aと共にDENV-4B、C、およびDのプラスミドカセットを用いて、DV4-EDIII-DV2ウイルスが生じ得る。組換えウイルスへ導入された40個のアミノ酸変化のうち、そのアミノ酸の14個が、電荷の変化を導入する(表1)。6個の残基は、負電荷を増加させ、8個の残基は、より多い正電荷を導入する。

#### 【0190】

##### 組換えウイルスは親DENV4と類似した成熟プロフィールを有する

ウイルスに存在するEタンパク質およびp r Mタンパク質の比を測定するために、ウイルスにおいてイムノプロットングを実施した(図14)。DENV2は、Eに対して高レベルのp r Mを示し、不完全なフューリンプロセッシングまたはp r M解離のいずれかによる、高度に未成熟のウイルスを示している。DENV4およびDV4-EDIII-DV2のどちらも、検出可能なp r Mを有さず、これらのウイルスが高度に成熟であることを示唆している。しかしながら、DENV2とその2つのDENV4主鎖型ウイルスとの間で検出されるEタンパク質の量における有意な差のため、本発明者らは、これらのピリオンの表面上にいくつかのp r Mの存在を除外することができない。

#### 【0191】

##### 組換えウイルスはベロ細胞において減弱するが、蚊細胞においては減弱しない

多段階成長曲線を用いる実験により、DV4-EDIII-DV2は、DENV2およびDENV4の両方の親ウイルスと比較して、ベロ細胞において $2 \log_{10}$ の成長減弱を有する(図15、パネルA)。DV4-EDIII-DV2は、ベロ細胞において、両方の親ウイルス間の中間の形態を有する感染巣を形成する(図15、パネルB)。ベロ細胞における追加の1~2日間の感染にも関わらず、DV4-EDIII-DV2病巣は、親ウイルス病巣のサイズに達していない。

#### 【0192】

ベロ細胞における成長減弱にも関わらず、DV4-EDIII-DV2は、C6/36

細胞において減弱を示さない(図16、パネルA)。ペロ細胞において観察されたように、DV4-EDI-II-DV2 C6/36感染巣は、両方の親ウイルス間の中間の形態を示す。追加の1~2日間の感染で、これらの病巣は、両方の野生型ウイルスに匹敵するサイズに達する。

【0193】

DENV2 EDI-IIの移植は、2D22結合および中和を移すのに十分である

2D22は、DENV2に非常に型特異的であるヒトモノクローナル抗体(MAb)である(図17、パネルA)。以前、ペロ細胞において2D22の存在下でDENV2を継代することにより、エスケープ突然変異体を作製した。このエスケープ突然変異体は、EDI-IIの中央に1つの点突然変異、R323Gを有し(図17、パネルB)、DENV Eのこの領域が、2D22エピトープ内に含まれ得ることを示している。ELISA結合により、DV4-EDI-II-DV2が、DV4レベルより上だが、DV2レベルには達しない、2D22との部分的結合を獲得していることが示されている(図17、パネルC)。交差反応性DENV mAbである、2J20との結合(図17、パネルD)は、同等レベルのウイルスが結合アッセイにおいて存在し、しかもDV4-EDI-II-DV2形態が維持されていることを示している。

10

【0194】

2D22による中和を、2つの細胞型および2つのアッセイを用いて分析した。ペロ-81細胞を、2D22の存在下で感染させ、50%の病巣を中和するのに必要とされる抗体の量(FRNT<sub>50</sub>)を計算した。DENV2は、50%のウイルスを中和するのに約0.1ng/ulの2D22を必要とするが、DENV4は、用いられた抗体の最高濃度、5ng/ulにおいて中和されない(図17、パネルE)。EDI-IIの移植は、約0.01ng/ul FRNT<sub>50</sub>値からわかるように、2D22による中和に対する感受性を移すのに十分である。これらの結果は、抗体の存在下で感染した細胞の数の低下により中和を測定する、U937+DC-SIGNフローサイトメトリに基づいた中和アッセイを用いて確認されている(図17、パネルF)。これらのデータは、2D22が、そのエピトープの部分としてEDI-IIを含有することをさらに示唆している。

20

【0195】

DV4-EDI-II-DV2は、追加のDENV2 MAbによる中和に対する感受性を獲得している

6個の追加のDENV2 MAbのパネルを用いて、DV4-EDI-II-DV2をさらに特徴づけた(表2)。これらのMAbの多くは、組換えEDI-II(rEDI-II)と結合せず、それには、2D22が挙げられ、それはそのエピトープの部分としてEDI-IIを含有することを本発明者らは示している(図17)。rEDI-II単独との結合の欠如を説明するのに、2D22が、E単量体全体、E二量体、または完全なウイルス構造においてのみ存在する複雑なエピトープを用いるということはある。このパネルにおける他のMAbが同じ要求性を有することはあり得る。エスケープ突然変異体を作製することによる、またはアラニンスキャニング突然変異を通してのいずれかで決定される、結合に重要な残基などの追加の情報が、その表に含まれる。

30

【0196】

DVC3.7について、EDI-IIの側面の隆線に位置する1つの点突然変異V382Gを生じさせた(図18、パネルA)。DV4-EDI-II-DV2は、DENV2と類似して、DVC3.7による中和に感受性があるが、親のDENV4は感受性がない(図18、パネルC)。DVC10.16について、EDI-IIのA鎖に位置する1つの点突然変異E311Kを生じさせた(図18、パネルB)。DVC3.7に関して見られたように、DV4-EDI-II-DV2は、DENV2中和に必要なレベルより下の、DVC10.16による中和を、親のDENV4から獲得している。アラニンスキャニング変異導入法により、DVC13.6結合に必要なレベルより下の、EDI-IIにおける融合ループの位置101および108が明らかにされた(図18、パネルE)。DV4-EDI-II-DV2はDVC13.6によって中和される(図18、パネルF)。これらのデータは

40

50



ている。このウイルスは、DENV2抗体またはDENV4抗体のいずれについても探索する診断ツールとして用いることができる。特に、異種性DENV4背景におけるDENV2 EDIIIの孤立のため、自然感染した、またはワクチン接種された個体由来のEDIII特異的Abの相対的存在量をアッセイすることができる。これは、DENV2のEDIIIが、感染後の型特異的中和応答にとって重大な意味をもつと思われるという本発明者らの所見を考慮すると、意義深い。このウイルスは、DENV2とDENV4の両方からのドメインを含有し、DENV2抗体およびDENV4抗体の両方による中和に対して感受性があり、このウイルスが、両方の血清型に対する抗体応答を誘発する能力がある二価ワクチンとして有用であり得ることを示唆している。さらに、四価ワクチン製剤は、DENV1/3またはDENV3/1組換えウイルスと合わせて用いられる場合には、達成可能であり得、デングワクチン分野における意義深い進歩を示している。

10

#### 【0202】

##### ウイルス構築

組換えウイルスを、4断片クローニングストラテジーを用いて構築し、同じストラテジーを、野生型DENV感染性クローンを作製するのに用いる。DENV-4ゲノムを、4つの別々のDNAプラスミドへサブクローニングする。T7プロモーターを、A断片の5'末端へ導入し、固有のIIS型制限部位を、各断片の5'末端および3'末端へ導入する。これらの制限部位は、プラスミドが、正しい方向でのみ組み立てられてDENVゲノム配列を生じるであろうことを確実にする。

20

#### 【0203】

DENV4 A断片におけるヌクレオチドを、DENV2アミノ酸をコードするヌクレオチドで置き換えることにより、DENV2由来のEDIII残基をDENV4へ導入した。DENV2由来のヌクレオチドを有する新しいA断片を合成し、pUC-57プラスミド(BioBasic)へ挿入した。DENV4 B、C、およびDプラスミドに加えて、新しいAプラスミドを大腸菌において成長させ、精製し、対応するIIS型制限酵素で消化し、T4 DNAリガーゼを用いてライゲーションして、完全長cDNAデングウイルスゲノムが生成された。cDNAを、T7ポリメラーゼを用いて転写した。組換えRNAをBHK-21細胞へ電気穿孔し、生存ウイルスを含有する細胞培養上清を採取した。その後、ウイルスを、C6/36細胞において2回、継代し、遠心分離して細胞片を除去し、-80℃で保存した。

30

#### 【0204】

##### 細胞

蚊ヒトスジシマカC6/36細胞を、MEM(Gibco)培地中、32℃で成長させた。ベロ-81細胞をDMEM中、37℃で維持した。レトロウイルス形質導入によりDC-SIGNを安定的に発現するヒト単球リンパ腫細胞株U937(U937+DC-SIGN)を、RPMI-1640(Gibco)中、37℃で維持し、50mMβ-メルカプトエタノールを追加した。培地にFBS(ベロ-81細胞およびU937+DC-SIGN細胞について10%、C6/36について5%)を追加し、感染培地を作製するために、FBSを2%まで低下させた。全ての培地に、さらに、100U/mlペニシリンおよび100mg/mlストレプトマイシンを追加した。U937+DC-SIGNに、さらに、0.1mM非必須アミノ酸および2mMグルタミンを追加した。全ての細胞を5%CO<sub>2</sub>中、インキュベートした。

40

#### 【0205】

##### 結合性ELISA

(ELISAによって前に力価測定されているような)等量のウイルスを、抗E抗体を用いて捕獲した。一次抗体2D22および2J20を4倍希釈して、希釈系列の作製を開始した。アルカリフォスファターゼ連結型二次抗体を用いて、一次抗体のp-ニトロフェニルリン酸基質との結合を検出し、反応の色変化を、分光光度法を用いて定量化した。

#### 【0206】

##### DENV免疫血清

50

ヒト D E N V 免疫血清を、以前の自然 D E N V 感染が確認された個体から収集した。追加のヒト免疫血清を、D E N V ワクチンを与えられた個体から収集した。非ヒト霊長類免疫血清を、D E N V 感染後、収集した。

#### 【0207】

ウイルス力価測定および病巣低下中和試験 ( F R N T )

感染の1日前、24 ウェルプレートに、 $5 \times 10^4$  個のベロ - 81 細胞または  $1 \times 10^5$  個の C 6 / 3 6 細胞のいずれかを播種した。感染の前に成長培地を除去した。ウイルスストックを10倍の段階希釈し、その後、37 °C で1時間、インキュベートすることによりウイルス力価測定を実施した。インキュベーション後、ウイルス希釈溶液を、細胞へ、37 °C で1時間、加え、その後、2% F B S、100 U / m l ペニシリン、および100 m g / m l ストレプトマイシンを追加した O p t i M E M ( G i b c o ) 中の1 m l 1%メチルセルロースでオーバーレイした。37 °C での3~6日間のインキュベーション後、オーバーレイを除去し、細胞を P B S で洗浄し、80%メタノール中に固定した。プレートを、P B S 中に作製された5%インスタントミルクでブロッキングし、その後、抗 E M A b 4 G 2 および抗 P r M M A b 2 H 2 (どちらもブロッキングバッファー中、1:500に希釈されている)とインキュベートした。その後、プレートを洗浄し、ブロッキングバッファー中1:2500に希釈された H R P コンジュゲート型ヤギ抗マウス A b ( S i g m a ) とインキュベートした。その後、プレートを洗浄し、病巣を、T r u e B l u e H R P 基質 ( K P L ) で発色させ、病巣をカウントした。

#### 【0208】

F R N T アッセイについて、M A b または血清のいずれかを、4倍希釈し、約40 F F U ウイルスと混合し、その後、37 °C で1時間、インキュベートした。インキュベーション後、ウイルスおよび M A b / 血清希釈溶液を細胞へ、37 °C で1時間、加え、その後、オーバーレイを加え、上記のように処理した。

#### 【0209】

成長曲線

ベロ細胞または C 6 / 3 6 細胞のいずれかを、0.01の感染多重度 ( M O I ) で感染させた。24時間ごとに、培養上清を採取し、遠心分離して細胞片を除去した。試料を、使用するまで、-80 °C で凍結させた。新鮮な培地に毎日、交換した。ウイルスを、上記のようなそれらを増殖する細胞型において力価測定した。

#### 【0210】

U 9 3 7 + D C - S I G N 中和アッセイ

F R N T アッセイにおいて行ったように、ウイルスを、U 9 3 7 + D C - S I G N 感染培地中に希釈し、4倍希釈系列の M A b と混合した。ウイルスおよび M A b 混合物を37 °C で1時間、インキュベートした。その後、ウイルスおよび M A b 混合物を、96ウェル丸底プレートのウェルあたり  $5 \times 10^4$  個の U 9 3 7 + D C - S I G N 細胞に加え、37 °C で2時間、インキュベートした。インキュベーション後、細胞を遠心分離し、感染培地で2回、洗浄し、その後、成長培地中に再び、懸濁させた。感染から1日後、細胞を遠心分離して収集し、P B S で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、細胞を透過処理し、1%正常マウス血清中でブロッキングした。細胞を、A l e x F l u o r 4 8 8 で直接的に標識された抗 E 2 H 2 の1:400希釈溶液で染色した。陽染性細胞のパーセンテージを、G u a v a e a s y C y t e フローサイトメータ ( M i l l i p o r e ) で測定した。

#### 【0211】

イムノプロットング

ウイルスストックを P B S 中で希釈し、4 x L a e m m l i サンプルバッファー ( B i o - R a d ) と混合し、50 °C で10分間、加熱した。試料を、12% P R O T E A N T G X ゲル ( B i o - R a d ) 上に流し、P V D F 膜に転写し、P B S + 0.05% T w e e n 中の5%インスタントミルクにおいて、4 °C で一晩、ブロッキングした。膜を、ブロッキングバッファー中、0.5 u g / m l 抗 E 4 G 2、0.5 u g / m l 抗 P r

10

20

30

40

50

M 2 H 1 2 および 5 L 2 0 で、3 7、2 時間、探索した。洗浄後、HRP コンジュゲート型抗マウスおよび抗ヒト二次抗体をブロッキングバッファ中、1 : 1 0, 0 0 0 希釈し、室温で 1 時間、インキュベートした。膜を化学発光基質に曝露し、フィルム上に顕出させた。

【 0 2 1 2 】

[ 実施例 5 ]

血清型 2 中和ヒト抗体応答をマッピングするためのキメラ組換えデングウイルスの使用  
4 つのデングウイルス ( D E N V ) 血清型 ( D E N V 1 ~ 4 ) の 1 つでの一次感染は、  
感染した血清型を中和する抗体を生じるが、他の血清型を中和する抗体は生じない。本発  
明者らのグループは、自然 D E N V 感染に曝露した人々からの、血清型特異的な、強く中  
和するモノクローナル抗体 ( h M A b ) の単離を以前、報告している。本発明者らは、こ  
れらの h M A b が、無傷ウイルス粒子上でのみ発現している複雑な四次構造エピトープと  
結合することを実証している。最近、本発明者らは、これらの複雑なエピトープが血清型  
の間で移植されている生存可能な組換え D E N V を作製することが可能であることを報告  
した。D E N V 3 / 4 キメラを用いることにより、本発明者らは、エンベロープ ( E ) タ  
ンパク質のドメイン I / I I の間のヒンジ領域が、血清型 3 および 4 を中和する型特異的  
抗体の主要な標的であるエピトープを含有することを観察した。最新の研究において、本  
発明者らは、同様のアプローチを用いて、中和 h M A b および一次 D E N V 2 ヒト免疫血  
清により認識される D E N V 2 の部位を位置づけている。本発明者らの研究により、血清  
型 3 および 4 について以前に定義された E D I / I I ヒンジ領域エピトープとは異なる新  
規な四次構造依存性 D E N V 2 エピトープの同定がもたらされた。重要なことには、本発  
明者らは、機能の獲得と喪失の研究を用いて、D E N V 1 ~ 4 E 糖タンパク質における  
異なる位置が、固有の長続きする中和エピトープをコードし、そのエピトープが血清型の  
間で移植可能であることを実証している。D E N V 2 エピトープの位置、ならびに自然感  
染およびワクチンに曝露された人々における中和抗体についての標的としてのその相対  
的重要性を調べた。

10

20

【 0 2 1 3 】

r D E N V 4 / 2 ウイルスの設計および構築

D E N V 2 ( 右 ) 由来の残基を、D E N V 4 主鎖へ移動させて、組換え D E N V 4 / 2  
ウイルス ( r D E N V 4 / 2、図 2 4、パネル A ) を作製した。D E N V ゲノムを操作す  
るための逆遺伝学系を用いた ( 図 2 4、パネル B )。上 = D E N V 2、下 = D E N V 4。  
D E N V ゲノムを、個々に突然変異させることができる 4 つのプラスミドカセットへ分割  
し、共にライゲーションし、細胞へ電気穿孔し、組換えウイルスが生じる。D E N V 4 -  
A カセットは、突然変異が生じるエンベロープ遺伝子を含む。その D E N V 4 残基を  
D E N V 2 由来のそれらと置き換えることにより、D E N V 遺伝子主鎖上に全体的に構築  
された r D E N V 4 / 2 ウイルスが生じる。

30

【 0 2 1 4 】

R T - P C R による血清型同定のための新しい方法および D E N V 4 主鎖組換えウイル  
スの確認

血清型特異的 R T - P C R のために R T - P C R プライマーを設計した ( 図 2 5、パネ  
ル A )。利用されるプライマーは、高度に保存された 3' 末端 NS 1 遺伝子を標的にする  
共通センスオリゴヌクレオチド、および高度に多様な NS 2 A 遺伝子を標的にする血清型  
特異的アンチセンスプライマーを含んだ。ウイルスを C 6 / 3 6 細胞中で成長させ、培養  
上清を収集し、遠心分離して、いかなる細胞片も除去した。ウイルス RNA を、Q I A G  
E N Q I A m p ウイルス RNA M i n i p r e p キットを用いて単離した。P C R を  
3 5 サイクル、実行し、P C R 産物を、1 . 5 % 超高純度アガロースゲル上で分析した。  
対照 RNA ( D V 1 / D V 2 / D V 3 / D V 4 ) および水を、陽性および陰性対照として  
流した ( 図 2 5、パネル B )。予想される産物サイズ : D V 1 = 2 0 5 b p、D V 2 = 5  
3 9 b p、D V 3 = 4 5 5 b p、D V 4 = 4 0 1 b p。

40

【 0 2 1 5 】

50

制限断片長多型は r D E N V 4 / 2 を親 D E N V 4 から識別する

r D E N V 4 / 2 (下) を親 D E N V 4 (上) から識別するために、制限断片長多型 (R F L P) 分析を用いた。r D E N V 4 / 2 を作製するために D E N V 4 E ゲノムへ導入された突然変異 (アスタリスクで表されている) は、D E N V 4 に存在する X m n I 制限酵素部位を破壊している (図 26、パネル A)。P C R 産物をゲル精製し、X m n I で消化した。消化産物を 1.5% 超高純度アガロースゲル上で分析した (図 26、パネル B)。予想される産物サイズ: 消化されていない完全長 = 1031 bp、消化産物 = 931 bp および 113 bp。

【0216】

D E N V 4 および r D E N V 4 / 2 ビリオンは類似した成熟プロフィールを有する

ウイルスを C6/36 細胞中で成長させ、培養上清を収集し、遠心分離して、いかなる細胞片も除去した。試料を 12% S D S - P A G E ゲル上に流し、プロットを抗 E 抗体 (4G2) および抗 P r M 抗体 (2H12 および 5L20) で探索した (図 27)。D E N V 2 は、実質的なレベルの P r M が存在し、不完全なフューリンプロセッシングまたは P r M 解離のいずれかを示している。P r M バンドは、D E N V 4 または r D E N V 4 / 2 のいずれの試料においても検出されない。

10

【0217】

r D E N V 4 / 2 は、ベロ細胞において親ウイルスと比較して 2 log の成長減弱を示す

ベロ - 81 細胞を、M O I = 0.01 で、D E N V 2、D E N V 4、および r D E N V 4 / 2 に感染させた。ウイルス上清を 24 時間ごとに収集し、続いて、ベロ - 81 細胞において力価測定した (図 28、パネル A)。D E N V は、ベロ - 81 細胞において感染巣を形成する。D E N V 2、D E N V 4、および r D E N V 4 / 2 をそれぞれ、感染から 5 日後、4 日後、および 6 日後に固定した (図 28、パネル B)。r D E N V 4 / 2 は、両方の親ウイルスより小さい病巣を示した。

20

【0218】

r D E N V 4 / 2 は、C6/36 細胞において成長減弱を示さず、親ウイルスと類似した感染巣を形成する

C6/36 細胞を、M O I = 0.01 で、D E N V 2、D E N V 4、および r D E N V 4 / 2 に感染させた。ウイルス上清を 24 時間ごとに収集し、続いて、C6/36 細胞において力価測定した (図 29、パネル A)。D E N V は、C6/36 細胞において感染巣を形成する。D E N V 2、D E N V 4、および r D E N V 4 / 2 をそれぞれ、感染から 4 日後、3 日後、および 5 日後に固定した (図 29、パネル B)。さらに何日間かの成長で、r D E N V 4 / 2 病巣は、親ウイルスに匹敵するサイズに達する。

30

【0219】

図 30. 型特異的 D E N V 2 ヒト M A b による r D E N V 4 / 2 の結合および中和の転移

四次エピトープと結合する、強中和性 D V 2 M A b である、ヒト M A b 2 D 2 2 の結合の概要は、図 30、パネル A に示されている。2 D 2 2 は、D E N V 2 を中和することに対して高い特異性を示す。E L I S A アッセイにより、親 D V 4 のレベルより上であるが、D V 2 レベルまでではない、2 D 2 2 の r D E N V 4 / 2 への部分的結合の転移が示されている (図 30、パネル B)。交差反応性対照抗体の 2 J 2 0 の E L I S A 結合は、存在する同等レベルのウイルス、およびウイルス完全性の維持を示した (図 30、パネル C)。ベロ - 81 に基づいた病巣低下中和試験 (F R N T) を、2 D 2 2 を用いて実施し、F R N T<sub>50</sub> (感染の 50% を中和するのに必要とされる抗体の濃度) 値を計算した (図 30、パネル D)。U937 + D C - S I G N に基づいた中和アッセイ (N e u t) を、2 D 2 2 を用いて実施し、N e u t<sub>50</sub> 値を計算した (図 30、パネル E)。両方のアッセイにおいて (図 30、パネル D ~ E)、r D E N V 4 / 2 は、2 D 2 2 による中和を、D V 2 より高いレベルで獲得した。D V 4 は、いずれのアッセイにおいても、最高濃度の 2 D 2 2 で中和されなかった。

40

50

## 【0220】

r D E N V 4 / 2 は、D E N V 4 ポリクローナル血清による中和を保存しながら、D E N V 2 ポリクローナル免疫血清による中和を獲得する

ペロ - 8 1 F R N T アッセイにより、r D E N V 4 / 2 が、親 D E N V 2 に匹敵するレベルで、D E N V 2 ポリクローナル免疫血清による中和を獲得したことが示された (図 3 1、パネル A)。r D E N V 4 / 2 は、D E N V 4 ポリクローナル免疫血清による中和の喪失は示さなかった (図 3 1、パネル B)。r D E N V 4 / 2 は、親 D E N V 2 または D E N V 4 の中和価のいずれよりも上のヘテロタイプの D E N V 1 ポリクローナル免疫血清 (図 3 1、パネル C) および D E N V 3 ポリクローナル免疫血清 (図 3 1、パネル D) による中和の獲得は示さなかった。自然感染または実験的ワクチン接種のいずれかを有する個体由来の血清は、示された通り、コード化されている。F R N T <sub>50</sub> < 20 を有する試料は、19 の血清希釈係数にグラフ化されている。

10

## 【0221】

この研究において、2つの D E N V 血清型 (D E N V 2 および D E N V 4) 由来のエンペロブ残基で構成された組換え D E N V ウイルスが作製され、このウイルスを特徴づけることにおいて、いくつかの鍵となる所見が同定されており、その所見は、1つの D E N V 血清型から別の血清型へ領域を移植することによる生存可能な組換えウイルスを作製することができること; r D E N V 4 / 2 成長は、哺乳類細胞において減弱するが、昆虫細胞において減弱しないこと; r D E N V 4 / 2 は検出可能な P r M タンパク質が存在せず、それが、完全にプロセシングされ、高度に成熟していることを示していること; 2つの異なる細胞型および中和アッセイにおいてヒト D E N V 2 型特異的 M A b 2 D 2 2 による結合および中和が転移されたこと; r D E N V 4 / 2 は、D E N V 4 ポリクローナル免疫血清による中和を喪失することなく、D E N V 2 ポリクローナル免疫血清による中和を獲得すること; r D E N V 4 / 2 はヘテロタイプのポリクローナル免疫血清による中和を獲得していないこと; ならびに r D E N V 4 / 2 は、D E N V 2 および D E N V 4 の両方に対する防御抗体応答を誘発し得る二価ワクチンとして開発され得ることである。

20

## 【0222】

## [ 実施例 6 ]

組換え D E N V の野生型 D E N V 配列とのアミノ酸アラインメント

D V 4 - E D I I I - D V 2 の野生型 D E N V 4 および D E N V 2 とのアミノ酸配列アラインメントは図 3 2 A に示されている。D E N V 2 - 1 F 4 E の野生型 D E N V 2 および D E N V 1 とのアミノ酸配列アラインメントは図 3 2 B に示されている。最後に、D E N V 4 M 1 2、D E N V 4 M 1 4、および D E N V 4 M 1 6 の野生型 D E N V 4 および D E N V 3 とのアミノ酸アラインメントは図 3 2 B に示されている。

30

## 【0223】

前述は、本発明の例証となるものであり、それを限定するものとして解釈されるべきではない。本発明は、以下の特許請求の範囲、加えて、それに含まれ得る特許請求の範囲の等価物により、定義される。

## 【0224】

本明細書に引用される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その参考文献が示されている文および/または段落に関連した教示として完全に引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

40

## 【0225】

【表 1】

表1 組換えDV4-EDIII-DV2ウイルスにおけるアミノ酸変化の概要				
位置	DV2	DV4	AA変化	組換えウイルスに
307	K	S	正電荷 → 極性非荷電	<p>において変化した40個のアミノ酸残基のうち、14個が電荷の変化を導入した。6個の残基が負電荷を増加させ(明るい赤色=正→非荷電、暗い赤色=非荷電→負)、8個の残基が正電荷を増加させている(明るい青色=負→非荷電、暗い青色=非荷電→正)。さらなる残基変化は、疎水性アミノ酸から極性アミノ酸への置き換えと、その逆である。</p>
309	V	D	疎水性非荷電 → 負電荷	
320	I	T	疎水性非荷電 → 極性非荷電	
325	Q	K	極性非荷電 → 正電荷	
329	D	A	負電荷 → 疎水性非荷電	
331	S	A	極性非荷電 → 疎水性非荷電	
340	T	R	極性非荷電 → 正電荷	
343	E	N	負電荷 → 極性非荷電	
345	R	E	正電荷 → 負電荷	
353	V	S	疎水性非荷電 → 極性非荷電	
358	T	E	極性非荷電 → 負電荷	
359	E	N	負電荷 → 極性非荷電	
360	K	T	正電荷 → 極性非荷電	
361	D	N	負電荷 → 極性非荷電	
364	V	T	疎水性非荷電 → 極性非荷電	
382	E	G	負電荷 → 疎水性非荷電	
383	P	N	疎水性非荷電 → 極性非荷電	
384	G	S	疎水性非荷電 → 極性非荷電	
385	Q	A	極性非荷電 → 疎水性非荷電	
387	K	T	正電荷 → 極性非荷電	
389	N	H	極性非荷電 → 正電荷	

10

20

【 0 2 2 6 】

30

## 【表 2】

**表2 DV4-EDIII-DV2の表面トポロジーを探索するために用いられる MAb**

結合特異性	MAb	rEDIII と結合 する	補注
DV2型特異的	2D22	-	エスケープ突然変異体、R323F(EDIII)
	3F9	+	-----
	1L12	-	-----
	DVC3.7	+	EDIII側面隆線エピトープ
DV部分複合体	DVC10.16	+	EDIII A鎖エピトープ
DV複合体	DVC13.6	-	アラニン置換突然変異=101および108(融合 ループ)
	DVC23.13	-	-----
DV4型特異的	DV4-E88	+	マウスMAb、知られたEDIIIエピトープ、ア ラニン置換突然変異=331および361(EDIII)

その後の実験に用いられる追加のMAb。DENV2型特異的MAbの一部は組換えEDIIIと結合する。rEDIIIと結合しないいくつかのMAbは、それらのエピトープにEDIIIを含有すると思われる。

10

20

## 【 0 2 2 7 】

配列

## 【 化 8 】

>親\_WT\_DENV3 : 115-773 E[デングウイルス3、配列番号12]

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATQLATLRKLC  
IEGKITNITD SRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS�VTCAKFQC  
LEPIEGKV VQYENLKYTVIITVHTGDQHQVGNETQ--GVTAEITPQASTTEAILPEYGT LGLE  
CSPRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKNA  
HAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCR LKMDKLELKGMSYAMC  
TNTFVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQGKAHNGRLITANPVVTKKEEP  
VNIEAEPFPGESNIVIGIDNALKINWYKKGSSIGKMFEATARGARRMAILGDTAWDFG SVG  
GVLNSLGKMHQIFGSAYTALFSGVSWVMKIGIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAIGIITLYL  
GAVVQA

30

## 【 0 2 2 8 】

## 【化 9】

&gt;DENV4\_M12 : 115-775 E (配列番号2)

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTATQLATLRKL  
 CIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CSGPIEGKVQYENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGEL  
 TLDCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGADTSEVHWNYKERMVTF  
 KVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRKIGMSYT  
 MCSGKFSIDKEMAETQHGTTVVVKVYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLAENT  
 NSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLALTLHWFRKSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
 SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
 ITLFLGFTVQA

10

## 【 0 2 2 9】

## 【化 1 0】

&gt;DENV4\_M14 : 115-775 E (配列番号3)

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTEATQLATLRKL  
 CIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CLEPIEGKVQYENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGEL  
 TLDCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGADTSEVHWNYKERMVTF  
 KVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRKIGMSYT  
 MCSGKFSIDKEMAETQHGTTVVVKVYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLAENT  
 NSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLALTLHWFRKSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
 SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
 ITLFLGFTVQA

20

## 【 0 2 3 0】

## 【化 1 1】

&gt;DENV4\_M16 : 115-775 E (配列番号4)

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTEATQLATLRKL  
 CIEASISNITTDTRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CLEPIEGKVQYENLEYTVVVTVHNGDQHAVGNDSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGEL  
 TLDCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTSEPHWNYKERMVTF  
 KVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRKIGMSYT  
 MCSGKFSIKKEMAETQHGTTVVVKVYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLAENT  
 NSPTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLALTLHWFRKSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
 SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
 ITLFLGFTVQA

30

40

## 【 0 2 3 1】

## 【化 1 2】

>親\_WT\_DENV4 : 115-775 E[デングウイルス4、配列番号1]

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLRT  
 YCIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVCAKF  
 SCSGKITGNLVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGE  
 LTLDCPRSGIDFNEMILMKMKKKTWLVHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNYKERMVT  
 FKVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDSGDGNHMFAGHLKCKVRMEKLRKGM  
 SYTMCSGKFSIDKEMAETQHGTTVVVKVYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLA  
 ENTNSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLALTLHWFRKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAW  
 DFGSVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIA  
 VGGITLFLGFTVQA

10

## 【 0 2 3 2】

## 【化 1 3】

>親\_WT\_DENV2 : 115-775[デングウイルス2、配列番号13]

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTEAKQPATLRKYCIE  
 AKLTNTTTESRCPTQGEPSLNEEQDKRFICKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTCK  
 KNMEGKVVQPENLEYTIVITPHSGEEHAVGNDTGKHGKEIKITPQSSITEAELTGYGVTME  
 CSPRTGLDFNEMVLLQMEDKAWLVHRQWFLDLPLPWLPGADTQESNWIQKETLVTFKNP  
 HAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLLFTGHLKCRLRMDKLQLKGMSYSMC  
 TGKFKIVKEIAETQHGTVIRVQYEGDGSCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDSPVNI  
 EAEPFPGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLGGV  
 FTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTSLSVSLVLVGVVTLYL  
 AVVQA

20

## 【 0 2 3 3】

## 【化 1 4】

>DV4-EDIII-DV2 : 115-775[デングウイルス4/2、配列番号5]

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLRT  
 YCIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVCAKF  
 SCSGKITGNLVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGE  
 LTLDCPRSGIDFNEMILMKMKKKTWLVHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNYKERMVT  
 FKVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDSGDGNHMFAGHLKCKVRMEKLRKGM  
 SYSMCTGKFKIVKEIAETQHGTVIRVQYEGDGSCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEK  
 DSPVNIEAEPFPGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
 SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
 ITLFLGFTVQA

30

40

## 【 0 2 3 4】

## 【化 1 5】

>親\_WT\_DENV1 : 115-775 E[デングウイルス1、配列番号14]

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRKLC  
IEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGSGLITCAKFKC  
VTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALT  
DCSPRTGLDFNEMVLLTMEKKS WL VHKQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTFKT  
AHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFAGHLKCRLKMDKLT LKGMSYVM  
CTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTONGR LITANPIVTDKE  
KPVNIEAEPFGE SYIVVGAGEKALKLSWFKKGSSIGKMF EATARGARRMAILGDTAWDFG  
SIGGVFTSVGKLIHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSTLSMT CIAVGMVT  
LYLGVMVQA

10

## 【 0 2 3 5】

## 【化 1 6】

>DENV2-1F4E : 115-775 (配列番号6)

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELFKTEVTNPAVLRKYCI  
EAKLTNTTTESRCPTQGEPSLNEEQDKRFICKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTC  
KKNMEGKVVQPENLKYSVIVTVHSGEEHAVGNDTTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALT  
LECSPTGLDFNEMVLLQMEDKAWLVHRQWFLDLPLPWLPGADTQESNWIQKETLVTFK  
NPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTLFTGHLKCRLRMDKQLKGM SYS  
MCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGS PCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNP I VTEKDSP  
VNIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKNWFKKGSSIGQM FETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLG  
GVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTLSVSLVLVGVV TLY  
LGAVVQA

20

## 【 0 2 3 6】

## 【化 1 7】

**DENV1/4 (5H2)**

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRKLC  
IEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGSGLITCAKFKC  
VTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGN EATEHGVTAMITPQSPSVEVKLPDYGELT  
LDCSPRTGLDFNEMVLLTMKKKS WL VHKQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTFK  
TAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFAGHLKCRLKMDKLR LKGM SYV  
MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTONGR LITANPIVTDK  
EKPVNIEAEPFGE SYIVVGAGEKALKLSWFKKGSSIGKMF EATARGARRMAILGDTAWDF  
GSIGGVFTSVGKLIHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSTLSMT CIAVGM  
VTLYLGVMVQA (配列番号15)

30

40

## 【 0 2 3 7】

【化 1 8】

**DENV2/4 (5H2)**

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTEAKQPATLRKYCIE  
 AKLTNTTTESRCPTQGEPSLNEEQDKRFICKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTCK  
 KNMEGKVVQPENLEYTIVITPHSGEEHAVGNDAGKHGVTAMITPQSSSVEVKLPDYGEVT  
 MECSPTGLDFNEMVLLQMEDKAWLVHRQWFLDLPLPWLPGADTQESNWIQKETLVTFK  
 NPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLFTGHLKCLRMDKLRKLGMSYS  
 MCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVITEKDSP  
 VNIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLG  
 GVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTLSVSLVVLVGVVTLY  
 LGAVVQA (配列番号16)

10

【0 2 3 8】

【化 1 9】

**DENV2-1F4E (株16803)**

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELFKTEVTNPAVLRKYCI  
 EAKLTNTTTESRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTC  
 KKNMEGKVVQPENLKYSVIVTVHSGEEHAVGNDTTEHGTTATVTPQAPTSEIQLTDYGAL  
 TLECSPTGLDFNEMVLLQMENKAWLVHRQWFLDLPLPWLPGADTQGSNWIQKETLVTF  
 KNPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTLFTGHLKCLRMDKLQKLGMSY  
 SMCTGKFKVVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPCKIPFEIMDLEKRHVLGRLITVNPVITEKD  
 SPVNIEAEPFGDSYIIIGVDPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGS  
 LGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTLSVSLVVLVGVVT  
 LYLAVVQA (配列番号17)

20

【0 2 3 9】

以下の変化もまた起こされて、DENV1のより小さい領域がDENV2へ移植されて  
 いる2つのウイルスが生み出され得る：

30

1. N52Q、V55T、S138T、V139I
2. A168S、P169S、A180T、L181V、L183M( # 1 に列挙された  
 ものに加えて)

【0 2 4 0】

【化 2 0】

**DENV4-1F4E**

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGSCVTTMAQGKPTLDFELFKTTVTNPAVLRTY  
 CIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CSGKITGNLVQIENLKYSVIVTVHNGDTHAVGNDTTEHGTTATITPRAPTSEIQLTDYGALT  
 LDCEPRSGIDFNEMILMKMKKKTWLVHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNYKERMVTF  
 KVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDTGGTTTTFAGHLKCKVRMEKLRKIGMS  
 YTMCSGKFSIDKEMAETQHGTIVVVKVYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVGRVISSTPLAE  
 NTNSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLALTLHWFRKGSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWD  
 FGSVGGFLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAV  
 GGITLFLGFTVQA (配列番号18)

40

【0 2 4 1】

以下の変化もまた起こされて、DENV1のより小さい領域がDENV2へ移植されて  
 いる2つのウイルスが生み出され得る：

50

- 1 . N 5 2 E、 P 5 3 V、 V 5 5 L、 S 1 3 8 T  
 2 . A 1 6 8 S、 A 1 8 0 E ( # 1 に列挙されたものに加えて )  
 【 0 2 4 2 】  
 【 化 2 1 】

**DENV1-3M14**

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTEATQLATLRKLC  
 IEAKISNTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGLITCAKFKCL  
 EPIEGKVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTD  
 CSPRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTFKTA  
 HAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCRCLKMDKLTGMSYVMC  
 TGSFKLEKEVAETQHGTIVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTONGRILITANPIVTDKEKP  
 VNIEAEPFGEYSYIVVGAGEKALKLSWFKKGSSIGKMFPEATARGARRMAILGDTAWDFGSI  
 GGVFTSVGKLIHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSTSLSMTCIAVGMVTL  
 YLGMVQA (配列番号19)

10

## 【 0 2 4 3 】

以下の変化もまた起こされて、DENV3のより大きい領域がDENV1へ移植されて  
 いるウイルスが生み出され得る(DENV1-3M16と名付けられている) :

- 1 . S 2 2 5 T、 E 2 2 9 P、 E 3 0 7 K

20

## 【 0 2 4 4 】

## 【 化 2 2 】

**DENV2/3 M12 (株16803)**

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTEATQLATLRKLCIE  
 AKLTNTTTSRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTCK  
 EPIEGKVQYENLEYSIVVTPHSGEEHAVGNDTGKHGKEIKVTPQSSITEAELTGYGVTME  
 CSPRTGLDFNEMVLLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSTADTQGPNIQKETLVTFKNP  
 HAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCRRLMDKLQLKGMSYSMC  
 TGKFKVVKIEAETQHGTIVIRVQYEGDGSPCKIPFEIMDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDSPV  
 NIEAEPFGDSYIIIGVDPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLG  
 GVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTSLSVSLVLVGVITLYL  
 GVMVQA (配列番号20)

30

## 【 0 2 4 5 】

以下の変化もまた起こされて、DENV3のより大きい領域がDENV2へ移植されて  
 いる2つのウイルスが生み出され得る(DENV2-M14(#1)およびDENV2-  
 M16(#2)と名付けられている) :

- 1 . K 1 2 2 L、 K 1 2 3 E、 P 1 3 2 Y

2 . E 7 1 D、 E 1 4 8 Q、 D 2 2 5 T、 S 2 2 9 P、 V 3 0 7 K ( # 1 に列挙されたも  
 のに加えて )

40

## 【 0 2 4 6 】

## 【化 2 3】

**DENV3/4 (5H2)**

MRCVIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATQLATLRKLC  
 IEGKITNITTD SRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS�VTCASFQC  
 LEPIEGKVVQYENLKYTVIITVHTGDQHQVGNESNQGV TAMITPQSSSVKLPDYGELG  
 LECSPTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKN  
 AHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCRKMDKLRKGM SYAM  
 CTNTFVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQGAHNGRLITANPVVTKKEE  
 PVNIEAEPFPGESNIVIGIGNALKINWYKKGSSIGKMF EATARGARRMAILGDTAWDFGSV  
 GGVLNSLGKMHQIFGSAYTALFSGVSWVMKIGIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAIGITLY  
 LGAVVQA (配列番号21)

10

## 【 0 2 4 7】

## 【化 2 4】

**DV4-EDIII-DV2)**

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTAKEVALLRT  
 YCIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQYICRRDVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCASF  
 SCSGKITGNLVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDTSNHGVTATITPRSPSVEVKLPDYGE  
 LTLDCPRSGIDFNEMILMKMKKKTWL VHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNKYKERMVT  
 FKVPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDSGDGNHMFAGHLKCKVRMEKLRKGM  
 SYSMCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGPCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEK  
 DSPVNIEAEPFPGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFG  
 SVGGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGG  
 ITLFLGFTVQA (配列番号22)

20

## 【 0 2 4 8】

以下の変化もまた起こされて、DENV2のより大きい領域がDENV4へ移植されて  
 いる2つのウイルスが生み出され得る：

30

- 1 . Y 8 1 S、K 8 3 S、V 2 4 2 N、R 2 4 7 K
- 2 . I 6 8 T、A 7 1 E、T 7 2 S、R 9 3 K、R 9 4 H、D 9 5 S、V 9 6 M、V 1 1  
 3 I ( # 1 に列挙されたものに加えて )

## 【 0 2 4 9】

## 【化 2 5】

**DV1-EDIII-DV2**

MRCVIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRKLC  
 IEAKISNTTTD SRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS�ITCAKFKC  
 VTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTATITPQAPTSEIQLTDYGALTL  
 DCSPTGLDFNEMVLLTMEKKS WL VHKQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTFKT  
 AHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFAGHLKCRKMDKLT LKGMSSYSM  
 CTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGPCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDSPV  
 NIEAEPFPGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGKMF EATARGARRMAILGDTAWDFGSIGG  
 VFTSVGKLIHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSTSLSMTCIAVGMVTLYL  
 GVMVQA (配列番号23)

40

## 【 0 2 5 0】

以下の変化もまた起こされて、DENV2のより大きい領域がDENV1へ移植されて  
 いる2つのウイルスが生み出され得る：

50

1 . I 6 8 T、D 7 1 E、A 8 0 P、T 8 1 S、V 8 3 N、T 2 4 2 N、A 2 4 3 P、E 2 4 9 D

2 . R 9 3 K、R 9 4 H、T 9 5 S、F 9 6 M、S 1 1 2 G、L 1 1 3 I、I 1 1 4 V ( # 1 に列挙されたものに加えて)

【 0 2 5 1 】

【 化 2 6 】

### DV3-EDIII-DV2

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVLEHGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATQLATLRKLC  
IEGKITNITDSRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS�VTCAKFQC  
LEPIEGKVQYENLKYTVIITVHTGDQHQVGNETQGVTAETPQASTTEAILPEYGTGLGLECS  
PRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKNAHA  
KKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCRKMDKLELKGMSYSMCTG  
KFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSCKIPFEITDLEKRHVLRITVNPIVTEKDSPVNIEA  
EPPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWYKKGSSIGKMFATARGARRMAILGDTAWDFGSLVGGVLN  
SLGKMHQIFGSAYTALFSGVSWVMKIGIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAIGIITLYLGAVV  
QA (配列番号24)

10

【 0 2 5 2 】

以下の変化もまた起こされて、DENV2のより大きい領域がDENV3へ移植されている2つのウイルスが生み出され得る：

1 . D 7 1 E、A 8 0 P、V 8 1 S、P 8 3 N、A 2 4 3 P、E 2 4 9 D

2 . I 6 8 T、T 9 5 S、Y 9 6 M、S 1 1 2 G、L 1 1 3 I ( # 1 に列挙されたものに加えて)

【 0 2 5 3 】

【 化 2 7 】

### DENV2/1/3 (株16803)

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELFKTEVTQLATLRKLCIE  
AKLTNTTTSRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTCK  
KPIEGKVQYENLKYTIIVTVHSGEEHAVGNDTTEHGTTATVTPQSSTSEIQLTDYGTVTME  
CSPRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGADTQGSNWIQKETLVTFKNP  
HAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSSSTTIFAGHLKCLRMDKLQKGMSSYSMCT  
GKFKVVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSCKIPFEIMDLEKRHVLRITVNPIVTEKDSPVN  
IEAEPFGDSYIIIGVDPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETMRGAKRMAILGDTAWDFGSLGG  
VFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTLSVSLVLVGVVTLYL  
GAVVQA (配列番号25)

30

【 0 2 5 4 】

注：AA # 5 0 は、VまたはAであり得、AA # 5 2 はQまたはNであり得、AA # 5 5 はTまたはVであり得、AA # 2 7 2 はTまたはNであり得、AA # 2 7 5 はTまたはGであり得、AA # 2 7 6 はTまたはNであり得、AA # 2 7 7 はTまたはLであり得る。

40

【 0 2 5 5 】

以下の変化もまた起こされて、DENV1および/またはDENV3のより大きい領域がDENV2へ移植されているウイルスが生み出され得る：

1 . Q 5 2 N、T 5 5 V、T 1 3 8 S、I 1 3 9 V

2 . S 1 6 8 A、S 1 6 9 P、T 1 8 0 A、V 1 8 1 L、M 1 8 3 L ( # 1 に列挙されたものに加えて)

3 . K 1 2 2 L、K 1 2 3 E、P 1 3 2 Y

50

4 . E 7 1 D、E 1 4 8 Q、D 2 2 5 T、S 2 2 7 P、V 3 0 7 K ( # 3 に列挙されたものに加えて)

5 . 1、2、3、4、および最初の配列のありとあらゆる組み合わせ(すなわち、1 + 3、1 + 4、2 + 3、2 + 4)

【0256】

【化28】

#### DENV2/1/4

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELFKTEVTQPATLRKYCIE  
AKLTNTTTESRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTCK  
KNMEGKVVQPENLKYTIIVTVHSGEEHAVGNDATEHGVTAMVTPQSSTVEVKLPDYGEVT  
MECSPRTGLDFNEMVLLQMENKAWLVHRQWFLDLPLPWLPGADTQGSNWIQKETLVTFK  
NPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTTLFTGHLKCRLRMDKLRKLGMSYS  
MCTGKFKVVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPPCKIPFEIMDLEKRHVLGRLITVNPVIVTEKDS  
PVNIEAEPFPGDSYIIIGVDPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSL  
GGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTSLSVSLVVLVGVVTL  
YLGAVVQA (配列番号26)

10

【0257】

注：AA # 160はTまたはVであり得、AA # 163はTまたはMであり得、AA # 168はSまたはAであり得、AA # 170はTまたはSであり得、AA # 171はSまたはVであり得、AA # 173はVまたはIであり得、AA # 174はQまたはKであり得、AA # 176はPまたはTであり得、AA # 180はEまたはAであり得る。

20

【0258】

以下の変化もまた起こされて、DENV1のより大きい領域がDENV2へ移植されているウイルスが生み出され得る：

1 . Q 5 2 N、T 5 5 V、T 1 3 8 S、I 1 3 9 V

2 . S 1 6 8 A、S 1 6 9 P、T 1 8 0 A、V 1 8 1 L、M 1 8 3 L ( # 1 に列挙されたものに加えて)

30

【0259】

【化29】

#### DENV2/3/4 (株16803)

MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTEATQLATLRKLCIE  
AKLTNTTTESRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTCK  
EPIEGKVVQPENLEYTIVVTPHSGEEHAVGNDAKGHVTAMVTPQSSSVEVKLPDYGEVT  
MECSPRTGLDFNEMVLLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSTADTQGPNIQKETLVTFK  
NPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCRLRMDKLRKLGMSYS  
MCTGKFKVVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPPCKIPFEIMDLEKRHVLGRLITVNPVIVTEKDS  
PVNIEAEPFPGDSYIIIGVDPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSL  
GGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTSLSVSLVVLVGVIVTLY  
LGVMVQA (配列番号27)

40

【0260】

以下の変化もまた起こされて、DENV3のより大きい領域がDENV2へ移植されている2つのウイルスが生み出され得る：

1 . K 1 2 2 L、K 1 2 3 E、P 1 3 2 Y

2 . E 7 1 D、E 1 4 8 Q、D 2 2 5 T、S 2 2 9 P、V 3 0 7 K ( # 1 に列挙されたものに加えて)

50

【 0 2 6 1 】

【 化 3 0 】

**DENV2/1/3/4 (株16803)**

MRCIGISNRDFVEGVSSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELFKTEVTQLATLRKLCIE  
 AKLTNTTTESRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTCK  
 KPIEGKVVQPENLKYTHIVTVHSGEEHAVGNDATEHGVTAMVTPQASSVEVKLPDYGEVT  
 MECSPTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGADTQGSNWIQKETLVTFK  
 NPHAKKQDVVVVLSQEGAMHTALTGATEIQTSSSTTIFAGHLKCRRLMDKLRLLKGMSSYM  
 CTGKFKVVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSCKIPFEIMDLEKRHVLRGLITVNPVIVTEKDSP  
 VNIEAEPFPGDSYIIIGVDPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETMRGAKRMAILGDTAWDFGSL  
 GGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTLSVSLVVLVGVVTL  
 YLGAVVQA (配列番号28)

10

【 0 2 6 2 】

注：A A # 5 0 は V または A であり得、A A # 5 2 は Q または N であり得、A A  
 # 5 5 は T または V であり得、A A # 1 6 0 は T または V であり得、A A # 1 6 3 は  
 T または M であり得、A A # 1 6 8 は S または A であり得、A A # 1 7 0 は T または  
 S であり得、A A # 1 7 1 は S または V であり得、A A # 1 7 3 は V または I であり  
 得、A A # 1 7 4 は Q または K であり得、A A # 1 7 6 は P または T であり得、A A  
 # 1 8 0 は E または A であり得、A A # 2 7 2 は T または N であり得、A A # 2 7  
 5 は T または G であり得、A A # 2 7 6 は T または N であり得、A A # 2 7 7 は T ま  
 たは L であり得る。

20

【 0 2 6 3 】

以下の変化もまた起こされて、D E N V 1 および / または D E N V 3 のより大きい領域  
 が D E N V 2 へ移植されているウイルスが生み出され得る：

- 1 . Q 5 2 N、T 5 5 V、T 1 3 8 S、I 1 3 9 V
- 2 . S 1 6 8 A、S 1 6 9 P、T 1 8 0 A、V 1 8 1 L、M 1 8 3 L ( # 1 に列挙された  
 ものに加えて)
- 3 . K 1 2 2 L、K 1 2 3 E、P 1 3 2 Y
- 4 . E 7 1 D、E 1 4 8 Q、D 2 2 5 T、S 2 2 7 P、V 3 0 7 K ( # 3 に列挙された  
 ものに加えて)
- 5 . 1、2、3、4、および最初の配列のありとあらゆる組み合わせ

30

【 0 2 6 4 】

【 化 3 1 】

**DENV1/3/4**

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTEATQLATLRKLC  
 IEAKISNTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGSLLITCAKFKC  
 VTKIEGKVVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNATEHGVTAMITPQSPSVEVKLPDYGELT  
 LDCSPRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTFK  
 TAHAKKQEVVVVLSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCRLLKMDKLRLLKGMSSYV  
 MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTONGLITANPIVTDK  
 EKPVNIEAEPFPGESYIVVGAGEKALKLSWFKKGSSIGKMFPEATARGARRMAILGDTAWDF  
 GSIGGVFTSVGKLIHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSTLSMTCIAVGM  
 VTLVYLGVMVQA (配列番号29)

40

【 0 2 6 5 】

注：A A # 5 0 は V または A であり得、A A # 5 2 は Q または N であり得、A A  
 # 5 5 は T または V であり得、A A # 2 7 2 は T または N であり得、A A # 2 7 5 は

50

TまたはGであり得、AA # 276はTまたはNであり得、AA # 277はTまたはLであり得る。

【0266】

以下の変化もまた起こされて、DENV3のより大きい領域がDENV1へ移植されているウイルスが生み出され得る：

1. V122L、T123E、K124P、L214F
2. S225T、E229P、E307K（#1に列挙されたものに加えて）

【0267】

【化32】

### DENV1/2/3

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTEATQLATLRKLC  
IEAKISNTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGSLLITCAKFKC  
VTKIEGKVVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALTL  
DCSPRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTFKT  
AHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCRKMDKLTGMSYSM  
CTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDSPV  
NIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGKMFATARGARRMAILGDTAWDFGSGG  
VFTSVGKLIHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSTLSMTCIAVGMVTLYL  
GVMVQA（配列番号30）

10

20

【0268】

注：AA # 50はVまたはAであり得、AA # 52はQまたはNであり得、AA # 55はTまたはVであり得、AA # 272はTまたはNであり得、AA # 275はTまたはGであり得、AA # 276はTまたはNであり得、AA # 277はTまたはLであり得る。

【0269】

以下の変化もまた起こされて、DENV2および/またはDENV3のより大きい領域がDENV1へ移植されているウイルスが生み出され得る：

1. I68T、D71E、A80P、T81S、V83N、T242N、A243P、E249D
2. R93K、R94H、T95S、F96M、S112G、L113I、I114V（#1に列挙されたものに加えて）
3. V122L、T123E、K124P、L214F
4. S225T、E229P、E307K（#3に列挙されたものに加えて）
5. 1、2、3、4、および最初の配列のありとあらゆる組み合わせ

30

【0270】

【化33】

### DENV1/2/4

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRKLC  
IEAKISNTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGSLLITCAKFKC  
VTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNATEHGVTAMITPQSPSVEVKLPDYGELT  
LDCSPRTGLDFNEMVLLTMEKKS WL VHKQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTFK  
TAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFAGHLKCRKMDKLRKMGMSYS  
MCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDSP  
VNIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGKMFATARGARRMAILGDTAWDFGSG  
GVFTSVGKLIHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSTLSMTCIAVGMVTLYL  
LGVMVQA（配列番号31）

40

50

## 【 0 2 7 1 】

注：A A # 1 6 0 は T または V であり得、A A # 1 6 3 は T または M であり得、A A # 1 6 8 は S または A であり得、A A # 1 7 0 は T または S であり得、A A # 1 7 1 は S または V であり得、A A # 1 7 3 は V または I であり得、A A # 1 7 4 は Q または K であり得、A A # 1 7 6 は P または T であり得、A A # 1 8 0 は E または A であり得る。

## 【 0 2 7 2 】

以下の変化もまた起こされて、D E N V 2 のより大きい領域が D E N V 1 へ移植されている 2 つのウイルスが生み出され得る：

- 1 . I 6 8 T、D 7 1 E、A 8 0 P、T 8 1 S、V 8 3 N、T 2 4 2 N、A 2 4 3 P、E 2 4 9 D
- 2 . R 9 3 K、R 9 4 H、T 9 5 S、F 9 6 M、S 1 1 2 G、L 1 1 3 I、I 1 1 4 V ( # 1 に列挙されたものに加えて )

10

## 【 0 2 7 3 】

## 【 化 3 4 】

DENV1/2/3/4

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKTEATQLATLRKLC  
IEAKISNTTDSRCPTQGEATLVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGSGLITCAKFKC  
VTKIEGKVVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQQVNEATEHGV TAMITPQSPSVEVKLPDYGELT  
LDCSPRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFLDLPLPWTSGASTSQETWNRQDLLVTFK  
TAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCR LKMDKLRLKGM SYS  
MCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGS PCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNP IVTEKD SP  
VNIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGS SIGKMFEATARGARRMAILGDTAWDFGSIG  
GVFTSVGKLIHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGILLTWLGLNSRSTLSMTCIAVGMVTLY  
LGVMVQA (配列番号32)

20

## 【 0 2 7 4 】

注：A A # 5 0 は V または A であり得、A A # 5 2 は Q または N であり得、A A # 5 5 は T または V であり得、A A # 1 6 0 は T または V であり得、A A # 1 6 3 は T または M であり得、A A # 1 6 8 は S または A であり得、A A # 1 7 0 は T または S であり得、A A # 1 7 1 は S または V であり得、A A # 1 7 3 は V または I であり得、A A # 1 7 4 は Q または K であり得、A A # 1 7 6 は P または T であり得、A A # 1 8 0 は E または A であり得、A A # 2 7 2 は T または N であり得、A A # 2 7 5 は T または G であり得、A A # 2 7 6 は T または N であり得、A A # 2 7 7 は T または L であり得る。

30

## 【 0 2 7 5 】

以下の変化もまた起こされて、D E N V 2 および / または D E N V 3 のより大きい領域が D E N V 1 へ移植されている 2 つのウイルスが生み出され得る：

- 1 . I 6 8 T、D 7 1 E、A 8 0 P、T 8 1 S、V 8 3 N、T 2 4 2 N、A 2 4 3 P、E 2 4 9 D
- 2 . R 9 3 K、R 9 4 H、T 9 5 S、F 9 6 M、S 1 1 2 G、L 1 1 3 I、I 1 1 4 V ( # 1 に列挙されたものに加えて )
- 3 . V 1 2 2 L、T 1 2 3 E、K 1 2 4 P、L 2 1 4 F
- 4 . S 2 2 5 T、E 2 2 9 P、E 3 0 7 K ( # 3 に列挙されたものに加えて )
- 5 . 1、2、3、4、および最初の配列のありとあらゆる組み合わせ

40

## 【 0 2 7 6 】

## 【化35】

**DENV3/1/4**

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGGCVTTMAKNKPTLDIELFKTEVTQLATLRKLC  
 IEGKITNITDTRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS�VTCARFQC  
 LEPIEGKVVQYENLKYSVIITVHTGDQHQVGNATEHGVTTAMITPQSSSVEVKLPDYGELG  
 LECSPTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKN  
 AHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGTTISIFAGHLKCRKMDKLRKMGMSYAM  
 CTNTFVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQKANGRLITANPVVTKKEE  
 PVNIEAPPPFGESNIVIGIGDNALKINWYKKGSSIGKMFATARGARRMAILGDTAWDFGSV  
 GGVLNSLGKMHQIFGSAYTALFSGVSWVMKIGIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAIGHITLY  
 LGAVVQA (配列番号33)

10

## 【0277】

注：AA #50はVまたはAであり得、AA #52はQまたはNであり得、AA  
 #55はTまたはVであり得、AA #160はTまたはVであり得、AA #163は  
 TまたはMであり得、AA #168はSまたはAであり得、AA #170はTまたは  
 Sであり得、AA #171はSまたはVであり得、AA #173はVまたはIであり  
 得、AA #174はQまたはKであり得、AA #176はPまたはTであり得、AA  
 #180はEまたはAであり得、AA #272はTまたはNであり得、AA #27  
 5はTまたはGであり得、AA #276はTまたはNであり得、AA #277はTま  
 たはLであり得る。

20

## 【0278】

以下の変化もまた起こされて、DENV1のより大きい領域がDENV3へ移植されて  
 いるウイルスが生み出され得る：

1. S169P、T180A
2. Q52N、L53P、T55V ( # 1 に列挙されたものに加えて )

## 【0279】

## 【化36】

30

**DENV3/1/2**

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGGCVTTMAKNKPTLDIELFKTEVTQLATLRKLC  
 IEGKITNITDTRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS�VTCARFQC  
 LEPIEGKVVQYENLKYTVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTATITPQASTSEIQLTDYGTGLGL  
 ECSPTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKN  
 AHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFAGHLKCRKMDKLELKGMSYSM  
 CTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSPPCKIPFEITDLEKRHVLRITVNPVTEKDSPV  
 NIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWYKKGSSIGKMFATARGARRMAILGDTAWDFGSVG  
 GVLNSLGKMHQIFGSAYTALFSGVSWVMKIGIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAIGHITLYL  
 GAVVQA (配列番号34)

40

## 【0280】

注：AA #50はVまたはAであり得、AA #52はQまたはNであり得、AA  
 #55はTまたはVであり得、AA #272はTまたはNであり得、AA #275は  
 TまたはGであり得、AA #276はTまたはNであり得、AA #277はTまたは  
 Lであり得る。

## 【0281】

以下の変化もまた起こされて、DENV2および/またはDENV1のより大きい領域  
 がDENV3へ移植されている2つのウイルスが生み出され得る：

1. D71E、A80P、V81S、P83N、A243P、E249D

50

2 . I 6 8 T、T 9 5 S、Y 9 6 M、S 1 1 2 G、L 1 1 3 I ( # 1 に列挙されたものに加えて)

3 . S 1 6 9 P、T 1 8 0 A

4 . Q 5 2 N、L 5 3 P、T 5 5 V ( # 3 に列挙されたものに加えて)

5 . 1、2、3、4、および最初の配列のありとあらゆる組み合わせ

【 0 2 8 2 】

【 化 3 7 】

#### DENV3/2/4

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATQLATLRKLC  
IEGKITNITTD SRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS�VTC AKFQC  
LEPIEGKVVQYENLKYTVIITVHTGDQH QVGNEA QGVTAMITPQSSSVEVKLPDYGELGLE  
CSPRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKNA  
HAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQNSGGTSIFAGHLKCR LKMDKLR LKGMSYSMC  
TGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGD GSPCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPIVTEKDSPVNI  
EAEPFPGDSYIIIIGVEPGQLKLNWYKKGSSIGKMFEATARGARRMAILGDTAWDFG SVGGV  
LNSLGKMHQIFGSAYTALFSGVSWVMKIGIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAIGHITLYLGA  
VVQA (配列番号35)

10

【 0 2 8 3 】

以下の変化もまた起こされて、DENV2のより大きい領域がDENV3へ移植されている2つのウイルスが生み出され得る：

1 . D 7 1 E、A 8 0 P、V 8 1 S、P 8 3 N、A 2 4 3 P、E 2 4 9 D

2 . I 6 8 T、T 9 5 S、Y 9 6 M、S 1 1 2 G、L 1 1 3 I ( # 1 に列挙されたものに加えて)

【 0 2 8 4 】

【 化 3 8 】

#### DENV3/1/2/4

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGGCVTTMAKNKPTLDIELFKTEVTQLATLRKLC  
IEGKITNITTD SRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS�VTC AKFQC  
LEPIEGKVVQYENLKYTVIVTVHTGDQH QVGNEATEHGV TAMITPQSSSVEVKLPDYGELG  
LECSPTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKN  
AHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFAGHLKCR LKMDKLR LKGMSYSM  
CTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGD GSPCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPIVTEKDSPV  
NIEAEPFPGDSYIIIIGVEPGQLKLNWYKKGSSIGKMFEATARGARRMAILGDTAWDFG SVG  
GVLNSLGKMHQIFGSAYTALFSGVSWVMKIGIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAIGHITLYL  
GAVVQA (配列番号36)

30

【 0 2 8 5 】

注：AA # 5 0 はVまたはAであり得、AA # 5 2 はQまたはNであり得、AA # 5 5 はTまたはVであり得、AA # 1 6 0 はTまたはVであり得、AA # 1 6 3 はTまたはMであり得、AA # 1 6 8 はSまたはAであり得、AA # 1 7 0 はTまたはSであり得、AA # 1 7 1 はSまたはVであり得、AA # 1 7 3 はVまたはIであり得、AA # 1 7 4 はQまたはKであり得、AA # 1 7 6 はPまたはTであり得、AA # 1 8 0 はEまたはAであり得、AA # 2 7 2 はTまたはNであり得、AA # 2 7 5 はTまたはGであり得、AA # 2 7 6 はTまたはNであり得、AA # 2 7 7 はTまたはLであり得る。

40

【 0 2 8 6 】

以下の変化もまた起こされて、DENV2および/またはDENV1のより大きい領域

50

が DENV3 へ移植されている 2 つのウイルスが生み出され得る :

- 1 . D 7 1 E、A 8 0 P、V 8 1 S、P 8 3 N、A 2 4 3 P、E 2 4 9 D
- 2 . I 6 8 T、T 9 5 S、Y 9 6 M、S 1 1 2 G、L 1 1 3 I ( # 1 に列挙されたものに加えて )
- 3 . S 1 6 9 P、T 1 8 0 A
- 4 . Q 5 2 N、L 5 3 P、T 5 5 V ( # 3 に列挙されたものに加えて )
- 5 . 1、2、3、4、および最初の配列のありとあらゆる組み合わせ

【 0 2 8 7 】

【 化 3 9 】

### DENV4/1/3

MRCVGVGNRDFVEGVSSGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELFKTTVTQLATLRKL  
 CIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CSGPIEGKVQIENLKYTVIVTVHNGDTHAVGNDTTEHGTTATITPRSPTSEIQLTDYGELTL  
 DCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGADTSEVHWNYKERMVTFKV  
 PHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRKIGMSYPMC  
 SGKFSIDKEMAETQHGTTVVKVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISSTPLAENTNS  
 VTNIELEPPFGDSYIVIGVGNLALTLHWFRKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFGSV  
 GGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGGIT  
 LFLGFTVQA (配列番号37)

10

20

【 0 2 8 8 】

注 : A A # 5 0 は V または A であり得、A A # 5 2 は Q または N であり得、A A # 5 5 は T または V であり得、A A # 1 6 0 は T または V であり得、A A # 1 6 3 は T または M であり得、A A # 1 6 8 は S または A であり得、A A # 1 7 0 は T または S であり得、A A # 1 7 1 は S または V であり得、A A # 1 7 3 は V または I であり得、A A # 1 7 4 は Q または K であり得、A A # 1 7 6 は P または T であり得、A A # 1 8 0 は E または A であり得、A A # 2 7 2 は T または N であり得、A A # 2 7 5 は T または G であり得、A A # 2 7 6 は T または N であり得、A A # 2 7 7 は T または L であり得る。

30

【 0 2 8 9 】

以下の変化もまた起こされて、DENV1 および / または DENV3 のより大きい領域が DENV4 へ移植されているウイルスが生み出され得る :

- 1 . T 4 9 E、S 1 2 2 L、G 1 2 3 E、I 1 3 2 Y
- 2 . A 7 1 D、T 1 4 8 Q、D 2 2 5 T、V 2 2 9 P、D 3 0 7 K、K 3 2 1 Q、V 3 6 2 P ( # 1 に列挙されたものに加えて )
- 3 . S 1 6 8 A、E 1 8 0 A
- 4 . E 5 2 N、V 5 3 P、L 5 5 V、T 1 3 8 S ( # 3 に列挙されたものに加えて )
- 5 . 1、2、3、4、および最初の配列のありとあらゆる組み合わせ

【 0 2 9 0 】

40

## 【化40】

**DENV4/1/2**

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELFKTTVTEVALLRTY  
 CIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CSGKITGNLVQIENLKYTVIVTVHNGDTHAVGNDTTEHGTTATITPRSPSTSEIQLTDYGELTL  
 DCEPRSGIDFNEMILMKMKKTWLVHKQWFLDLPLPWTAGADTSEVHWNKYKERMVTFK  
 VPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEVDSGGTTTFAGHLKCKVRMEKLRKLGMSY  
 SMCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDS  
 PVNIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFGSV  
 GGLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGGIT  
 LFLGFTVQA (配列番号38)

10

## 【0291】

注：AA #160はTまたはVであり得、AA #163はTまたはMであり得、AA #168はSまたはAであり得、AA #170はTまたはSであり得、AA #171はSまたはVであり得、AA #173はVまたはIであり得、AA #174はQまたはKであり得、AA #176はPまたはTであり得、AA #180はEまたはAであり得る。

## 【0292】

以下の変化もまた起こされて、DENV1および/またはDENV2のより大きい領域がDENV4へ移植されている2つのウイルスが生み出され得る：

1. Y81S、K83S、V242N、R247K
2. I68T、A71E、T72S、R93K、R94H、D95S、V96M、V113I (#1に列挙されたものに加えて)
3. S168A、E180A
4. E52N、V53P、L55V、T138S (#3に列挙されたものに加えて)
5. 1、2、3、4、および最初の配列のありとあらゆる組み合わせ

20

## 【0293】

## 【化41】

**DENV4/2/3**

MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELTKTTATQLATLRKL  
 CIEASISNITTATRCPTQGEPYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CSGPIEGKVVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDTNSHGVTAITPRSPSVEVKLPDYGEL  
 TLDCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGADTSEVHWNKYKERMVTF  
 KVPKAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRKLGMSYS  
 MCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVTEKDSP  
 VNIEAEPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFGSV  
 GLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILI  
 GFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGGITLFLGFTVQA (配列番号39)

40

## 【0294】

以下の変化もまた起こされて、DENV2および/またはDENV3のより大きい領域がDENV4へ移植されている2つのウイルスが生み出され得る：

1. Y81S、K83S、V242N、R247K
2. I68T、A71E、T72S、R93K、R94H、D95S、V96M、V113I (#1に列挙されたものに加えて)
3. T49E、S122L、G123E、I132Y
4. A71D、T148Q、D225T、V229P、D307K、K321Q、V36

50

2 P ( # 3 に列挙されたものに加えて )

5 . 1、2、3、4、および最初の配列のありとあらゆる組み合わせ

【 0 2 9 5 】

【 化 4 2 】

**DENV4/1/2/3**

MRCVGVGNRDFVEGVSSGAWVDLVLEHGGCVTTMAQGKPTLDFELFKTTVTQLATLRKL  
 CIEASISNITTATRCPTQGEPLYLKEEQDQQYICRRDVVDRGWGNGCGLFGKGGVVTCAKFS  
 CSGPIEGKVVQIENLKYTVIVTVHNGDTHAVGNDDTEHGTTATITPRSPSVEVKLTDYGELT  
 LDCEPRSGIDFNEMILLTMKKKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGADTSEVHWNYKERMVTFK  
 VPHAKRQDVTVLGSQEGAMHSALAGATEIQNSGGTSIFAGHLKCKVRMEKLRLLKGMSSYS  
 MCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGSCKIPFEITDLEKRHVLRITVNPVTEKDSP  
 VNIEAEPFPGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSSIGKMFESTYRGAKRMAILGETAWDFGSGV  
 GLFTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGGVSWMIRILIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCIAVGGITLF  
 LGFTVQA (配列番号40)

10

【 0 2 9 6 】

注 : A A # 5 0 は V または A であり得、 A A # 5 2 は Q または N であり得、 A A  
 # 5 5 は T または V であり得、 A A # 1 6 0 は T または V であり得、 A A # 1 6 3 は  
 T または M であり得、 A A # 1 6 8 は S または A であり得、 A A # 1 7 0 は T または  
 S であり得、 A A # 1 7 1 は S または V であり得、 A A # 1 7 3 は V または I であり  
 得、 A A # 1 7 4 は Q または K であり得、 A A # 1 7 6 は P または T であり得、 A A  
 # 1 8 0 は E または A であり得、 A A # 2 7 2 は T または N であり得、 A A # 2 7  
 5 は T または G であり得、 A A # 2 7 6 は T または N であり得、 A A # 2 7 7 は T ま  
 たは L であり得る。

20

【 0 2 9 7 】

以下の変化もまた起こされて、 D E N V 1、D E N V 2、および / または D E N V 3 の  
 より大きい領域が D E N V 4 へ移植されている 2 つのウイルスが生み出され得る :

1 . Y 8 1 S、K 8 3 S、V 2 4 2 N、R 2 4 7 K

2 . I 6 8 T、A 7 1 E、T 7 2 S、R 9 3 K、R 9 4 H、D 9 5 S、V 9 6 M、V 1 1

30

3 I ( # 1 に列挙されたものに加えて )

3 . T 4 9 E、S 1 2 2 L、G 1 2 3 E、I 1 3 2 Y

4 . A 7 1 D、T 1 4 8 Q、D 2 2 5 T、V 2 2 9 P、D 3 0 7 K、K 3 2 1 Q、V 3 6

2 P ( # 3 に列挙されたものに加えて )

5 . S 1 6 8 A、E 1 8 0 A

6 . E 5 2 N、V 5 3 P、L 5 5 V、T 1 3 8 S

7 . 1、2、3、4、5、6 および最初の配列のありとあらゆる組み合わせ

【 図 1 - 1 】

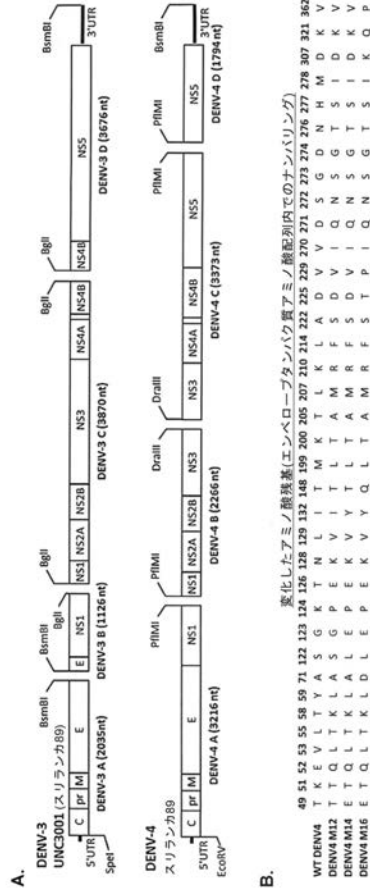


FIG. 1

【 図 1 - 2 】



FIG. 1 (続き)

【 図 2 】

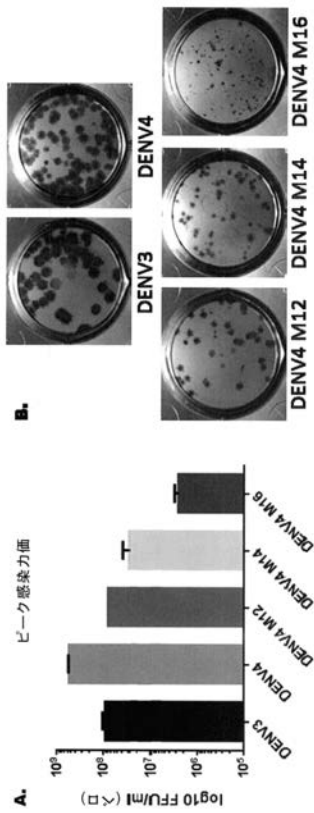


FIG. 2

【 図 3 】

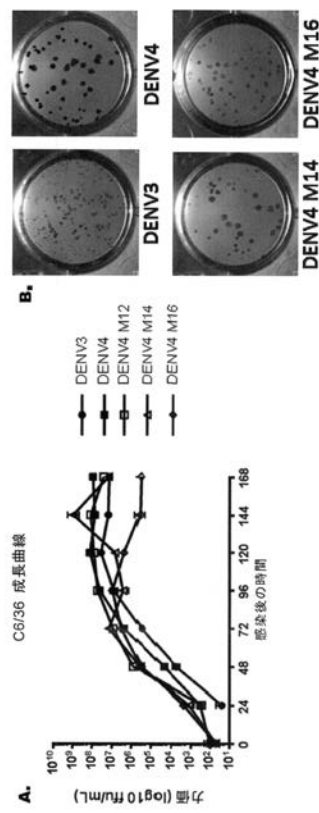


FIG. 3

【 図 4 】

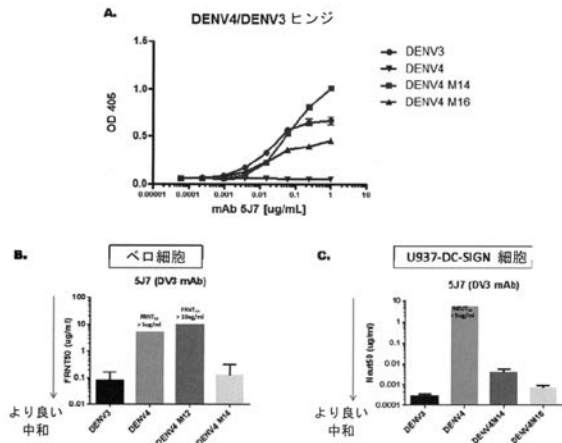


FIG. 4

【 図 5 】

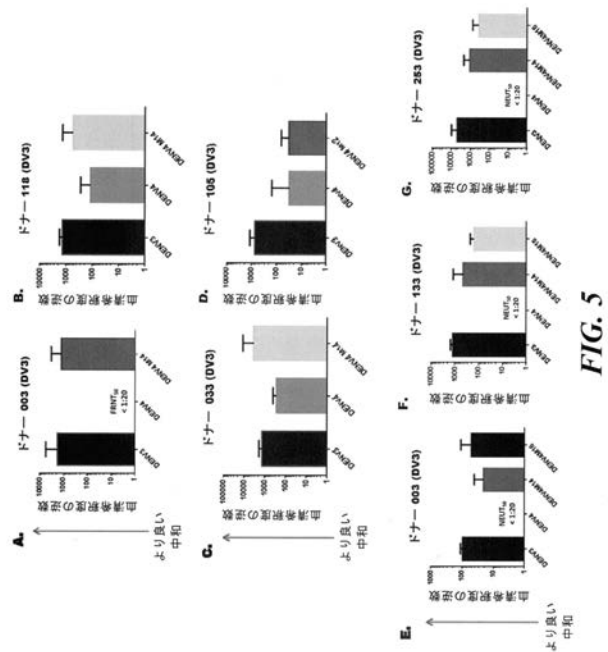


FIG. 5

【 図 6 】

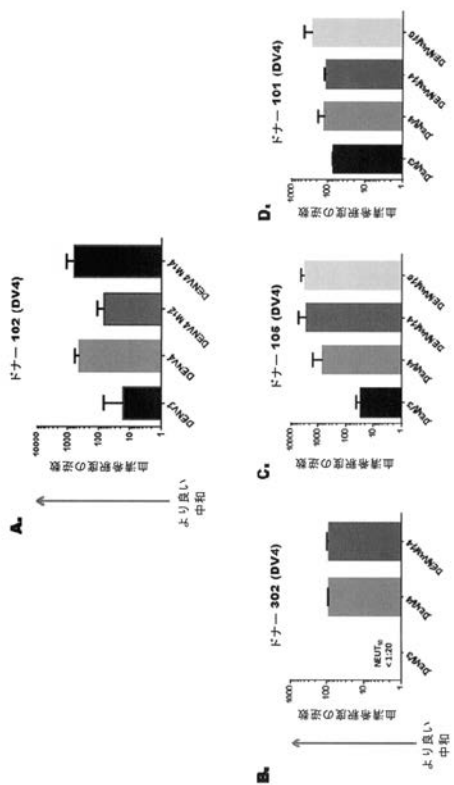


FIG. 6

【 図 7 】

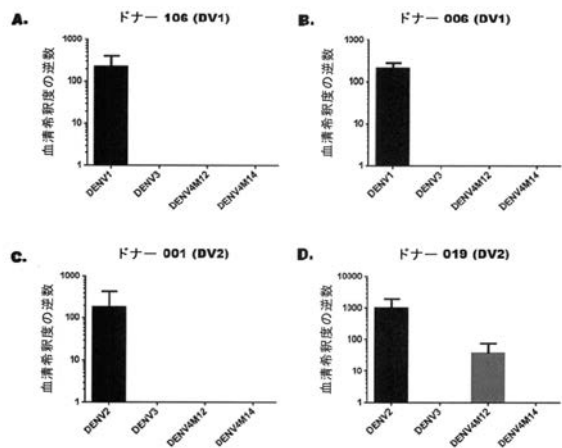


FIG. 7

【 図 8 】

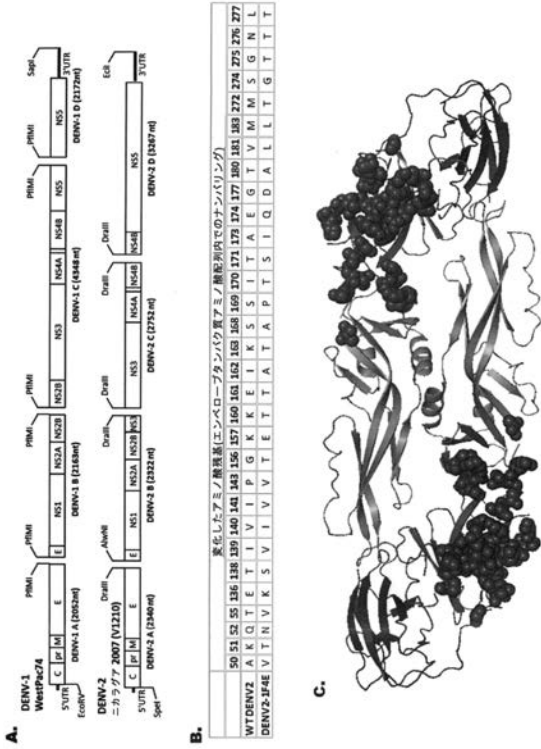


FIG. 8

【 図 9 】

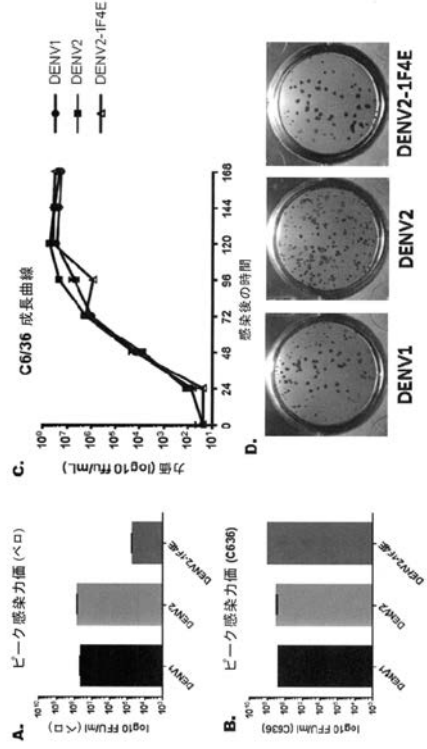


FIG. 9

【 図 10 】

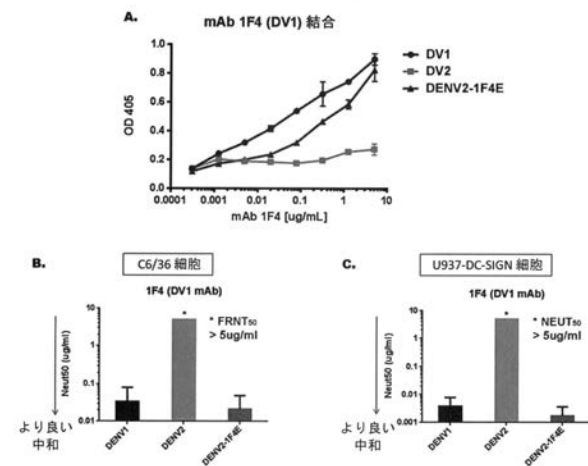


FIG. 10

【 図 11 】

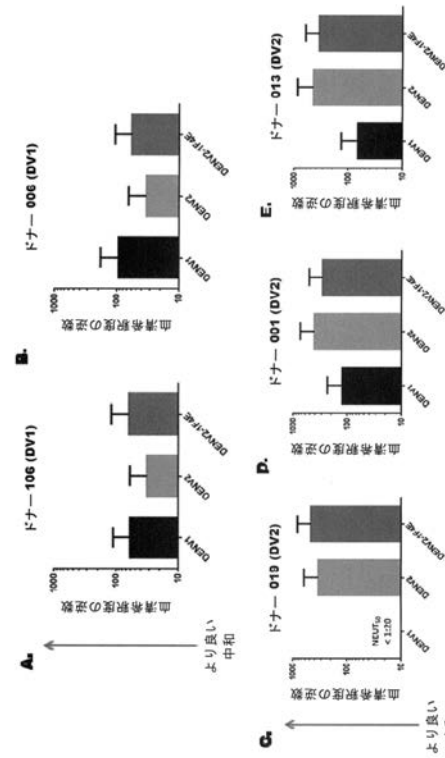


FIG. 11

【 図 1 2 】

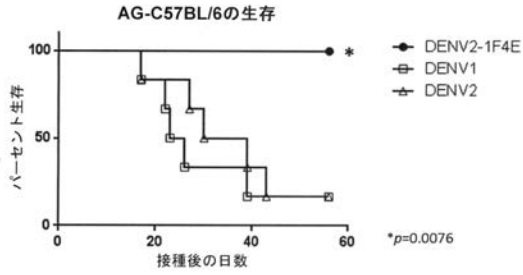


FIG. 12

【 図 1 3 】

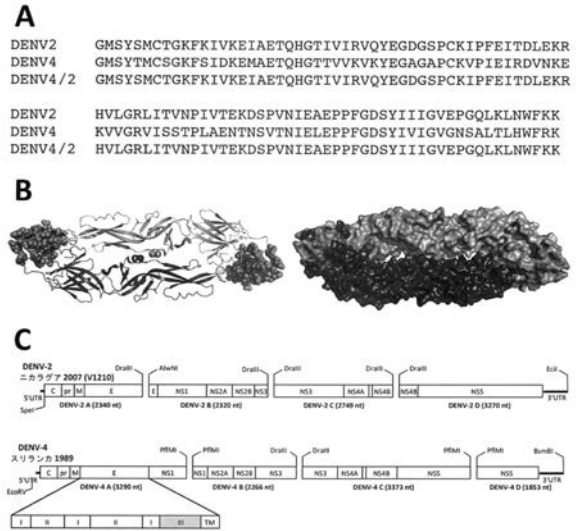


FIG. 13

【 図 1 4 】

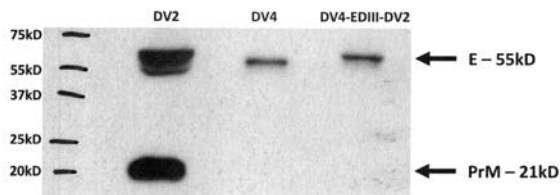


FIG. 14

【 図 1 5 】

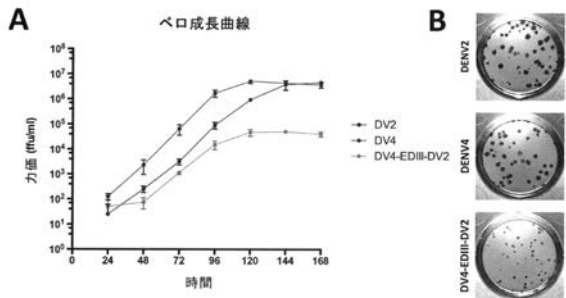


FIG. 15

【 図 1 6 】

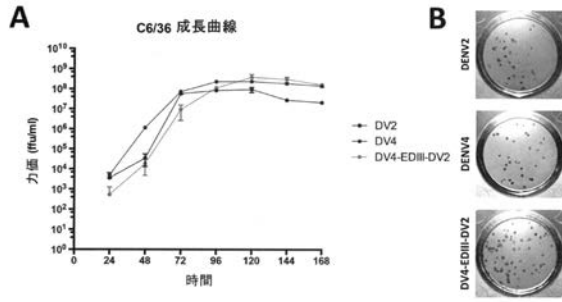


FIG. 16

【 図 1 7 】

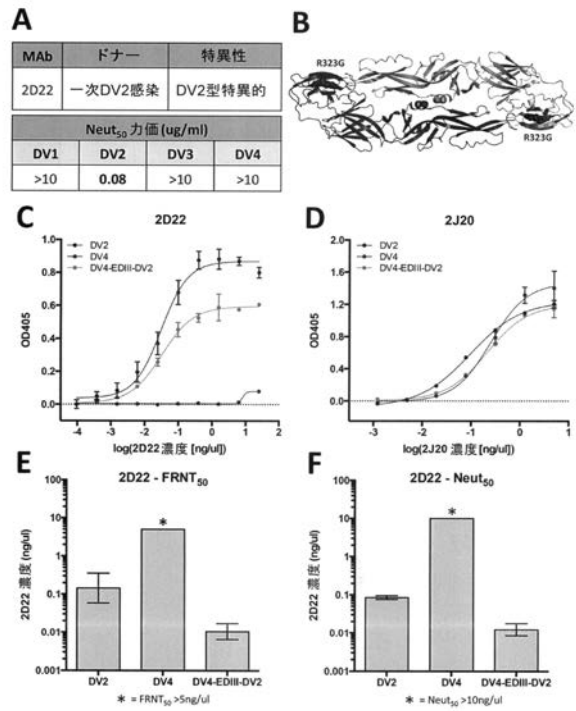


FIG. 17

【 図 1 8 】

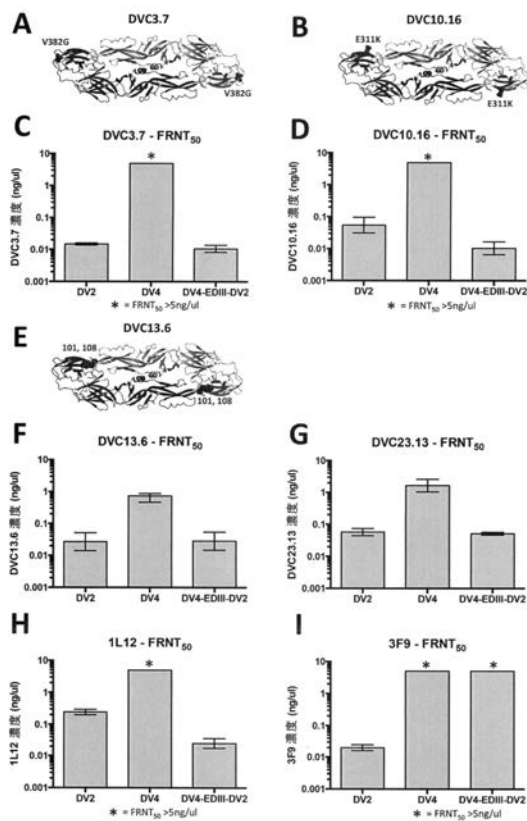


FIG. 18

【 図 1 9 】

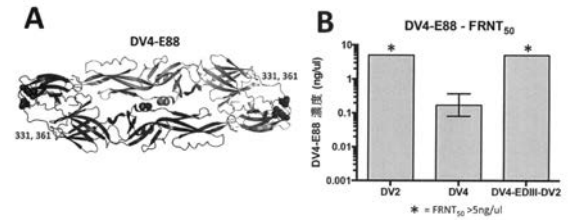


FIG. 19

【 図 2 0 】

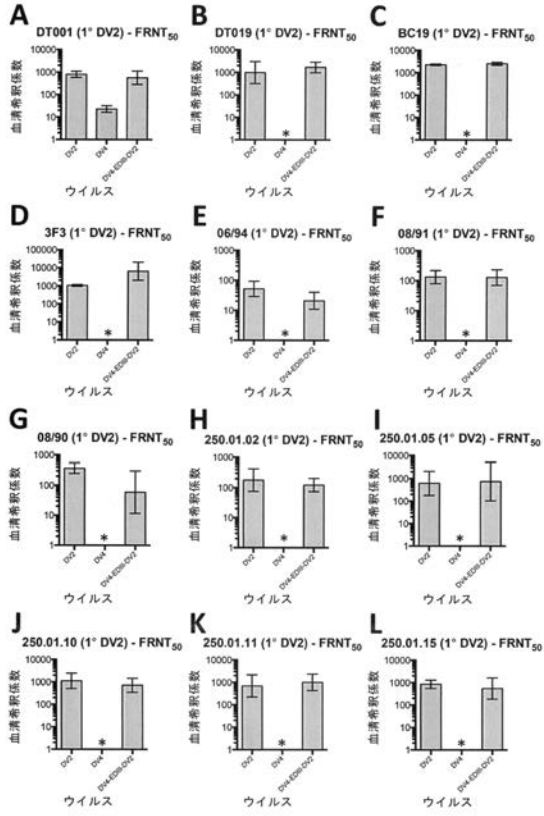


FIG. 20

【 図 2 2 】

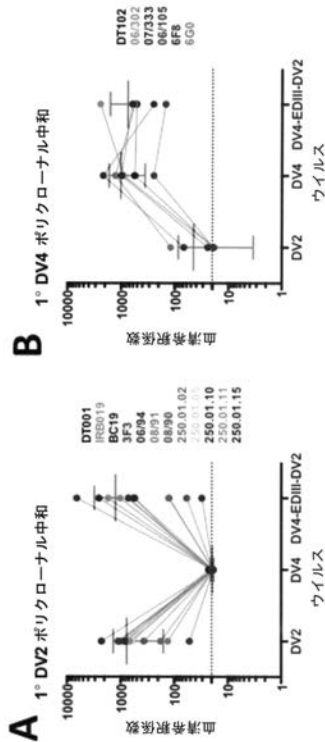


FIG. 22

【 図 2 1 】

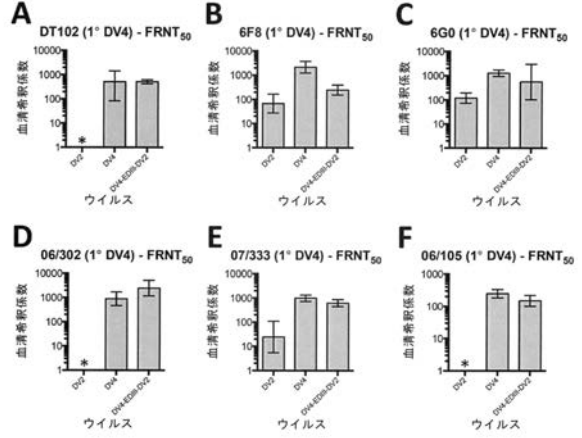


FIG. 21

【 図 2 3 】

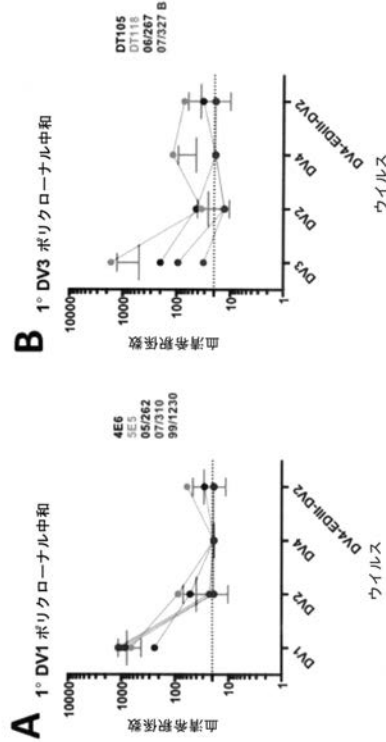


FIG. 23

【 図 2 4 】

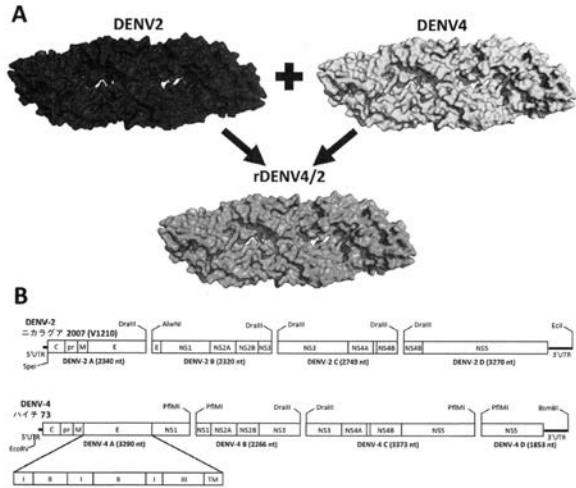


FIG. 24

【 図 2 5 】

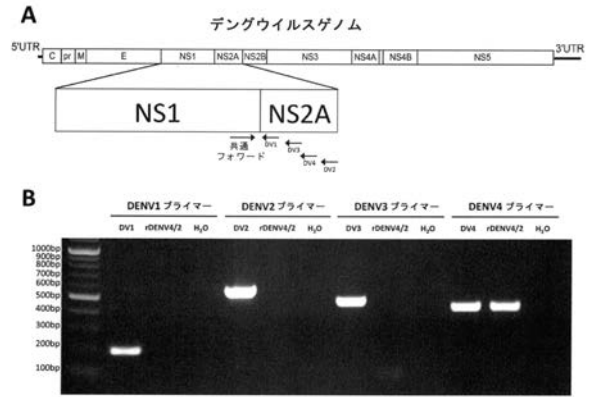


FIG. 25

【 図 2 6 】

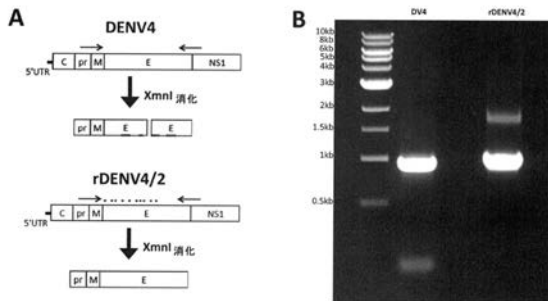


FIG. 26

【 図 2 7 】

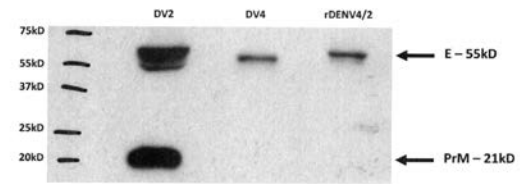


FIG. 27

【 図 2 8 】

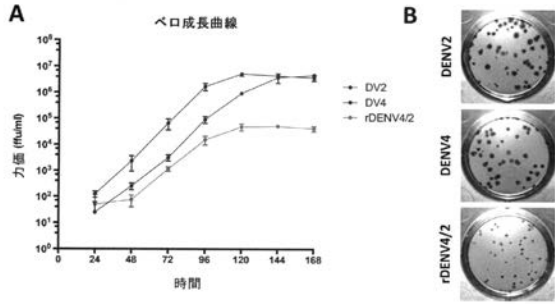


FIG. 28

【 図 2 9 】

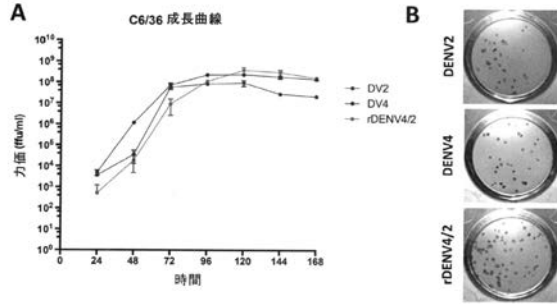


FIG. 29

【 図 3 0 】

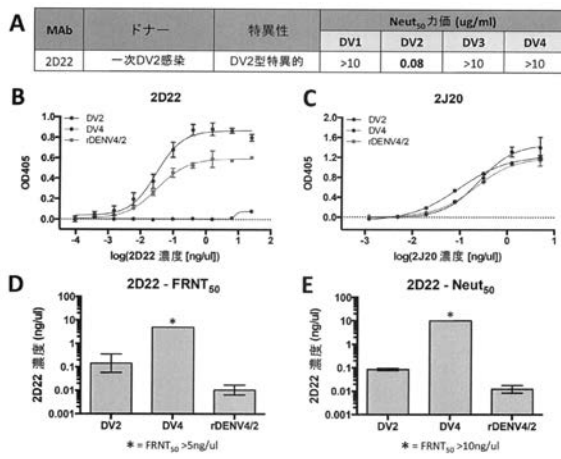


FIG. 30

【 図 3 1 】

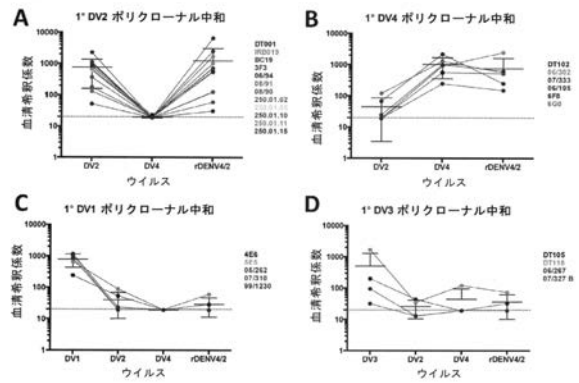


FIG. 31



【配列表】

2018500878000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.  PCT/US 2015/058610
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  (see extra sheet)  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 19/00, 14/18, C12N 7/00, 15/62, A61K 39/295, G01N 33/68, 33/569, 33/53, A61P 31/14  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)  CIPO, DEPATISNET, DWPLEAPATIS, EMBL, EPO-Internal, ESP@CE, ESP@CENET, KIPRIS,PAJ, PubMed, RUPTO, SCIENCE DIRECT, SIPO, USPTO,WIPO		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	CLAIRE Y.-H. HUANG et al. Chimeric Dengue Type 2 (Vaccine Strain PDK-53)/Dengue Type 1 Virus as a Potential Candidate Dengue Type 1 Virus Vaccine, JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2000, Vol. 74, no.7, p. 3020-3028	10 1, 2, 6, 7, 11, 13-51 3-5, 8, 9, 12
Y	WO 2013/151764 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 10.10.2013, p.37, claims	1, 2, 6, 7, 11, 13-51
Y	WILLIAM B. MESSER et al. Development and Characterization of a Reverse Genetic System for Studying Dengue Virus Serotype 3 Strain Variation and Neutralization, PLOS, February 2012, Vol. 6, Issue 2 , e1486, p.1-12	1, 2, 6, 7, 11, 13-51
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 document 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  22 January 2016 (22.01.2016)		Date of mailing of the international search report  31 March 2016 (31.03.2016)
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, Russia, 125993 Facsimile No: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Authorized officer  O.Fedonova  Telephone No. 495 531 65 15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 2015/058610

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

According to Rule 13 of the Regulations under the PCT the claimed inventions does not meet the requirement of unity of invention, therefore independent claims 1,6,10 and 13-51 form several groups of inventions, which are not so linked as to form a single general inventive concept.

The special technical feature of independent claims 1 (completely) and 13-24(all partially), 25, 28, 31, 34, 37 40, 43, 46, 49 (all completely) is a chimeric dengue virus E glycoprotein comprising a dengue virus E glycoprotein backbone that comprises amino acid substitutions that introduce an epitope that is recognized by an antibody that is reactive with a dengue virus serotype, wherein the dengue virus E glycoprotein backbone is from dengue virus serotype 4 and the antibody is reactive with dengue virus serotype 3.

The special technical feature of independent claims 6 (completely) and 13-24(all partially), 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50(all completely) is a chimeric dengue virus E glycoprotein comprising a dengue virus E glycoprotein backbone that comprises amino acid substitutions that introduce a protein domain from a dengue virus, wherein the dengue virus E glycoprotein backbone is from dengue virus serotype 4 and the protein domain is from dengue virus serotype 2.

The special technical feature of independent claims 10 (completely) and 13-24(all partially), 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51 (all completely) is a chimeric dengue virus E glycoprotein comprising a dengue virus E glycoprotein backbone that comprises amino acid substitutions that introduce an epitope that is recognized by an antibody that is reactive with a dengue virus serotype, wherein the dengue virus E glycoprotein backbone is from dengue virus serotype 2 and the antibody is reactive with dengue virus serotype 1.

Hence, claims comprise 3 groups of inventions, namely:

- 1 invention – claims 1- 5 (all completely), 13-24(all partially), 25, 28, 31, 34, 37 40, 43, 46, 49(all completely).
- 2 invention – claims 6-9(all completely), 13-24(all partially), 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50(all completely).
- 3 invention – claims 10-12(all completely), 13-24(all partially), 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51 (all completely).

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Classification of subject matter

International application No.

PCT/US 2015/058610

*C07K 19/00 (2006.01)*  
*C07K 14/18 (2006.01)*  
*C12N 7/00 (2006.01)*  
*C12N 15/62 (2006.01)*  
*C12N 15/40 (2006.01)*  
*A61K 39/295 (2006.01)*  
*G01N 33/68 (2006.01)*  
*G01N 33/569 (2006.01)*  
*G01N 33/53 (2006.01)*  
*A61P 31/14 (2007.01)*

## 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 14/18 (2006.01)	C 0 7 K 14/18	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	

(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 100142996

弁理士 森本 聡二

(74) 代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74) 代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74) 代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(72) 発明者 バリック, ラルフ

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 2 5 8 - 9 5 2 9, ホー・リヴァー, ノース・ストリーム・コート 2 6 0 0

(72) 発明者 ウィドマン, ダグラス

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 5 1 0, カーボロ, タングルウッド・レイン 1 1 1

(72) 発明者 ヨーント, ボイド

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 2 7 8, ヒルズボロ, スコッツバーグ・トレイル 1 0 0 2

(72) 発明者 ガリチョット, エミリー

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 5 1 0, カーボロ, バーンズ・ストリート 2 0 0, アパートメント B 7

(72) 発明者 ロイヤル, スコット

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 5 1 0, カーボロ, ジョーンズ・フェリー・ロード 6 0 5, アpartment S S 0 2

(72) 発明者 デシルヴァ, アラヴィンダ

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 5 1 4, チャペル・ヒル, ホイッスリング・トゥリー・コート 1 0 2

(72) 発明者 スワンストローム, ジェシカ

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 5 6 0, モリスヴィル, ヘンビー・リッジ・レイン 1 3 0 1

F ターム(参考) 4B063 QA01 QQ03 QQ10 QQ79 QR16 QR72 QS11 QS33 QS40 QX01

4B065 AA95X AA95Y AB01 BA01 CA45

4C085 AA04 BA51 CC05 DD23 DD88 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA01 DA86 EA31 EA53 FA74

专利名称(译)	用于疫苗和诊断开发的重组登革病毒的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018500878A</a>	公开(公告)日	2018-01-18
申请号	JP2017523804	申请日	2015-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校		
申请(专利权)人(译)	盐湖城OVU北卡罗来纳在教堂山分校		
[标]发明人	バリックラルフ ウイドマンダグラス ヨートボイド ガリチョットエミリー ロイヤルスコット デシルヴァアラヴィンダ スワンストロームジェシカ		
发明人	バリック,ラルフ ウイドマン,ダグラス ヨート,ボイド ガリチョット,エミリー ロイヤル,スコット デシルヴァ,アラヴィンダ スワンストローム,ジェシカ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/295 A61K39/12 A61P31/14 C07K19/00 C07K14/18 C12N7/01 C12Q1/70 C12N7/04 G01N33/53 A01K67/027		
CPC分类号	A61K39/12 A61P31/14 C07K14/005 C07K16/1063 C07K2317/21 C07K2319/40 C12N2770/24122 C12N2770/24134 C12N2770/24171 G01N33/56983 G01N2333/18 G01N2469/20 Y02A50/386 Y02A50/53 A61K2039/5258 A61K2039/575 C12N7/00 C12N2770/24123 G01N2333/185		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/295 A61K39/12 A61P31/14 C07K19/00 C07K14/18 C12N7/01 C12Q1/70 C12N7/04 G01N33/53.N A01K67/027		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR72 4B063/QS11 4B063/QS33 4B063/QS40 4B063/QX01 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA45 4C085/AA04 4C085/BA51 4C085/CC05 4C085/DD23 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	中村綾子 田中宇 徳本光一		
优先权	62/074053 2014-11-02 US		
其他公开文献	JP2018500878A5 JP6671364B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种嵌合的登革热病毒E糖蛋白，其包含具有氨基酸取代的登革热病毒E糖蛋白主链，所述氨基酸取代引入被抗体识别的表位，所述表位衍生自不同于登革热病毒E糖蛋白主链的登革热病毒血清型。提供了包括和使用方法的组合物。

