(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월16일
(11) 등록번호 10-2165384
(24) 등록일자 2020년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) *A61K 39/42* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/10 (2013.01)
A61K 39/42 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7004551
(22) 출원일자(국제) 2013년07월25일
심사청구일자 2018년07월24일
(85) 번역문제출일자 2015년02월24일
(65) 공개번호 10-2015-0039782
(43) 공개일자 2015년04월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/052062
(87) 국제공개번호 WO 2014/025546
국제공개일자 2014년02월13일
(30) 우선권주장
61/680,385 2012년08월07일 미국(US)
61/780,209 2013년03월13일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20120014945 A1
J Biotechnol. 1999 Apr 15,69(2-3):183-90.

(73) 특허권자
메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77
(72) 발명자
사시세카란, 람
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, 메사추세츠 애버뉴 76-461 77
로빈슨, 루크, 나타니엘
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, #117, 메사추세츠 애버뉴 888
타라카라만, 칸난
미국, 메사추세츠 02474, 알링턴, 바이킹 씨티. #52 6
(74) 대리인
강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 1 항 심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **항-뎅기 바이러스 항체 및 이들의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 그 중에서도 특히, DV 에피토프에 결합하는 항체 작용제 (가령, 항체, 및/또는 이들의 항원-결합 단편)뿐만 아니라 이들을 내포하는 조성물 및 이들을 설계하고, 제공하고, 조제하고, 이용하고, 확인하고 및/또는 특징짓는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 복수의 DV 혈청형에 유의미한 결합을 보여주는 항체 작용제가 제공된다. 일부 구체예에서, 4가지 모든 DV 혈청형에 유의미한 결합을 보여주는 항체 작용제가 제공된다. 이런 항체 작용제는 예로서, DV의 예방, 치료, 진단, 및/또는 연구에서 유용하다.

(52) CPC특허분류
C07K 2317/50 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

중쇄가 서열 번호 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하고 경쇄가 서열 번호 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련된 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에, 2012년 8월 7일자 제출된 미국 가출원 번호 61/680,385, 그리고 2013년 3월 13일자 제출된 미국 가출원 번호 61/780,209에 우선권을 주장하고, 이들 각각의 내용은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0003] **정부 지원**

[0004] 본 발명은 국립보건원에 의해 수여된 보조금 번호 R37 GM057073 하에 정부 지원을 받아 만들어졌다. 정부는 본 발명에서 일정한 권리를 갖는다.

[0005] **서열 목록**

[0006] 본 명세서는 서열 목록 (2013년 7월 25일자에 "서열 목록.txt"로 명명된 .txt 파일로서 전자적으로 제출됨)을 참조한다. 상기 .txt 파일은 2013년 7월 22일자에 산출되었고 크기에서 12.6 kb이다. 서열 목록의 전체 내용은 본원에서 참조로서 편입된다.

배 경 기 술

[0007] **배경**

[0008] 뎅기 바이러스 (DV)는 바이러스 패밀리 플라비비리대 (*Falviviridae*)의 구성원이고 속 아에데스 내에 여러 종의 모기, 주로 아에데스 아에집티 (*Aedes aegypti*)에 의해 사람들에게 전염된다. 전 세계적으로 3.6 십억 이상의 사람들이 DV로 감염되는 위험에 처해있고, 그리고 200 백만 건보다 많은 DV 감염이 전 세계적으로 매년 일어나는 것으로 추정된다 (McBride et al., 2000 Microbes & Infection 2:1041-1050, Guzman et al., 2010 Nature Rev. Microbiol. 8:S7-16). 뎅기열은 인간에서 가장 의학적으로 유관한 아르보바이러스 질환이다. 발생률에서 유의미한 증가, 지리학적 봉사활동, 그리고 뎅기의 질환 사례의 심각도는 DV를 주요 인간 병원체로서 만든다. 유감스럽게도, 효과적인 치료적 섭생은 현재 가용하지 않다; 가장 효과적인 현재 예방 조치는 모기 통제에 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] **요약**

[0010] 본 발명은 DV 감염의 치료 및/또는 예방을 위한 방법과 조성물을 제공한다. 그 중에서도 특히, 본 발명은 4가지 모든 DV 혈청형을 중화시키는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 참고 항체 4E11의 변이체이다; 일부 이런 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 4E11의 아미노산 서열, 또는 유관한 이의 단편과 높은 전반적인 서열 동일성을 보여주는 아미노산 서열을 갖지만, 4E11과 비교하여 특정한 서열 변이를 포함하고 4E11에 대해 관찰된 것과 비교하여 최소한 하나의 DV 혈청형의 중화에서 유의미한 향상을 보여준다.

[0011] 본 발명은 참고 항체 4E11이 4가지 모든 DV 혈청형에 결합하고 4가지 DV 혈청형 중에서 3가지의 유력한 중화 능력을 갖는 것을 비롯하여 일정한 바람직한 속성을 갖지만, 네 번째 DV 혈청형을 효과적으로 중화시키는 능력을 결여한다는 통찰력을 제공한다. 본 발명은 이러한 네 번째 DV 혈청형을 효과적으로 중화시키는 4E11의 능력 없

음의 문제의 출처를 확인한다. 특히, 본 발명은 변경을 결여하는 4E11의 능력과 비교하여, 서열이 유관한 DV 혈청형을 중화시키는 변형(들)을 내포하는 항체 작용제의 능력을 향상시키는 구조적 특질 변형을 규정한다. 본 발명은 이런 이유로, 유관한 구조적 특질 변형을 포함하는 (하지만, 만약 그렇지 않으면, 4E11의 것과 실제적으로 동일하다) 구조를 갖고, 그리고 DV 혈청형 4 (DV4)를 중화시키는 능력에 의해 특징되는 항체를 규정하고 제공한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 4E11의 것과 비교하여 유의미하게 감소되지 않은 다른 3가지 DV 혈청형 각각을 중화시키는 능력을 보여준다. 실제로, 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 4E11로 관찰된 것과 비교하여, 다른 3가지 DV 혈청형 (DV1-4) 중에서 하나 또는 그 이상에 대하여 중화 능력에서 놀라운 증가에 의해 특징된다.

[0012] 본 발명은 다른 활성을 보존하는데 필요한 구조적 특질을 유지하면서, 폴리펩티드에 관심되는 생물학적 활성을 부여하는 구조적 변형을 규정하기 위한 기술을 제공한다.

[0013] 일부 구체예에서, 본 발명은 DV 에피토프에 결합하는 항체 작용제뿐만 아니라 이들을 내포하는 조성물 및 이들을 설계하고, 제공하고, 조제하고, 이용하고, 확인하고 및/또는 특징짓는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 복수의 DV 혈청형에 유의미한 결합을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 4가지 모든 DV 혈청형에 유의미한 결합을 보여준다. 제공된 항체 작용제는 예로서, DV의 예방, 치료, 진단, 및/또는 연구에서 유용하다.

[0014] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하나 또는 그 이상의 이전에-설명된 참고 항-DV 항체와 교차-경쟁한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 서열 번호 17 (EDIII-DV1), 서열 번호 18 (EDIII-DV2), 서열 번호 19 (EDIII-DV3), 서열 번호 20 (EDIII-DV4) 및/또는 이들의 조합 내에 아미노산 서열 또는 이를 포함하는 에피토프에 결합한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하나 또는 그 이상의 특정 이전에-설명된 항-DV 항체와 유의미하게 교차-경쟁하지 않는다.

[0015] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하나 또는 그 이상의 이전에-설명된 참고 항-DV 항체보다 더욱 큰 효능으로, 확립된 모델 시스템에서 DV를 중화시킨다. 본 발명은 그 중에서도 특히, 제공된 항체 작용제가 이전에-설명된 항-DV 항체보다 더욱 큰 치료적 및/또는 예방적 이익을 제공할 수 있다는 인식을 포괄한다.

[0016] 제공된 항체 작용제는 예로서, 치료적, 예방적, 진단적, 및/또는 연구 적용을 비롯한 다양한 상황에서 유용하다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 예로서, 만성 및/또는 급성 DV 감염으로 고통받거나 또는 이것에 감수성인 개체에 하나 또는 그 이상의 이런 제공된 항체 작용제의 치료 효과량을 투여함으로써 만성 및/또는 급성 DV 감염의 치료에서 유용하다. 일부 구체예에서, 치료 효과량은 (i) DV 감염에 감수성인 또는 DV 감염으로 고통받는 개체에서 DV 감염의 심각도 또는 빈도를 감소시키고, 및/또는 DV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상 또는 특징의 시작 또는 재출현을 지연하고; 및/또는 (ii) DV 감염에 노출된 또는 노출될 위험에 처해있는 개체에서 DV 감염의 위험 및/또는 DV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상 또는 특징의 진전을 감소시키는 것이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 하나 또는 그 이상의 특정 생물학적 효과를 달성하는데 충분한 양이다. 일부 구체예에서, DV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상 또는 특징은 높은 열 및 예로서, 심각한 두통, 심각한 눈 통증, 관절 통증, 근육 통증, 뼈 통증, 발진, 경미한 출혈 현시 (가령, 코 또는 잇몸 출혈, 점상 출혈, 쉬운 타박상), 복통, 구토, 흑색, 타르변, 졸음 또는 자극감수성, 창백한, 차가운 또는 냉습 피부, 호흡 어려움, 낮은 백혈구수, 개체에서 또는 이의 하나 또는 그 이상의 조직 (가령, 혈액, 골수) 또는 장기 (가령, 간)에서 순환하는 바이러스 입자에서 선택되는 최소한 하나 또는 그 이상의 추가 증상이거나 또는 이들을 포함한다. 일부 구체예에서, DV 감염으로 고통받는 개체는 높은 열 및 최소한 2개의 이런 추가 증상을 전시한다.

[0017] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 DV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상 또는 특징을 예방하고, 이들의 재발을 감소시키고, 및/또는 이들의 시작을 지연시키는데 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 예로서, 최근에 DV에 노출된 또는 DV에 노출될 위험에 처해있는 개체, DV-양성 모체로부터 태어난 신생아, 및/또는 간이식 환자 (가령, 이런 환자에서 가능한 재발성 DV 감염을 예방하기 위해)의 수동 면역화에 이용될 수 있다.

[0018] 일부 구체예에서, 본 발명은 구조가 예로서, 바이러스 모방 작용제가 유관한 DV 항원의 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성을 모방할 수 있도록 허용하는데 충분한, 일정한 DV 항원의 하나 또는 그 이상의 보존된 원소를 포함하는 바이러스 모방 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 이런 바이러스 모방 작용제는 예로서 본원에서 규정된 바와 같이, DV 항원의 이런 보존된 구조적 원소를 포함하고, 그리고 DV 항원의 하나 또는 그 이상의 다른 구조적 원소를 결여한다. 일부 구체예에서, 제공된 바이러스 모방 작용제는 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 바이러스 모방 작용제 폴리펩티드는 DV 항원으로부터 하나

또는 그 이상의 보존된 서열 원소를 포함하는 아미노산 서열을 갖는다; 일부 구체예에서, 제공된 바이러스 모방 작용제 폴리펩티드는 DV 항원으로부터 하나 또는 그 이상의 다른 서열 원소를 결여한다. 예로서, 일부 구체예에서, 제공된 바이러스 모방 작용제 폴리펩티드는 DV 항원의 단편이거나 또는 이들을 포함한다.

[0019] 일부 구체예에서, 본 발명은 DV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상의 진전 후 활용되는, 처치의 치료적 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상의 진전에 앞서, 및/또는 DV에 노출, DV 감염, 또는 이의 위험에 앞서 활용되는, 예방의 치료 방법을 제공한다. 일부 특정 구체예에서, 본 발명은 수동 면역화 기술을 제공한다.

[0020] 일부 구체예에서, 본 발명은 시료, 예를 들면, 임상적, 환경적, 및/또는 연구 시료에서 DV를 검출하는 및/또는 만약 그렇지 않으면, 이들 시료를 특징짓는 진단적 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명은 유용한 항-DV 항체 작용제를 설계하고, 확인하고, 및/또는 특징짓기 위한 시스템을 제공한다. 예로서, 일부 구체예에서, 본 발명은 단백질 경계면에 공통적인 특정 물리화학적 특질을 포획하는 실험적 계산적 접근법을 제공한다. 일부 구체예에서, 이런 접근법은 예로서, 어떤 아미노산 서열이 특히 높은 상호작용 친화성을 보여줄지를 예측하는 것을 비롯하여, 단백질-단백질 상호작용 (가령, 항원-항체 상호작용)의 예측을 허용한다. 일부 구체예에서, 제공된 접근법은 참고 서열과 상이하고, 그리고 단백질-단백질 상호작용에 관하여 하나 또는 그 이상의 향상된 특징 (가령, 향상된 친화성)을 보여주는 서열을 설계하고, 확인하고, 및/또는 특징짓는데 유용하게 적용된다.

[0022] 본 발명은 DV에 대한 면역학적 반응에 기초하여 환자를 계층화하기 위한 시스템을 제공한다. 본 발명은 DV 면역요법에 잘 응답할 것 같은 환자를 확인하기 위한 방법을 제공한다. 예로서, DV의 특정 에피토프 (가령, 제공된 항체 작용제가 특이적으로 결합하는 에피토프)에 대한 항체의 존재를 검사하기 위해 환자의 혈청이 이용될 수 있다. 환자가 이런 에피토프에 대한 적합한 수준의 항체를 갖지 않으면, 하나 또는 그 이상의 제공된 DV 항체 작용제가 환자에 투여될 수 있다. 환자의 자체 면역 반응은 제공된 DV 항체 작용제로 보충될 수 있다. 일부 구체예에서, 면역요법은 DV 바이러스의 청소 및/또는 DV 감염의 해결을 보조한다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 면역요법은 만성 DV 감염을 치료하고 및/또는 예방한다.

[0023] 일부 구체예에서, 본 발명은 유용한 항체 작용제를 설계하고, 확인하고 및/또는 특징짓는 방법을 제공한다. 예로서, 일부 구체예에서, 이런 방법은 검사 항체 작용제가 하나 또는 그 이상의 참고 항-DV 항체 및/또는 다른 항체 작용제와 항원 결합에 대해 경쟁하는 지를 결정하는 것을 수반한다. 일부 구체예에서, 검사 항체 작용제는 하나 또는 그 이상의 참고 DV 항체와 교차-경쟁하면, 유용한 항체 작용제로서 확인된다.

[0024] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 제약학적 조성물을 제공하기 위해, 하나 또는 그 이상의 추가 제약학적으로 허용되는 물질과 합동된다. 본 발명은 DV 감염의 치료, 예방, 진단 및/또는 특성화를 위한 제약학적 조성물을 제공한다.

[0025] 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 예로서, 임의의 DV 혈청형에 결합하고 시험관내에서 DV 감염을 중화시키는 인간 항체 또는 이들의 단편 또는 변이체이거나 또는 이들을 포함하는 항체 작용제를 포함한다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 예로서, 임의의 DV 혈청형에 결합하고 생체내에서 DV 감염을 중화시키는 인간 항체 또는 이들의 단편 또는 변이체이거나 또는 이들을 포함하는 항체 작용제를 포함한다. 일부 구체예에서, 시험관내 시스템에서 제공된 항체 작용제에 의한 DV 중화는 생체내에서 (가령, 인간 및/또는 다른 포유동물에서), 제공된 항체 작용제에 의한 DV 중화와 상관적 및/또는 예측적이다.

[0026] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 DV 감염 또는 이의 하나 또는 그 이상의 증상 또는 특징을 치료하고, 이의 발생률, 빈도, 또는 심각도를 감소시키고, 및/또는 이의 시작을 지연하기 위해 하나 또는 그 이상의 다른 요법과 함께 활용될 수 있다. 예로서, 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하나 또는 그 이상의 항바이러스제, 항염증제, 진통제, 면역제어 치료제 및 복합 요법과 함께 활용되고, 이것은 바람직하게는, 다른 DV 표적을 수반한다. 예로서, 일부 구체예에서, 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하나 또는 그 이상의 인터페론 (가령, 인터페론 α-2b, 인터페론-γ, 등), 진통제 (바람직하게는, 아세트아미노펜을 내포하는 아스피린 및/또는 이부프로펜을 내포하지 않음), 항-DV 단일클론 항체, 항-DV 다중클론 항체, RNA 중합효소 저해제, 단백질분해효소 저해제, 뉴클레오시드 유사체, 헬리카아제 저해제, 면역조절제, 안티센스 화합물, 짧은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로 RNA (miRNA), RNA 앱타머, 리보자임, 그리고 이들의 조합과 합동으로 투여된다.

[0027] 따라서, 일부 구체예에서, 본 발명은 뎅기 바이러스 혈청형 D1, D2, D3, 그리고 D4 각각에 결합하고 이들을 중

화시키는 항체 작용제를 특이적으로 제공한다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 서열 번호 17 (EDIII-DV1), 서열 번호 18 (EDIII-DV2), 서열 번호 19 (EDIII-DV3), 서열 번호 20 (EDIII-DV4), 또는 이들의 조합 내에 아미노산 서열 또는 이를 포함하는 에피토프에 결합한다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 뎅기 바이러스의 외피 당단백질의 A-가닥 영역에서 에피토프에 결합한다.

[0028] 일부 구체예에서, 에피토프는 서열 번호 17-20 중에서 임의의 한 가지의 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 323, 325, 327, 329, 360, 361, 362, 363, 364, 385, 387, 388, 389, 390, 391, 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 잔기에 상응하는 하나 또는 그 이상의 잔기를 포함한다. 일부 구체예에서, 위치 305에서 상응하는 잔기는 세린, 리신, 그리고 트레오닌으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 위치 310에서 상응하는 잔기는 리신이다. 일부 구체예에서, 위치 311에서 상응하는 잔기는 리신이다. 일부 구체예에서, 위치 323에서 상응하는 잔기는 아르기닌, 리신, 그리고 글루타민으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 위치 327에서 상응하는 잔기는 리신과 글루탐산염으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 위치 329에서 상응하는 잔기는 아르기닌, 아스파르트산염, 글루탐산염, 그리고 트레오닌으로 구성된 군에서 선택된다.

[0029] 일부 구체예에서, 본 발명은 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역이 참고 항체 4E11의 CDR과 최소한 80% 서열 동일성을 공유하는 최소한 하나의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하지만, 상기 CDR 내에 최소한 하나의 아미노 잔기의 치환에 의해 다른 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 항체 4E11의 참고 CDR과 동일하거나 또는 이런 참고 CDR 내에 아미노산의 1 내지 5개 치환을 포함한다는 점에서, 항체 4E11의 참고 CDR과 실제적으로 동일한 최소한 하나의 CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, 참고 CDR은 4E11 중쇄 (서열 번호 1)의 잔기 27과 33 사이에서 발견된 것; 4E11 중쇄 (서열 번호 1)의 잔기 53과 58 사이에서 발견된 것; 4E11 중쇄 (서열 번호 1)의 잔기 100과 106 사이에서 발견된 것; 4E11 경쇄 (서열 번호 2)의 잔기 24과 38 사이에서 발견된 것; 4E11 경쇄 (서열 번호 2)의 잔기 54와 60 사이에서 발견된 것; 4E11 경쇄 (서열 번호 2)의 잔기 93과 101 사이에서 발견된 것; 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 하기에 진술된 참고 CDR과 동일하거나 또는 이런 참고 CDR 내에 아미노산의 1 내지 5개 치환을 포함한다는 점에서, 하기에 진술된 참고 CDR과 실제적으로 동일한 최소한 하나의 CDR을 포함한다: GFNIKDT (서열 번호 7), DPANGD (서열 번호 8), GWEGFAY (서열 번호 9), RASENVDRYGNSFMH (서열 번호 14), RASNLES (서열 번호 15), 및/또는 QRSNEVPWT (서열 번호 16). 일부 구체예에서, 참고 CDR은 중쇄 CDR이다. 일부 구체예에서, 참고 CDR은 경쇄 CDR이다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 중쇄 참고 CDR과 실제적으로 동일한 최소한 하나의 중쇄 CDR을 포함하고, 그리고 또한, 경쇄 참고 CDR과 동일한 최소한 하나의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체 작용제에서 각 CDR은 참고 CDR 중에서 한 가지와 실제적으로 동일하다.

[0030] 일부 구체예에서, 본 발명은 중쇄 가변 영역이 참고 항체 4E11의 CDR과 최소한 95% 서열 동일성을 공유하는 최소한 하나의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하지만, 상기 CDR 내에 최소한 하나의 아미노산 잔기의 치환에 의해 다른 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 항체 4E11의 참고 CDR과 동일하거나 또는 이런 참고 CDR 내에 아미노산의 1 내지 5개 치환을 포함한다는 점에서, 항체 4E11의 참고 CDR과 실제적으로 동일한 최소한 하나의 CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, 참고 CDR은 4E11 중쇄 (서열 번호 1)의 잔기 27과 33 사이에서 발견된 것; 4E11 중쇄 (서열 번호 1)의 잔기 53과 58 사이에서 발견된 것; 4E11 중쇄 (서열 번호 1)의 잔기 100과 106 사이에서 발견된 것; 4E11 경쇄 (서열 번호 2)의 잔기 24과 38 사이에서 발견된 것; 4E11 경쇄 (서열 번호 2)의 잔기 54와 60 사이에서 발견된 것; 4E11 경쇄 (서열 번호 2)의 잔기 93과 101 사이에서 발견된 것; 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 하기에 진술된 참고 CDR과 동일하거나 또는 이런 참고 CDR 내에 아미노산의 1 내지 5개 치환을 포함한다는 점에서, 하기에 진술된 참고 CDR과 실제적으로 동일한 최소한 하나의 CDR을 포함한다: GFNIKDT (서열 번호 7), DPANGD (서열 번호 8), GWEGFAY (서열 번호 9), RASENVDRYGNSFMH (서열 번호 14), RASNLES (서열 번호 15), 및/또는 QRSNEVPWT (서열 번호 16). 일부 구체예에서, 참고 CDR은 중쇄 CDR이다. 일부 구체예에서, 참고 CDR은 경쇄 CDR이다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 중쇄 참고 CDR과 실제적으로 동일한 최소한 하나의 중쇄 CDR을 포함하고, 그리고 또한, 경쇄 참고 CDR과 동일한 최소한 하나의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체 작용제에서 각 CDR은 참고 CDR 중에서 한 가지와 실제적으로 동일하다. 일부 구체예에서, 중쇄 가변 영역 CDR은 위치 55에서 아미노산 잔기의 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 위치 55에서 대용품 아미노산은 글루탐산염과 아스파르트산염으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 경쇄 가변 영역 CDR은 31, 57, 59, 60, 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 위치에서 아미노산 잔기의 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 위치 31에서 대용품 아미노산 잔기는 리신이다. 일부 구체예에서, 위치 57에서 대용품 아미노산 잔기는 글루탐산염과 세린으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 위치 59에서 대용품 아미노산 잔기는 글루타민과 아스파라긴으로 구성된 군에서 선

택된다. 일부 구체예에서, 위치 60에서 대용품 아미노산 잔기는 트립토판, 티로신, 그리고 아르기닌으로 구성된 군에서 선택된다.

[0031] 일부 구체예에서, 본 발명은 IgG인 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 단일클론 항체이다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 생쥐 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 정제된 항체, 단리된 항체, 키메라 항체, 다중클론 항체, 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 항체 작용제가 제공되고, 여기서 항원 결합 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fd 단편, Fd' 단편, Fv 단편, dAb 단편, scFv 단편, 단리된 CDR 영역, dsFv 디아바디, 단일 사슬 항체, 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다.

[0032] 일부 구체예에서, 본 발명은 뎅기 바이러스에 특이적인 항체 작용제를 발현하는 세포주를 제공하고, 여기서 항체 작용제는 뎅기 바이러스 혈청형 D1, D2, D3, 그리고 D4 각각에 결합하고 이들을 중화시킨다. 일부 구체예에서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 항체 작용제 및 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제약학적 조성물을 제공하고, 여기서 항체 작용제는 뎅기 바이러스 혈청형 D1, D2, D3, 그리고 D4 각각에 결합하고 이들을 중화시킨다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 최소한 하나의 추가 항바이러스제를 더욱 포함한다.

[0033] 일부 구체예에서, 본 발명은 치료가 필요한 개체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 항체 작용제를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 항체 작용제는 뎅기 바이러스 혈청형 D1, D2, D3, 그리고 D4 각각에 결합하고 이들을 중화시킨다. 일부 구체예에서, 본 발명은 최소한 하나의 항체 작용제; 개체에 최소한 하나의 항체 또는 단편의 투여를 위한 주사기, 바늘, 또는 살포기; 그리고 사용설명서를 포함하는 키트를 제공하고, 여기서 항체 작용제는 뎅기 바이러스 혈청형 D1, D2, D3, 그리고 D4 각각에 결합하고 이들을 중화시킨다.

[0034] 일부 구체예에서, 본 발명은 제약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 항체 작용제를 제공하는 단계, 여기서 항체 작용제는 뎅기 바이러스 혈청형 D1, D2, D3, 그리고 D4 각각에 결합하고 이들을 중화시키고; 그리고 항체 작용제를 최소한 하나의 제약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 조제하여, 제약학적 조성물을 산출하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 액체 조성물이다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 비경구 투여를 위해 조제된다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 정맥내 투여를 위해 조제된다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 아동에 정맥내 투여를 위해 조제된다.

도면의 간단한 설명

[0035] **도면의 간단한 설명**

도면의 도형은 제한이 아닌, 단지 예시를 목적으로 한다.

도면 1: 도면 1은 예측 정확도에 대한 윈도우 크기의 효과를 도시한다. 윈도우 크기는 예측된 양성의 숫자를 나타낸다. 예측 정확도는 정확하게 예측된 검사 사례 구조의 숫자 (전체 37)에 의해 결정된다. 윈도우 크기가 1일 때 (즉, 101개 구조 중에서 1개가 양성인 것으로 예측될 때), x-선 구조의 거의 절반 (48% ~ 37개 중에서 18개)이 정확하게 확인되고, 이의 이항식 확률은 이들 구조가 무작위로 선택되면, 1.46E-26 (n=37, p=0.009, 성공의 숫자 = 18)이다. MLR-방법의 예측 정확도는 윈도우 크기의 대수적으로 증가하는 함수인 것으로 보이는데, 정확도는 윈도우 크기 5에서 85% 및 윈도우 크기 10에서 100%에 도달한다. 이에 반하여, ZRANK는 심지어 윈도우 크기가 20일 때에도, 이들 구조의 100%를 예측하지 못한다.

도면 2: 도면 2A-C는 국부 검색의 도킹 결과를 예시한다. 이러한 사정을 위해, 선천적-유사 구조는 고정된 수용체의 7 Å 내에 있는 리간드 원자에 대해 계산된, x-선 구조에서 리간드로부터 3보다 작은 옹스트롬 (Å) RMSD을 갖는 것으로 규정된다. RMSD > 3 Å를 갖는 구조는 비-선천적 구조로서 지칭된다. (A) 표면 플롯 상에서 각 점은 도킹 미끼를 나타낸다. x-축은 ZRANK 점수를 보여준다; y-축은 x-선 구조에 대한 RMSD (Å 단위)를 나타낸다; Z 축은 MLR 기초된 예측 확률을 나타낸다. 선천적-유사 구조의 ZRANK 점수는 -60 내지 -30 Kcal/몰 사이에서 변한다. (B) ZRANK 점수 (x-축)와 RMSD (y-축) 사이에 상관. 부점 원 내부에 데이터 점은 선천적 x-선 구조에 가깝다. (C) MLR-기초된 확률과 RMSD 사이에 상관. 예측 확률 대 RMSD 사이에는 유의미한 상관이 있지만, ZRANK와 RMSD 사이에는 이런 상관이 존재하지 않는다.

도면 3: 도면 3은 4E11 항체의 친화성과 시험관내 활성을 설명한다.

도면 4: 도면 4는 항체 설계 접근법의 흐름도를 도시한다.

도면 5: 도면 5는 고정된 EDIII 상에서 상위 5개 도킹 모델의 중첩을 설명한다. EDIII 도메인은 구체로서 표시된다; 4E11, 각 모델에서 표면으로서 전시됨.

도면 6: 도면 6A-B는 불량한 DV4 결합의 서열과 구조적 결정인자를 예시한다. (A) 4가지 혈청형의 EDIII 도메인 영역의 서열 정렬. 추정 mAb 결합 잔기는 회색으로 음영된다. 307, 329, 361, 364, 385, 388과 390에서 잔기는 DV4를 나머지 서열과 구별짓는다; 이들은 넘버링된다. 5개 mAb 돌연변이에 의해 만들어진 잔기 접촉은 상자로 표시된다. 특히, 6개 새로운 접촉 중에서 5개는 A & B 가닥의 보존된 에피토프 잔기에 대항하여 형성된다. 이것은 이들 새로운 돌연변이가 DV1-3 결합에 유해하지 않은 이유를 설명한다. (B) 4E11/EDIII 상호작용의 구조적 모델. DV4를 다른 균주로부터 구별짓는 서열 위치는 표지화되고, 그리고 그 안에 아미노산의 측쇄는 스틱으로서 표시된다.

도면 7: 도면 7은 친화성-증강 돌연변이가 4E11:EDIII-DV4 경계면의 주변에 국부화한다는 것을 설명한다. 결합 스크린에서 확인된 양성 위치는 4E11:EDIII-DV4 상호작용의 구조적 모델에서 강조되고 도시된다. 모든 양성 돌연변이는 결합 경계면의 주변에 위치된다. 2개의 패널은 동일한 모델의 상이한 보기를 나타낸다. 각 패널에서 EDIII (위쪽), VH (오른쪽), 그리고 VL (왼쪽) 단백질이 각각 표시된다.

도면 8: 도면 8A-H는 DV1-4의 항원 EDIII를 갖는 4E11 WT와 4E5A의 표면 플라스몬 공명 (SPR) 센소그램을 도시한다.

도면 9: 도면 9는 병변 감소 중화 검사 (FRNT)에 의해 사정된 항체의 시험관내 중화 활성을 예시한다. 중화 검정은 DV1-4 및 항체 4E11 WT, m4E11 WT, 4E5A, 그리고 4G2로 수행되었다. 항체의 연속 희석액은 동등한 양의 바이러스와 혼합되고, 그리고 점성 오버레이를 갖는 Vero 세포 단층에 첨가되었다. 4-6 일 후, 세포는 고정되고, 그리고 병변은 면역염색되고 계수되었다. 데이터 점은 복제물의 평균을 나타내고 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 표준 4-파라미터 로지스틱 모델은 최소 자승 회귀를 이용하여 데이터에 적합되었다. 4E5A는 DV1-3에 대한 4E11과 m4E11과 유사한 중화 활성 및 DV4에 대한 중화 활성에서 실제적인 증가를 보여준다. 대표적인 플라비바이러스 융합-루프 특이적 항체인 4G2는 4E5A에 비하여, DV1-3에 대한 더욱 낮은 중화 활성 및 DV4에 대한 단지 약간 더 높은 활성을 나타낸다.

도면 10: 도면 10은 생체내 예방적 DV2 공격 모델을 도시한다. 데이터는 바이러스 공격 후 3 일자에 AF129 생쥐의 혈청에서 바이러스를 보여준다. 생쥐는 바이러스 공격 하루 전에, AB1 또는 위약으로 처리되었다. 이들 생쥐의 혈청으로부터 추출된 RNA는 QRT-PCR에 의해 증폭되고, 그리고 근사 $Log_{10}CCID_{50}$ 역가는 공지된 역가의 시료로부터 채취된 대조 RNA로부터 곡선에 기초하여 외삽되었다. 파선은 검출의 근사 한계를 나타낸다.

도면 11: 도면 11은 파라토프와 에피토프에서 아미노산 빈도를 설명한다. 77개 항원-항체 복합체로부터 산출된 데이터.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] **정의**

[0037] 본 발명이 더욱 쉽게 이해되도록 하기 위해, 일정한 용어가 먼저 하기에 규정된다; 당업자는 하기에 규정된 바와 같은 및/또는 만약 그렇지 않으면, 본원에서 이용된 바와 같은 이들 용어의 이용과 범위를 인지하고 이해할 것이다.

[0038] *성인*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "성인"은 18 세 또는 더욱 나이든 인간을 지칭한다. 성인 사이에 체중은 폭넓게 변할 수 있는데, 전형적인 범위는 90 파운드 내지 250 파운드이다.

[0039] *친화성*: 당분야에 공지된 바와 같이, "친화성"은 특정 리간드 (가령, 항체)가 상대 (가령, 에피토프)에 결합하는 견고함의 척도이다. 친화성은 상이한 방식으로 계량될 수 있다.

[0040] *아미노산*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "아미노산"은 가장 넓은 의미에서, 폴리펩티드 사슬 내로 통합될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 지칭한다. 일부 구체예에서, 아미노산은 일반적 구조 H_2N-C(H)(R)-COOH를 갖는다. 일부 구체예에서, 아미노산은 자연 발생 아미노산이다. 일부 구체예에서, 아미노산은 합성 아미노산이다; 일부 구체예에서, 아미노산은 d-아미노산이다; 일부 구체예에서, 아미노산은 l-아미노산이다. "표준 아미노산"은 자연 발생 펩티드에서 통상적으로 발견되는 20개 표준 l-아미노산 중에서 한 가지를 지칭한다. "비표준 아미노산"은 합성적으로 제조되거나 또는 자연 공급원으로부터 획득되는 지에 상관없이, 표준 아미노산 이외에, 임의의 아미노산을 지칭한다. 본원에서 이용된 바와 같이, "합성 아미노산"은 염, 아미노산 유도체

(가령, 아미드), 및/또는 치환이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 화학적으로 변형된 아미노산을 포괄한다. 펩티드에서 카르복시- 및/또는 아미노-말단 아미노산을 비롯한 아미노산은 메틸화, 아미드화, 아세틸화, 보호기, 및/또는 활성에 부정적으로 영향을 주지 않으면서 펩티드의 순환 반감기를 변화시킬 수 있는 다른 화학적 기로 치환에 의해 변형될 수 있다. 아미노산은 이황화 결합에 참여할 수 있다. 아미노산은 번역후 변형 중에서 한 가지, 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 화학적 실체 (가령, 메틸 기, 아세트산염 기, 아세틸 기, 인산염 기, 포르밀 모이어티, 이소프레노이드 기, 황산염 기, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티, 지질 모이어티, 탄수화물 모이어티, 비오틴 모이어티 등)와의 연관을 포함할 수 있다. 용어 "아미노산"은 "아미노산 잔기"와 교체 가능하게 이용되고, 그리고 유리 아미노산 및/또는 펩티드의 아미노산 잔기를 지칭할 수 있다. 상기 용어가 유리 아미노산 또는 펩티드의 잔기를 지칭하는 지에 상관없이 이용된다는 것은 문맥으로부터 명백할 것이다.

[0041] *동물:* 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "동물"은 동물 왕국의 임의의 구성원을 지칭한다. 일부 구체예에서, "동물"은 어느 한쪽 성별 및 임의의 발달 시기의 인간을 지칭한다. 일부 구체예에서, "동물"은 임의의 발달 시기의 비-인간 동물을 지칭한다. 일정한 구체예에서, 비-인간 동물은 포유동물 (가령, 설치류, 생쥐, 쥐, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류, 및/또는 돼지)이다. 일부 구체예에서, 동물에는 포유동물, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 곤충, 및/또는 기생충이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 일정한 구체예에서, 동물은 DV에 의한 감염에 감수성이다. 일부 구체예에서, 동물은 유전자도입 동물, 유전적으로 조작된 동물, 및/또는 클론일 수도 있다.

[0042] *항체 작용제*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "항체 작용제"는 특정 항원에 특이적으로 결합하는 작용제를 지칭한다. 일부 구체예에서, 상기 용어는 특이적 결합을 부여할 만큼 충분한 면역글로불린 구조적 원소를 갖는 임의의 폴리펩티드를 포괄한다. 적합한 항체 작용제에는 인간 항체, 영장류화 항체, 키메라 항체, 이중-특이적 항체, 인간화 항체, 접합된 항체 (즉, 다른 단백질, 방사성표지, 세포독소에 접합된 또는 융합된 항체), Small Modular ImmunoPharmaceuticals ("SMIPs™"), 단일 사슬 항체, 카멜로이드 항체, 그리고 항체 단편이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "항체 작용제"는 또한, 원하는 생물학적 활성을 전시하기만 하면, 무손상 단일클론 항체, 다중클론 항체, 단일 도메인 항체 (가령, 상어 단일 도메인 항체 (가령, IgNAR 또는 이의 단편)), 최소한 2개의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (가령, 이중-특이적 항체), 그리고 항체 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 용어는 스테이플식 펩티드를 포괄한다. 일부 구체예에서, 상기 용어는 하나 또는 그 이상의 항체-유사 결합 펩티드모방체를 포괄한다. 일부 구체예에서, 상기 용어는 하나 또는 그 이상의 항체-유사 결합 골격 단백질을 포괄한다. 일부 구체예에서, 상기 용어는 모노바디 또는 아드넥틴을 포괄한다. 많은 구체예에서, 항체 작용제는 아미노산 서열이 당업자에 의해 상보성 결정 영역 (CDR)으로 인식되는 하나 또는 그 이상의 구조적 원소를 포함하는 폴리펩티드이거나 또는 이를 포함한다; 일부 구체예에서, 항체 작용제는 아미노산 서열이 참고 항체에서 발견된 것과 실제적으로 동일한 최소한 하나의 CDR (가령, 최소한 하나의 중쇄 CDR 및/또는 최소한 하나의 경쇄 CDR)을 포함하는 폴리펩티드이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 포함된 CDR은 참고 CDR과 비교하여 서열에서 동일하거나 또는 1개 내지 5개 아미노산 치환을 내포한다는 점에서, 참고 CDR과 실제적으로 동일하다. 일부 구체예에서, 포함된 CDR은 참고 CDR과 최소한 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 보인다는 점에서, 참고 CDR과 실제적으로 동일하다. 일부 구체예에서, 포함된 CDR은 참고 CDR과 최소한 96%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 보인다는 점에서, 참고 CDR과 실제적으로 동일하다. 일부 구체예에서, 포함된 CDR은 포함된 CDR 내에 최소한 하나의 아미노산이 참고 CDR과 비교하여 삭제되거나, 부가되거나, 또는 치환되지만, 포함된 CDR이 다른 모든 면에서 참고 CDR의 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는다는 점에서, 참고 CDR과 실제적으로 동일하다. 일부 구체예에서, 포함된 CDR은 포함된 CDR 내에 1-5개 아미노산이 참고 CDR과 비교하여 삭제되거나, 부가되거나, 또는 치환되지만, 포함된 CDR이 다른 모든 면에서 참고 CDR과 동일한 아미노산 서열을 갖는다는 점에서, 참고 CDR과 실제적으로 동일하다. 일부 구체예에서, 포함된 CDR은 포함된 CDR 내에 최소한 하나의 아미노산이 참고 CDR과 비교하여 치환되지만, 포함된 CDR이 다른 모든 면에서 참고 CDR의 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는다는 점에서, 참고 CDR과 실제적으로 동일하다. 일부 구체예에서, 포함된 CDR은 포함된 CDR 내에 1-5개 아미노산이 참고 CDR과 비교하여 삭제되거나, 부가되거나, 또는 치환되지만, 포함된 CDR이 다른 모든 면에서 참고 CDR과 동일한 아미노산 서열을 갖는다는 점에서, 참고 CDR과 실제적으로 동일하다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 아미노산 서열이 당업자에 의해 면역글로불린 가변 도메인으로서 인식된 구조적 원소를 포함하는 폴리펩티드이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 면역글로불린-결합 도메인에 상동성이거나 또는 대체로 상동성인 결합 도메인을 갖는 폴리펩티드 단백질이다.

[0043] *항체:* 당분야에 공지된 바와 같이, "항체"는 특정 항원에 특이적으로 결합하는 면역글로불린이다. 상기 용어는

항원에 반응하는 생물체에 의해 산출된다는 점에서 자연적으로 생산되는 면역글로불린, 그리고 또한, 합성적으로 생산되거나 또는 가공된 면역글로불린을 포괄한다. 항체는 단일클론 또는 다중클론일 수 있다. 항체는 인간 부류: IgG, IgM, IgA, 그리고 IgD 중에서 한 가지를 포함하는 임의의 면역글로불린 부류의 구성원일 수 있다. 당분야에서 이해되는 바와 같은 전형적인 면역글로불린 (항체) 구조적 단위는 사합체를 포함하는 것으로 알려져 있다. 각 사합체는 폴리펩티드 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되고, 각 쌍은 1개의 "경쇄" (대략 25 kD) 및 1개의 "중쇄" (대략 50-70 kD)를 갖는다. 각 사슬의 N-말단은 항원 인식을 일차적으로 책임지는 약 100 내지 110개 또는 그 이상 아미노산의 가변 영역을 규정한다. 용어 "가변 경쇄"(VL)와 "가변 중쇄"(VH)는 이들 경쇄와 중쇄 각각을 지칭한다. 각 가변 영역은 초가변 (HV) 영역과 프레임워크 (FR) 영역으로 더욱 세분된다. 초가변 영역은 베타-시트 구조를 형성하고, 그리고 HV 영역을 정위시키는 골격으로서 역할하는 4개의 프레임워크 영역 (FR1, FR2, FR2, 그리고 FR4)에 의해 분리된, 상보성 결정 영역으로 불리는 초가변성 서열의 3개 구역 (CDR 1, CDR 2와 CDR 3)을 포함한다. 각 중쇄와 경쇄의 C-말단은 경쇄의 경우에 1개의 도메인 (CL) 및 중쇄의 경우에 3개의 도메인 (CH1, CH2와 CH3)으로 구성되는 불변 영역을 규정한다. 일부 구체예에서, 용어 "전장"은 항체에 관하여, 자연적으로-생산된 항체에서 일어나는 바와 같이 이황화 결합에 의해 임의선택적으로 연관된 2개의 중쇄와 2개의 경쇄를 내포하는 것을 의미하기 위해 이용된다. 일부 구체예에서, 항체는 세포에 의해 생산된다. 일부 구체예에서, 항체는 화학적 합성에 의해 생산된다. 일부 구체예에서, 항체는 포유동물로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 항체는 동물, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 생쥐, 쥐, 말, 돼지, 또는 염소로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 항체는 재조합 세포 배양 시스템을 이용하여 생산된다. 일부 구체예에서, 항체는 정제된 항체 (예로서, 면역-친화성 크로마토그래피에 의해)일 수 있다. 일부 구체예에서, 항체는 인간 항체일 수 있다. 일부 구체예에서, 항체는 인간화 항체 (인간에서 자연적으로 생산된 항체 변이체에 대한 유사성을 증가시키기 위해 단백질 서열이 변형된 비-인간 종으로부터 항체)일 수 있다. 일부 구체예에서, 항체는 키메라 항체 (비-인간 공급원, 예를 들면, 생쥐, 쥐, 말, 또는 돼지로부터 유전 물질을 인간으로부터 유전 물질과 합동함으로써 만들어진 항체)일 수 있다.

[0044] *항체 단편*: 본원에서 이용된 바와 같이, "항체 단편"은 무손상 항체의 부분, 예를 들면, 예로서, 항체의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 실례에는 Fab, Fab', F(ab')2, 그리고 Fv 단편; 트리아바디; 테트라바디; 선형 항체; 단일 사슬 항체 분자; 그리고 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체가 포함된다. 예로서, 항체 단편은 단리된 단편, 중쇄와 경쇄의 가변 영역으로 구성되는 "Fv" 단편, 경쇄와 중쇄 가변 영역이 펩티드 링커에 의해 연결된 재조합 단일 사슬 폴리펩티드 분자 ("ScFv 단백질"), 그리고 초가변 영역을 모방하는 아미노산 잔기로 구성되는 최소 인식 단위를 포함한다. 많은 구체예에서, 항체 단편은 부모 항체에서와 동일한 항원에 결합하는 단편인, 부모 항체의 충분한 서열을 내포한다; 일부 구체예에서, 단편은 부모 항체의 것에 필적하는 친화성으로 항원에 결합하고 및/또는 항원에 결합에 대해 부모 항체와 경쟁한다. 항체의 항원 결합 단편의 실례에는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, scFv 단편, Fv 단편, dsFv 디아바디, dAb 단편, Fd' 단편, Fd 단편, 그리고 단리된 상보성 결정 영역 (CDR) 영역이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 항체의 항원 결합 단편은 임의의 수단에 의해 생산될 수 있다. 예로서, 항체의 항원 결합 단편은 무손상 항체의 단편화에 의해 효소적으로 또는 화학적으로 생산되고 및/또는 부분적인 항체 서열을 인코딩하는 유전자로부터 재조합적으로 생산될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 항체의 항원 결합 단편은 전체적으로 또는 부분적으로 합성적으로 생산될 수 있다. 항체의 항원 결합 단편은 단일 사슬 항체 단편을 임의선택적으로 포함할 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 항체의 항원 결합 단편은 예로서, 이황화 연쇄에 의해 함께 연결된 복수의 사슬을 포함할 수 있다. 항체의 항원 결합 단편은 다분자 복합체를 임의선택적으로 포함할 수 있다. 기능적 항체 단편은 전형적으로, 최소한 약 50개 아미노산을 포함하고, 그리고 더욱 전형적으로, 최소한 약 200개 아미노산을 포함한다.

[0045] *항바이러스제*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "항바이러스제 "는 바이러스 입자를 저해하거나, 불활성화시키거나, 또는 파괴함으로써 바이러스 감염을 치료하기 위해 특이적으로 이용된 한 부류의 약제를 지칭한다. 일반적으로, 항바이러스제는 임의의 화학적 부류의 화합물 (가령, 소형 분자, 금속, 핵산, 폴리펩티드, 지질 및/또는 탄수화물)이거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 항바이러스제는 항체 또는 항체 모방체이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 항바이러스제는 핵산 작용제 (가령, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA 등) 또는 이의 모방체이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 항바이러스제는 소형 분자이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 항바이러스제는 자연 발생 화합물 (가령, 소형 분자)이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 항바이러스제는 인간의 손에 의해 산출된 및/또는 변형된 화학적 구조를 갖는다.

[0046] *대략*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "대략" 또는 "약"은 관심되는 하나 또는 그 이상의 값에 적용될 때, 언급된 기준값과 유사한 값을 지칭한다. 일정한 구체예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 명시되거나 또는 문맥

으로부터 달리 명백하지 않으면, 언급된 기준값의 어느 한쪽 방향 (보다 큰 또는 보다 적은)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 이하 내에 속하는 값의 범위를 지칭한다 (이런 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우를 제외하고).

[0047] *아기:* 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "아기"는 2세 이하의 인간을 지칭한다. 아기에 대한 전형적인 체중은 3 파운드 내지 20 파운드의 범위에서 변한다.

[0048] *생물학적으로 활성*: 본원에서 이용된 바와 같이, 관용구 "생물학적으로 활성"은 생물학적 시스템 (가령, 세포 배양, 생물체 등)에서 활성을 갖는 임의의 물질의 특징을 지칭한다. 예로서, 생물체에 투여될 때, 상기 생물체에 대한 생물학적 효과를 갖는 물질은 생물학적으로 활성인 것으로 고려된다. 단백질 또는 폴리펩티드가 생물학적으로 활성인 특정 구체예에서, 상기 단백질 또는 폴리펩티드의 최소한 하나의 생물학적 활성을 공유하는 단백질 또는 폴리펩티드의 부분은 전형적으로, "생물학적으로 활성" 부분으로 지칭된다.

[0049] *특징적인 부분*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "특징적인 부분"은 가장 넓은 의미에서, 물질의 존재 (또는 부재)가 상기 물질의 특정 특질, 속성, 또는 활성의 존재 (또는 부재)와 상관하는 물질의 부분을 지칭하는데 이용된다. 일부 구체예에서, 물질의 특징적인 부분은 상기 물질에서 및 특정 특질, 속성 또는 활성을 공유하는 관련된 물질에서 발견되지만, 특정 특질, 속성 또는 활성을 공유하지 않는 것들에서 발견되지 않는 부분이다. 일정한 구체예에서, 특징적인 부분은 무손상 물질과 최소한 하나의 기능적 특징을 공유한다. 예로서, 일부 구체예에서, 단백질 또는 폴리펩티드의 "특징적인 부분"은 단백질 또는 폴리펩티드를 함께 특징짓는 아미노산의 연속성 스트레치, 또는 아미노산의 연속성 스트레치의 수집물을 내포하는 것이다. 일부 구체예에서, 각 이런 연속성 스트레치는 일반적으로, 최소한 2, 5, 10, 15, 20, 50개, 또는 그 이상 아미노산을 내포한다. 일반적으로, 물질 (가령, 단백질, 항체 등)의 특징적인 부분은 상기 특정된 서열 및/또는 구조적 동일성에 더하여, 유관한 무손상 물질과 최소한 하나의 기능적 특징을 공유하는 것이다. 일부 구체예에서, 특징적인 부분은 생물학적으로 활성일 수 있다.

[0050] *아동*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "아동"은 2 세와 18 세 사이에 인간을 지칭한다. 체중은 연령과 특정한 아동에 걸쳐 폭넓게 변할 수 있고, 전형적인 범위는 30 파운드 내지 150 파운드이다.

[0051] *복합 요법:* 용어 "복합 요법"은 본원에서 이용된 바와 같이, 2가지 또는 그 이상의 상이한 제약학적 작용제가 중복 섭생으로 투여되고, 따라서 개체가 양쪽 작용제에 동시에 노출되는 환경을 지칭한다.

[0052] *필적하는:* 용어 "필적하는"은 획득된 결과 또는 관찰된 현상의 비교를 허용할 만큼 서로에 충분히 유사한 조건 또는 환경의 2가지 (또는 그 이상) 세트를 설명하기 위해 본원에서 이용된다. 일부 구체예에서, 조건 또는 환경의 필적하는 세트는 복수의 실제적으로 동일한 특질 및 1가지 또는 적은 숫자의 변화된 특질에 의해 특징된다. 당업자는 조건 또는 환경의 상이한 세트 하에 획득된 결과 또는 관찰된 현상에서 차이가 변화된 특질에서 변이에 의해 유발되거나 또는 변이를 지시한다는 합리적인 결론을 보증하는 충분한 숫자와 유형의 실제적으로 동일한 특질에 의해 특징될 때, 조건의 세트가 서로에 필적한다는 것을 인지할 것이다.

[0053] *에 상응하는*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "에 상응하는"은 관심되는 폴리펩티드에서 아미노산 잔기의 위치/동일성을 명명하는데 종종 이용된다. 당업자는 단순함을 위해, 폴리펩티드에서 잔기가 종종, 참고 관련된 폴리펩티드에 기초된 정준 넘버링 시스템을 이용하여 지정되고, 따라서 위치 190에서 잔기"에 상응하는" 아미노산이 예로서, 특정 아미노산 사슬에서 실질적으로 190번째 아미노산일 필요가 없고, 오히려 참고 폴리펩티드에서 위치 190에서 발견된 잔기에 상응한다는 것을 인지할 것이다; 당업자는 "상응하는" 아미노산을 확인하는 방법을 쉽게 인지한다.

[0054] *약형:* 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "약형"과 "단위 약형"은 치료되는 환자에 대한 치료적 단백질 (가령, 항체)의 물리적으로 구별된 단위를 지칭한다. 각 단위는 원하는 치료 효과를 생산하도록 계산된 활성 물질의 미리 결정된 양을 내포한다. 하지만, 조성물의 전체 용량은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 주치의에 의해 결정될 것으로 이해될 것이다.

[0055] *투약 섭생:* "투약 섭생" (또는 "치료적 섭생")은 본원에서 이용된 바와 같이, 전형적으로 기간에 의해 분리된, 개체에 개별적으로 투여된 한 세트의 단위 복용 (전형적으로 하나 이상)이다. 일부 구체예에서, 제공된 치료제는 권장된 투약 섭생을 갖는데, 이것은 1회 또는 그 이상의 복용을 수반할 수 있다. 일부 구체예에서, 투약 섭생은 복수의 복용을 포함하고, 이들 각각은 동일한 길이의 기간에 의해 서로로부터 분리된다; 일부 구체예에서, 투약 섭생은 복수의 복용 및 개별 복용을 분리하는 최소한 2개의 상이한 기간을 포함한다. 일부 구체예에서, 투약 섭생 내에 모든 복용은 동일한 단위 복용량이다. 일부 구체예에서, 투약 섭생 내에 상이한 복용은 상이한 양

이다. 일부 구체예에서, 투약 섭생은 첫 번째 복용량에서 첫 번째 복용, 그 이후에 첫 번째 복용량과 상이한 두 번째 복용량에서 1회 또는 그 이상의 추가 복용을 포함한다. 일부 구체예에서, 투약 섭생은 첫 번째 복용량에서 첫 번째 복용, 그 이후에 첫 번째 복용량과 동일한 두 번째 복용량으로 1회 또는 그 이상의 추가 복용을 포함한다.

[0056] *DV 혈청형:* 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "혈청형"은 일반적으로, DV 내에 상이한 변이를 지칭한다. DV 유전자 군을 포함하는 4가지 상이한 DV 혈청형 (DV1-4)은 아미노산 수준에서 서로 대략 25% 내지 40% 상이하다. DV의 4가지 혈청형은 병원성에서 변하지만, 이들 모두 아시아, 아프리카, 중앙아메리카와 남아메리카 지역에서 만연하다. 이들 혈청형 중에서 한 가지로 감염은 상기 혈청형에 대한 평생 면역성을 제공하긴 하지만, 이종유래 DV 혈청형으로부터 이차 감염 시에 심각한 질환의 위험 역시 증가시킨다.

[0057] *에피토프:* 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "에피토프"는 당분야에서 이해되는 바와 같은 의미를 갖는다. 항원 결정인자로도 알려져 있는 에피토프는 면역계, 구체적으로 항체, B 세포, 또는 T 세포에 의해 인식되는 항원의 분자 영역인 것으로 당업자에 의해 인지될 것이다. 에피토프는 당, 지질, 또는 아미노산으로 구성될 수 있는 것으로 더욱 인지될 것이다. 단백질 항원의 에피토프는 그들의 구조 및 파라토프 (에피토프를 인식하는 항체의 부분)와의 상호작용에 기초하여, 2가지 범주, 입체형태적 에피토프와 선형 에피토프로 나눠진다. 입체형태적 에피토프는 항원의 아미노산 서열의 불연속적 절편으로 구성되고, 그리고 이들 에피토프는 항원의 3-D 표면 특질과 모양 또는 삼차 구조에 기초하여 파라토프와 상호작용한다. 선형 에피토프는 그들의 일차 구조에 기초하여 파라토프와 상호작용하고, 그리고 선형 에피토프는 항원으로부터 아미노산의 연속성 서열에 의해 형성된다.

[0058] *발현*: 본원에서 이용된 바와 같이, 핵산 서열의 "발현"은 하기 이벤트 중에서 하나 또는 그 이상을 지칭한다: (1) DNA 서열로부터 RNA 주형의 생산 (가령, 전사에 의해); (2) RNA 전사체의 처리 (가령, 스플라이싱, 편집, 5' 캡 형성, 및/또는 3' 단부 형성에 의해); (3) RNA의 폴리펩티드 또는 단백질로의 번역; 및/또는 (4) 폴리펩티드 또는 단백질의 번역후 변형.

[0059] *기능적*: 본원에서 이용된 바와 같이, "기능적" 생물학적 분자는 자신이 특징화되는 성질 및/또는 활성을 전시하는 형태에서 생물학적 분자이다.

[0060] *유전자*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "유전자"는 당분야에서 이해되는 바와 같은 의미를 갖는다. 용어 "유전자"는 유전자 조절 서열 (가령, 프로모터, 인핸서 등) 및/또는 인트론 서열을 포함할 수 있는 것으로 당업자에 의해 인지될 것이다. 유전자의 정의는 단백질을 인코딩하지 않고, 오히려 기능적 RNA 분자를 인코딩하는 핵산, 예를 들면, tRNA, RNAi-유도제 등에 대한 참조를 포함하는 것으로 더욱 인지될 것이다. 명료함을 위해, 본 출원에서 이용된 바와 같이, 용어 "유전자"는 일반적으로, 단백질을 인코딩하는 핵산의 부분을 지칭하는 것으로 생각된다; 상기 용어는 당업자에게 문맥으로부터 명백한 바와 같이, 조절 서열을 임의선택적으로 포괄할 수 있다. 이러한 정의는 비-단백질-코딩 발현 단위에 용어 "유전자"의 적용을 배제하는 것으로 의도되지 않고, 오히려 많은 경우에, 본 문서에서 이용된 바와 같은 상기 용어가 단백질-코딩 핵산을 지칭한다는 것을 명확하게 하기 위한 것으로 의도된다.

[0061] *유전자 산물* 또는 *발현 산물*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "유전자 산물" 또는 "발현 산물"은 일반적으로, 유전자로부터 전사된 RNA (처리전 및/또는 처리후) 또는 유전자로부터 전사된 RNA에 의해 인코딩된 폴리펩티드 (변형전 및/또는 변형후)를 지칭한다.

[0062] *상동성*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "상동성"은 중합성 분자 사이에, 예를 들면, 핵산 분자 (가령, DNA 분자 및/또는 RNA 분자) 사이에 및/또는 폴리펩티드 분자 사이에 전반적인 관련성을 지칭한다. 일부 구체예에서, 중합성 분자는 그들의 서열이 최소한 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하면, 서로에 "상동성"인 것으로 고려된다. 일부 구체예에서, 중합성 분자는 그들의 서열이 최소한 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 유사하면, 서로에 "상동성"인 것으로 고려된다.

[0063] *동일성*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "동일성"은 중합성 분자 사이에, 예를 들면, 핵산 분자 (가령, DNA 분자 및/또는 RNA 분자) 사이에 및/또는 폴리펩티드 분자 사이에 전반적인 관련성을 지칭한다. 두 핵산 서열의 퍼센트 동일성의 계산은 예로서, 최적 비교 목적을 위해 이들 두 서열을 정렬함으로써 수행될 수 있다 (가령, 최적 정렬을 위해 첫 번째와 두 번째 핵산 서열 중에서 한쪽 또는 양쪽에 간극이 도입될 수 있고, 그리고 비-동일한 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 일정한 구체예에서, 비교 목적을 위해 정렬된 서열의 길이는 참고 서열의 길이의 최소한 30%, 최소한 40%, 최소한 50%, 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 80%, 최소한 90%,

최소한 95%, 또는 실제적으로 100%이다. 상응하는 뉴클레오티드 위치에서 뉴클레오티드는 이후 비교된다. 첫 번째 서열에서 위치가 두 번째 서열에서 상응하는 위치와 동일한 뉴클레오티드에 의해 점유되면, 이들 분자는 상기 위치에서 동일하다. 두 서열 사이에 퍼센트 동일성은 이들 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입되어야 하는 간극의 숫자, 그리고 각 간극의 길이를 고려하여, 이들 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 숫자의 함수이다. 서열의 비교 및 두 서열 사이에 퍼센트 동일성의 결정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 예로서, 두 뉴클레오티드 서열 사이에 퍼센트 동일성은 Meyers와 Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17)의 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있는데, 이것은 PAM120 중량 잔기 표, 12의 간극 길이 페널티 및 4의 간극 페널티를 이용한 ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 통합되었다. 두 뉴클레오티드 서열 사이에 퍼센트 동일성은 대안으로, NWSgapdna.CMP 매트릭스를 이용한 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다.

[0064] *단리된*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "단리된"은 (1) 최초 생산될 때 (자연에서 및/또는 실험적 세팅인지에 상관없이) 연관된 성분의 적어도 일부로부터 분리되고, 및/또는 (2) 인간의 손에 의해 생산된, 준비된, 및/또는 제조된 물질 및/또는 실체를 지칭한다. 단리된 물질 및/또는 실체는 그들이 초기에 연관된 다른 성분의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 이상으로부터 분리될 수 있다. 일부 구체예에서, 단리된 작용제는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 이상 순수하다. 본원에서 이용된 바와 같이, 물질은 다른 성분이 실질적으로 없으면, "순수"하다. 본원에서 이용된 바와 같이, 단리된 물질 및/또는 실체의 퍼센트 순도의 계산은 부형제 (가령, 완충액, 용매, 물 등)을 포함하지 않아야 한다.

[0065] *미모토프*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "미모토프"는 에피토프의 구조를 모방하는 거대 분자를 지칭한다. 일부 구체예에서, 미모토프는 상응하는 에피토프에 의해 유도된 것과 동일한 또는 유사한 항체 반응을 이끌어낸다. 일부 구체예에서, 에피토프를 인식하는 항체는 또한, 상기 에피토프를 모방하는 미모토프를 인식한다. 일부 구체예에서, 미모토프는 펩티드이다. 일부 구체예에서, 미모토프는 소형 분자, 탄수화물, 지질, 또는 핵산이다. 일부 구체예에서, 미모토프는 보존된 DV 에피토프의 펩티드 또는 비-펩티드 미모토프이다. 일부 구체예에서, 규정된 바이러스 에피토프의 구조를 모방함으로써, 미모토프는 예로서, 자연 결합 상대 그 자체에 결합함으로써, 자연 결합 상대 (가령, DV 표적 수용체, Rab5, GRP78)에 결합하는 DV 바이러스 입자의 능력을 간섭한다.

[0066] *돌연변이체*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "돌연변이체"는 참고 실체와 유의미한 구조적 동일성을 보여주지만, 참고 실체와 비교하여 하나 또는 그 이상의 화학적 모이어티의 존재 또는 수준에서 참고 실체와 구조적으로 다른 실체를 지칭한다. 많은 구체예에서, 돌연변이체는 또한, 참고 실체와 기능적으로 다르다. 일반적으로, 특정 실체가 참고 실체의 "돌연변이체"인 것으로 적절하게 고려되는 지의 여부는 참고 실체와 구조적 동일성의 정도에 기초된다. 당업자가 인지되는 바와 같이, 임의의 생물학적 또는 화학적 참고 실체는 일정한 특징적인 구조적 원소를 갖는다. 돌연변이체는 정의에 의해, 하나 또는 그 이상의 이런 특징적인 구조적 원소를 공유하는 상이한 화학적 실체이다. 몇 가지 실례를 들자면, 소형 분자는 특징적인 코어 구조적 원소 (가령, 거대고리 코어) 및/또는 하나 또는 그 이상의 특징적인 펜던트 모이어티를 가질 수 있고, 따라서 소형 분자의 돌연변이체는 코어 구조적 원소 및 특징적인 펜던트 모이어티를 공유하지만, 다른 펜던트 모이어티에서 및/또는 코어 내에 존재하는 결합의 유형 (단일 대 이중, E 대 Z 등)에서 다른 것이고, 폴리펩티드는 선형 또는 3-차원 공간에서 서로에 상대적인 지정된 위치를 갖고 및/또는 특정 생물학적 기능에 기여하는 복수의 아미노산으로 구성된 특징적인 서열 원소를 가질 수 있고, 핵산은 선형 또는 3-차원 공간에서 서로에 상대적인 지정된 위치를 갖는 복수의 뉴클레오티드 잔기로 구성된 특징적인 서열 원소를 가질 수 있다. 예로서, 돌연변이체 폴리펩티드는 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 차이 및/또는 폴리펩티드 중추에 공유적으로 부착된 화학적 모이어티 (가령, 탄수화물, 지질 등)에서 하나 또는 그 이상의 차이의 결과로서 참고 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, 돌연변이체 폴리펩티드는 최소한 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 99%인, 참고 폴리펩티드와 전반적인 서열 동일성을 보여준다. 대안으로 또는 부가적으로, 일부 구체예에서, 돌연변이체 폴리펩티드는 참고 폴리펩티드와 최소한 하나의 특징적인 서열 원소를 공유하지 않는다. 일부 구체예에서, 참고 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성을 갖는다. 일부 구체예에서, 돌연변이체 폴리펩티드는 참고 폴리펩티드의 생물학적 활성 중에서 하나 또는 그 이상을 공유한다. 일부 구체예에서, 돌연변이체 폴리펩티드는 참고 폴리펩티드의 생물학적 활성 중에서 하나 또는 그 이상을 결여한다. 일부 구체예에서, 돌연변이체 폴리펩티드는 참고 폴리펩티드와 비교하여 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성의 감소된 수준을 보여준다.

[0067] *핵산*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "핵산"은 가장 넓은 의미에서, 올리고뉴클레오티드 사슬이거나 또는 올리고뉴클레오티드 사슬 내로 통합될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 지칭한다. 일부 구체예에서, 핵산은 올리고뉴클레오티드 사슬이거나 또는 포스포디에스테르 연쇄를 거쳐 올리고뉴클레오티드 사슬 내로 통합될 수 있는 화합물 및/또는 물질이다. 일부 구체예에서, "핵산"은 개별 핵산 잔기 (가령, 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드)를 지칭한다. 일부 구체예에서, "핵산"은 개별 핵산 잔기를 포함하는 올리고뉴클레오티드 사슬을 지칭한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "올리고뉴클레오티드"와 "폴리뉴클레오티드"는 교체 가능하게 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, "핵산"은 RNA 뿐만 아니라 단일 및/또는 이중 가닥 DNA 및/또는 cDNA를 포괄한다. 게다가, 용어 "핵산," "DNA," "RNA," 및/또는 유사한 용어는 핵산 유사체, 다시 말하면, 포스포디에스테르 중추 이외에 것을 갖는 유사체를 포함한다. 예로서, 당분야에 공지되고 중추 내에 포스포디에스테르 결합 대신에 펩티드 결합을 갖는 소위 "펩티드 핵산"은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려된다. 용어 "아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열"은 서로의 축퇴 이형이고 및/또는 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 및/또는 RNA를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 인트론을 포함할 수 있다. 핵산은 자연 공급원으로부터 정제되고, 재조합 발현 시스템을 이용하여 생산되고, 그리고 임의선택적으로 정제되고, 화학적으로 합성되고 기타 등등일 수 있다. 적절한 경우에, 예를 들면, 화학적으로 합성된 분자의 경우에, 핵산은 뉴클레오시드 유사체, 예를 들면, 화학적으로 변형된 염기 또는 당, 중추 변형 등을 갖는 유사체를 포함할 수 있다. 핵산 서열은 달리 지시되지 않으면, 5'에서 3' 방향으로 제공된다. 용어 "핵산 분절"은 더욱 긴 핵산 서열의 부분인 핵산 서열을 지칭하기 위해 본원에서 이용된다. 많은 구체예에서, 핵산 분절은 최소한 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 이상 잔기를 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산은 자연 뉴클레오시드 (가령, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 데옥시아데노신, 데옥시티미딘, 데옥시구아노신, 그리고 데옥시시티딘); 뉴클레오시드 유사체 (가령, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오르우리딘, C5-요오드우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-데아자아데노신, 7-데아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, O(6)-메틸구아닌, 그리고 2-티오시티딘); 화학적으로 변형된 염기; 생물학적으로 변형된 염기 (가령, 메틸화된 염기); 개재된 염기; 변형된 당 (가령, 2'-플루오르리보오스, 리보오스, 2'-데옥시리보오스, 아라비노오스, 그리고 헥소오스); 및/또는 변형된 인산염 기 (가령, 포스포로티오에이트와 5'-*N*-포스포라미디트 연쇄)이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 구체적으로, 전달을 용이하게 하거나 또는 달성하기 위해 화학적으로 변형되지 않은 핵산 (가령, 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드를 포함하는 폴리뉴클레오티드와 잔기)을 의미하는 "변형되지 않은 핵산"에 관계한다.

[0068] *환자:* 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "환자" 또는 "개체"는 제공된 조성물이 예로서, 실험적, 진단적, 예방적, 미용적, 및/또는 치료적 목적을 위해 투여될 수 있는 임의의 생물체를 지칭한다. 전형적인 환자에는 동물 (가령, 포유동물, 예를 들면, 생쥐, 쥐, 토끼, 비-인간 영장류, 및/또는 인간)이 포함된다. 일부 구체예에서, 환자는 인간이다. 인간은 출생 전후에 형태를 포함한다.

[0069] *제약학적으로 허용되는*: 용어 "제약학적으로 허용되는"은 본원에서 이용된 바와 같이, 합리적인 이익/위험 비율에 비례하여, 과잉의 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 건전한 의학적 판단의 범위 내에, 인간과 동물의 조직과 접촉하여 이용하기 적합한 물질을 지칭한다.

[0070] *제약학적으로 허용되는 담체:* 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "제약학적으로 허용되는 담체"는 제약학적으로-허용되는 물질, 조성물 또는 운반제, 예를 들면, 주제 화합물을 신체의 한 장기, 또는 부분으로부터 신체의 다른 장기, 또는 부분으로 운반하거나 또는 수송하는 것에 관련된 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 또는 용매 피막화 물질을 의미한다. 각 담체는 제제의 다른 성분과 양립성이고 환자에 해롭지 않다는 의미에서 "허용"되어야 한다. 제약학적으로-허용되는 담체로서 역할할 수 있는 물질의 일부 실례에는 당, 예를 들면, 락토오스, 글루코오스와 수크로오스; 전분, 예를 들면, 옥수수 전분과 감자 전분; 셀룰로오스, 그리고 이의 유도체, 예를 들면, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스와 셀룰로오스 아세트산염; 분말화된 트래거캔스; 맥아; 젤라틴; 활석; 부형제, 예를 들면, 코코아 버터와 좌약 왁스; 기름, 예를 들면, 땅콩 기름, 목화씨 기름, 홍화 기름, 참기름, 올리브 기름, 옥수수 기름과 콩 기름; 글리콜, 예를 들면, 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예를 들면, 글리세린, 소르비톨, 만니톨과 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예를 들면, 에틸 올레산염과 에틸 라우린산염; 한천; 완충제, 예를 들면, 마그네슘 수산화물과 알루미늄 수산화물; 알긴산; 발열원-없는 물; 등장성 식염수; 링거용액; 에틸 알코올; pH 완충된 용액; 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리무수물; 그리고 제약학적 제제에서 이용된 다른 비독성 양립성 물질이 포함된다.

[0071] *제약학적 조성물*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "제약학적 조성물"은 하나 또는 그 이상의 제약학적으로 허용되는 담체와 함께 조제된 활성제를 지칭한다. 일부 구체예에서, 활성제는 유관한 개체군에 투여될 때 미리 결정된 치료 효과를 달성하는 통계학적으로 유의한 확률을 보이는 치료적 섭생에서 투여에 적합한 단위 복용량으로 존재한다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 다음을 위해 적합된 것들을 비롯하여, 고체 또는 액체 형태에서 투여를 위해 특별히 조제된다: 경구 투여, 예로 들면, 드렌치 (수성 또는 비-수성 용액 또는 현탁액), 정제, 예를 들면, 협측, 설하, 그리고 전신 흡수를 위해 표적화된 것들, 거환, 분말, 과립, 혀에 적용을 위한 페이스트; 비경구 투여, 예를 들면, 예로서 무균 용액 또는 현탁액, 또는 지속 방출 제제로서 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막외 주사; 예로서, 피부, 폐, 또는 구강에 적용된 크림, 연고, 또는 제어된-방출 패치 또는 스프레이로서 국소 적용; 예로서, 페서리, 크림, 또는 거품으로서 질내 또는 직장내; 설하; 안구; 경피; 또는 코, 폐, 그리고 다른 점막 표면.

[0072] *폴리펩티드*: 본원에서 이용된 바와 같이, "폴리펩티드"는 대체로 말하면, 펩티드 결합에 의해 서로에 부착된 최소한 2개 아미노산의 스트링이다. 일부 구체예에서, 폴리펩티드는 최소한 3-5개 아미노산을 포함할 수 있고, 이들 각각은 최소한 하나의 펩티드 결합에 의하여 다른 것들에 부착된다. 당업자는 폴리펩티드가 때때로, "비-자연" 아미노산 또는 다른 실체를 포함하고, 이들은 그럼에도 불구하고, 임의선택적으로 폴리펩티드 사슬 내로 통합할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0073] *단백질*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "단백질"은 폴리펩티드 (즉, 펩티드 결합에 의해 서로에 연결된 최소한 2개 아미노산의 스트링)를 지칭한다. 단백질은 아미노산 이외의 모이어티 (가령, 당단백질, 프로테오글리칸 등일 수 있다)를 포함할 수 있고 및/또는 만약 그렇지 않으면, 처리되거나 또는 변형될 수 있다. 당업자는 "단백질"이 세포에 의해 생산된 것처럼 완전한 폴리펩티드 사슬 (신호 서열이 있거나 없음)일 수 있거나, 또는 이의 특징적인 부분일 수 있다는 것을 인지할 것이다. 당업자는 단백질이 때때로, 예로서 하나 또는 그 이상의 이황화 결합에 의해 연결되거나 또는 다른 수단에 의해 연관된 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 폴리펩티드는 l-아미노산, d-아미노산, 또는 둘 모두를 내포할 수 있고, 그리고 당분야에 공지된 다양한 아미노산 변형 또는 유사체 중에서 한 가지를 내포할 수 있다. 유용한 변형에는 예로서, 말단 아세틸화, 아미드화, 메틸화 등이 포함된다. 일부 구체예에서, 단백질은 자연 아미노산, 비-자연 아미노산, 합성 아미노산, 그리고 이들의 조합을 포함할 수 있다. 용어 "펩티드"는 일반적으로, 약 100보다 적은 아미노산, 약 50보다 적은 아미노산, 20보다 적은 아미노산, 또는 10보다 적은 아미노산의 길이를 갖는 폴리펩티드를 지칭하는데 이용된다. 일부 구체예에서, 단백질은 항체, 항체 단편, 이들의 생물학적으로 활성 부분, 및/또는 이들의 특징적인 부분이다.

[0074] *재발성 DV 감염:* 본원에서 이용된 바와 같이, "재발성 DV 감염"은 감염의 임상적 및/또는 실험실 증거, 예를 들면, 감염의 하나 또는 그 이상의 증상 또는 순환하는 DV 입자 및/또는 개체의 간에서 DV 입자의 존재의 재출현을 지칭한다.

[0075] *난치성:* 용어 "난치성"은 본원에서 이용된 바와 같이, 개업 의료인에 의해 정상적으로 관찰될 때, 제공된 조성물의 투여 이후에 예상된 임상 효능으로 응답하지 않는 임의의 개체를 지칭한다.

[0076] *혈청형:* 일반적으로, "혈청형 (serotype)" 또는 "혈청형 (serovar)"은 세균 또는 바이러스의 종 내에 또는 상이한 개체의 면역 세포 중에서 상이한 변이를 지칭한다. 이들 미생물은 전형적으로, 그들의 세포 표면 항원에 기초하여 함께 분류되고, 아종 수준까지 생물체의 역학 분류를 가능하게 한다.

[0077] *소형 분자:* 일반적으로, "소형 분자"는 크기에서 약 5 킬로달톤 (kD)보다 작은 분자이다. 일부 구체예에서, 소형 분자는 약 4 kD, 3 kD, 약 2 kD, 또는 약 1 kD보다 작다. 일부 구체예에서, 소형 분자는 약 800 달톤 (D), 약 600 D, 약 500 D, 약 400 D, 약 300 D, 약 200 D, 또는 약 100 D보다 작다. 일부 구체예에서, 소형 분자는 약 2000 g/몰, 약 1500 g/몰보다 작고, 약 1000 g/몰보다 작고, 약 800 g/몰보다 작고, 또는 약 500 g/몰보다 작다. 일부 구체예에서, 소형 분자는 비-중합성이다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따라서, 소형 분자는 단백질, 폴리펩티드, 올리고펩티드, 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 다당류, 당단백질, 프로테오글리칸 등이 아니다.

[0078] *실제적으로*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "실제적으로"는 관심되는 특징 또는 성질의 전체 또는 근접-전체 범위 또는 정도를 전시하는 정성적 조건을 지칭한다. 생물학 분야에서 당업자는 생물학적 현상과 화학적 현상이 만약 있더라도 드물게, 완결되고 및/또는 완전히 진행하거나 또는 절대 결과를 달성하거나 또는 회피한다는 것을 이해할 것이다. 용어 "실제적으로"는 이런 이유로, 많은 생물학적 현상과 화학적 현상에 내재하는 완전함의

잠재적 결여를 포착하기 위해 본원에서 이용된다.

[0079] *실제적인 서열 상동성*: 관용구 "실제적인 상동성"은 아미노산 또는 핵산 서열 사이에 비교를 지칭하기 위해 본원에서 이용된다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 두 서열은 일반적으로, 그들이 상응하는 위치에서 상동성 잔기를 내포하면, "실제적으로 상동성"인 것으로 고려된다. 상동성 잔기는 동일한 잔기일 수 있다. 대안으로, 상동성 잔기는 적절하게 유사한 구조적 및/또는 기능적 특징을 갖는 비-동일한 잔기일 수 있다. 예로서, 당업자에 의해 널리 공지된 바와 같이, 일정한 아미노산은 전형적으로, "소수성" 또는 "친수성" 아미노산으로, 및/또는 "극성" 또는 "비극성" 측쇄를 갖는 것으로 분류된다. 한 아미노산의 동일한 유형의 다른 아미노산으로의 치환은 종종, "상동성" 치환인 것으로 고려된다. 전형적인 아미노산 범주화는 하기에 요약된다:

[0080]

알라닌	Ala	A	비극성	중성	1.8
아르기닌	Arg	R	극성	양성	-4.5
아스파라긴	Asn	N	극성	중성	-3.5
아스파르트산	Asp	D	극성	음성	-3.5
시스테인	Cys	C	비극성	중성	2.5
글루탐산	Glu	E	극성	음성	-3.5
글루타민	Gln	Q	극성	중성	-3.5
글리신	Gly	G	비극성	중성	-0.4
히스티딘	His	H	극성	양성	-3.2
이소류신	Ile	I	비극성	중성	4.5
류신	Leu	L	비극성	중성	3.8
리신	Lys	K	극성	양성	-3.9
메티오닌	Met	M	비극성	중성	1.9
페닐알라닌	Phe	F	비극성	중성	2.8
프롤린	Pro	P	비극성	중성	-1.6
세린	Ser	S	극성	중성	-0.8
트레오닌	Thr	T	극성	중성	-0.7
트립토판	Trp	W	비극성	중성	-0.9
티로신	Tyr	Y	극성	중성	-1.3
발린	Val	V	비극성	중성	4.2

[0081]

모호한 아미노산	3-문자	1-문자
아스파라긴 또는 아스파르트산	Asx	B
글루타민 또는 글루탐산	Glx	Z
류신 또는 이소류신	Xle	J
특정되지 않은 또는 알려지지 않은 아미노산	Xaa	X

[0082] 당분야에 널리 공지된 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은 상업적인 컴퓨터 프로그램에서 가용한 것들, 예를 들면, 뉴클레오티드 서열의 경우에 BLASTN, 그리고 아미노산 서열의 경우에 BLASTP, 갭트 BLAST, 그리고 PSI-BLAST를 비롯한 다양한 알고리즘 중에서 한 가지를 이용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이런 프로그램은 Altschul, et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., *Methods in Enzymology*; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of

protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; 그리고 Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999에서 설명된다; 이들 모두 본원에서 참조로서 편입된다. 상동성 서열을 확인하는 것에 더하여, 전술한 프로그램은 전형적으로, 상동성 정도의 시도를 제공한다. 일부 구체예에서, 두 서열은 그들의 상응하는 잔기의 최소한 50%, 최소한 55%, 최소한 60%, 최소한 65%, 최소한 70%, 최소한 75%, 최소한 80%, 최소한 85%, 최소한 90%, 최소한 91%, 최소한 92%, 최소한 93%, 최소한 94%, 최소한 95%, 최소한 96%, 최소한 97%, 최소한 98%, 최소한 99% 또는 그 이상이 잔기의 유관한 스트레치 위에서 상동성이면, 실제적으로 상동성인 것으로 고려된다. 일부 구체예에서, 유관한 스트레치는 완전한 서열이다. 일부 구체예에서, 유관한 스트레치는 최소한 10, 최소한 15, 최소한 20, 최소한 25, 최소한 30, 최소한 35, 최소한 40, 최소한 45, 최소한 50, 최소한 55, 최소한 60, 최소한 65, 최소한 70, 최소한 75, 최소한 80, 최소한 85, 최소한 90, 최소한 95, 최소한 100, 최소한 125, 최소한 150, 최소한 175, 최소한 200, 최소한 225, 최소한 250, 최소한 275, 최소한 300, 최소한 325, 최소한 350, 최소한 375, 최소한 400, 최소한 425, 최소한 450, 최소한 475, 최소한 500개 또는 그 이상 잔기이다.

[0083] *실제적인 동일성*: 관용구 "실제적인 동일성"은 아미노산 또는 핵산 서열 사이에 비교를 지칭하기 위해 본원에서 이용된다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 두 서열은 일반적으로, 그들이 상응하는 위치에서 동일성 잔기를 내포하면, "실제적으로 동일성"인 것으로 고려된다. 당분야에 널리 공지된 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은 상업적인 컴퓨터 프로그램에서 가용한 것들, 예를 들면, 뉴클레오티드 서열의 경우에 BLASTN, 그리고 아미노산 서열의 경우에 BLASTP, 갭트 BLAST, 그리고 PSI-BLAST를 비롯한 다양한 알고리즘 중에서 한 가지를 이용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이런 프로그램은 Altschul, et al., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410, 1990; Altschul, *et al.*, *Methods in Enzymology*; Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis *et al.*, *Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; 그리고 Misener, et al., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999에서 설명된다. 동일한 서열을 확인하는 것에 더하여, 전술한 프로그램은 전형적으로, 동일성 정도의 시도를 제공한다. 일부 구체예에서, 두 서열은 그들의 상응하는 잔기의 최소한 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상이 잔기의 유관한 스트레치 위에서 동일하면, 실제적으로 동일한 것으로 고려된다. 일부 구체예에서, 유관한 스트레치는 완전한 서열이다. 일부 구체예에서, 유관한 스트레치는 최소한 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500개 또는 그 이상 잔기이다.

[0084] *고통받는*: 질환, 장애, 또는 이상 (가령, DV)으로 "고통받는" 개체는 상기 질환, 장애, 또는 이상의 하나 또는 그 이상의 증상으로 진단되었거나 및/또는 이를 전시한다. DV 감염은 빈번하게 무증상이다. 일부 구체예에서, DV로 고통받는 개체는 DV에 노출되고 및/또는 DV로 감염되지만, DV 감염의 임의의 증상을 전시하지 않고 및/또는 DV 감염으로 진단되지 않았다. 일부 구체예에서, DV로 고통받는 개체는 혈액 내에 하나 또는 그 이상의 DV 입자를 갖는 개체이다.

[0085] *감수성인*: 질환, 장애, 또는 이상 (가령, DV)에 "감수성인"개체는 질환, 장애, 또는 이상이 진전하는 위험에 처해있다. 일부 구체예에서, 질환, 장애, 또는 이상에 감수성인 개체는 상기 질환, 장애, 또는 이상의 임의의 증상을 전시하지 않는다. 일부 구체예에서, 질환, 장애, 또는 이상에 감수성인 개체는 상기 질환, 장애, 및/또는 장애로 진단되지 않는다. 일부 구체예에서, 질환, 장애, 또는 이상에 감수성인 개체는 상기 질환, 장애, 또는 이상의 진전과 연관된 상태에 노출된 개체이다 (가령, 개체는 DV에 노출된다). 일부 구체예에서, 질환, 장애 및/또는 이상이 진전하는 위험은 개체군-기초된 위험이다 (가령, 정맥내 약물 사용자; 1992년 이전에 기증된 혈액, 혈액 제제, 그리고 장기의 수용자, 이때부터 이런 산물은 스크리닝되기 시작하였다; 바늘을 취급하는 의료 요원; DV-감염된 모체로부터 태어난 아기 등).

[0086] *증상이 감소된다:* 본 발명에 따라서, 특정 질환, 장애 또는 이상의 하나 또는 그 이상의 증상이 크기 (가령, 강도, 심각도 등) 또는 빈도에서 감소될 때, "증상이 감소된다." 명료함을 위해, 특정 증상의 시작에서 지연은 증상의 빈도를 감소시키는 한 가지 형태인 것으로 고려된다. 몇 가지 실례를 들자면, DV의 예시적인 증상에는 열의 돌연 발병, 높은 열 (종종 40℃ 초과), 근육과 관절 통증, 두통, 구토, 설사, 붉어진 피부 또는 홍역-유사 발진과 같은 발진의 발생, 점상 출혈 (피부가 압박될 때 사라지지 않는 파괴된 모세관에 의해 유발된 작은 적색 반점), 점막으로부터 출혈, 낮은 백혈구 수, 낮은 혈소판, 대사성 산증, 간으로부터 상승된 수준의 아미노전달효소, 혈액농축 (상승하는 헤마토크리트에 의해 지시됨)과 저알부민혈증을 유발하는 혈장 누출, 흉부와 복강에

서 액체 축적 (가령, 흉막 삼출 또는 복수), 위장 출혈, 쇼크와 출혈, 양성 지혈대 검사, 저혈압, 뇌 또는 심장의 감염, 중요 장기 (가령, 간)의 장애, 신경 질환, 예를 들면, 횡단성 척수염, 및/또는 이들의 조합이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 발명은 증상이 제거된 사례에만 국한되는 것으로 의도되지 않는다. 본 발명은 비록 완전하게 제거되지 않는다 하더라도, 하나 또는 그 이상의 증상이 감소되는 (그리고, 개체의 이상이 따라서 "향상되는") 그런 정도의 치료를 구체적으로 예기한다.

[0087] *치료제:* 본원에서 이용된 바와 같이, 관용구 "치료제"는 생물체에 투여될 때 원하는 약리학적 효과를 이끌어 내는 임의의 작용제를 지칭한다. 일부 구체예에서, 작용제는 적절한 개체군에 걸쳐 통계학적으로 유의한 효과를 증명하면, 치료제인 것으로 고려된다. 일부 구체예에서, 적절한 개체군은 모델 생물체의 개체군일 수 있다. 일부 구체예에서, 적절한 개체군은 다양한 기준, 예를 들면, 일정한 연령 군, 성별, 유전자 배경, 기존 임상적 조건 등에 의해 규정될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료제는 질환, 장애 및/또는 이상을 경감하고, 개선하고, 완화하고, 저해하고, 예방하고, 이의 시작을 지연시키고, 이의 심각도를 감소시키고, 및/또는 이의 하나 또는 그 이상의 증상 또는 특질의 발생률을 감소시키는데 이용될 수 있는 임의의 물질이다.

[0088] *치료 효과량:* 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "치료 효과량"은 임의의 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 이익/위험 비율에서, 치료되는 개체에 치료 효과를 부여하는 치료적 단백질의 양을 지칭한다. 치료 효과는 객관적 (즉, 일부 검사 또는 마커에 의해 측정가능) 또는 주관적 (즉, 개체가 효과의 시도를 제공하거나 또는 효과를 느낀다)일 수 있다. 특히, "치료 효과량"은 예로서, 질환과 연관된 증상을 개선하고, 질환의 시작을 예방하거나 또는 지연시키고, 및/또는 질환의 증상의 심각도 또는 빈도를 줄임으로써, 원하는 질환 또는 장애를 치료하거나, 개선하거나, 또는 예방하거나, 또는 검출가능한 치료적 또는 방지적 효과를 전시하는데 효과적인 치료적 단백질 또는 조성물의 양을 지칭한다. 치료 효과량은 통상적으로, 복수의 단위 분량을 포함하는 투약 섭생으로 투여된다. 임의의 특정 치료적 단백질의 경우에, 치료 효과량 (및/또는 효과적인 투약 섭생 내에 적절한 단위 분량)은 예로서, 투여 루트, 다른 제약학적 작용제와의 조합에 따라 변할 수 있다. 또한, 임의의 특정 환자에 대한 특정한 치료 효과량 (및/또는 단위 분량)은 치료되는 장애와 장애의 심각도; 이용된 특정한 제약학적 작용제의 활성; 이용된 특정한 조성물; 환자의 연령, 체중, 전반적인 건강, 성별과 식이; 이용된 특정한 융합 단백질의 투여 시간, 투여 루트, 및/또는 배출 속도 또는 신진대사; 치료의 지속 시간; 그리고 의학 분야에서 널리 공지된 기타 인자를 비롯한 다양한 인자에 의존할 수 있다.

[0089] *치료*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "치료" (또한 "치료한다" 또는 "치료하는")는 특정 질환, 장애 및/또는 이상 (가령, DV)을 부분적으로 또는 완전하게 경감하고, 개선하고, 완화하고, 저해하고, 이의 시작을 지연시키고, 이의 심각도를 감소시키고, 및/또는 이의 하나 또는 그 이상의 증상, 특질 및/또는 원인의 발생률을 감소시키는 물질 (가령, 소정의 조성물)의 임의의 투여를 지칭한다. 이런 치료는 유관한 질환, 장애 및/또는 이상의 징후를 전시하지 않는 개체 및/또는 질환, 장애 및/또는 이상에서 단지 초기 징후만을 전시하는 개체의 치료일 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 이런 치료는 유관한 질환, 장애 및/또는 이상의 하나 또는 그 이상의 확립된 징후를 전시하는 개체의 치료일 수 있다. 일부 구체예에서, 치료는 유관한 질환, 장애 및/또는 이상으로 고통받는 것으로 진단된 개체의 치료일 수 있다. 일부 구체예에서, 치료는 유관한 질환, 장애 및/또는 이상의 진전의 증가된 위험과 통계학적으로 상관되는 하나 또는 그 이상의 감수성 인자를 갖는 것으로 알려진 개체의 치료일 수 있다.

[0090] *단위 분량*: 표현 "단위 분량"은 본원에서 이용된 바와 같이, 단일 분량으로 및/또는 제약학적 조성물의 물리적으로 구별된 단위에서 투여된 양을 지칭한다. 많은 구체예에서, 단위 분량은 미리 결정된 양의 활성제를 내포한다. 일부 구체예에서, 단위 분량은 전체 단일 분량의 작용제를 내포한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 단위 분량은 전체 단일 분량을 달성하도록 투여된다. 일부 구체예에서, 복수의 단위 분량의 투여가 의도된 효과를 달성하기 위해 필요하거나, 또는 필요할 것으로 예상된다. 단위 분량은 예로서, 미리 결정된 양의 하나 또는 그 이상의 치료제를 내포하는 액체 (가령, 허용되는 담체)의 부피, 미리 결정된 양의 고체 형태에서 하나 또는 그 이상의 치료제, 미리 결정된 양의 하나 또는 그 이상의 치료제를 내포하는 지속된 방출 제제 또는 약물 전달 장치 등일 수 있다. 단위 분량은 치료제(들)에 더하여 다양한 성분 중에서 한 가지를 포함하는 제제로 존재할 수 있는 것으로 인지될 것이다. 예로서, 허용되는 담체 (가령, 제약학적으로 허용되는 담체), 희석제, 안정제, 완충액, 보존제 등이 하기에 설명된 바와 같이 포함될 수 있다. 많은 구체예에서, 특정 치료제의 적절한 총 일일 용량은 일부, 또는 복수의 단위 분량을 포함하고, 그리고 예로서, 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 주치의에 의해 결정될 수 있는 것으로 당업자에 의해 인지될 것이다. 일부 구체예에서, 임의의 특정 개체 또는 생물체에 대한 특정한 유효 용량 수준은 치료되는 장애와 장애의 심각도; 이용된 특정한 활성 화합물의 활성; 이용된 특정한 조성물; 개체의 연령, 체중, 전반적인 건강, 성별과 식이; 이용된 특정한 활성 화합물의 투여 시간, 그리

고 배출 속도; 치료의 지속 시간; 이용된 특정한 화합물(들)과 합동으로 이용되거나 또는 합치하는 약물 및/또는 추가 요법, 그리고 의학 분야에서 널리 공지된 기타 인자를 비롯한 다양한 인자에 의존한다.

[0091] *예방접종*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "예방접종"은 예로서, 질병-유발 병원체에 대한 면역 반응을 산출하도록 의도된 조성물의 투여를 지칭한다. 본 발명을 위해, 예방접종은 질병-유발 병원체에 노출 이전에, 동안, 및/또는 이후에, 그리고 일정한 구체예에서, 작용제에 노출 이전에, 동안, 및/또는 직후에 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 예방접종은 시간에서 적절하게 이격된, 예방접종 조성물의 복수의 투여를 포함한다.

[0092] *벡터*: 본원에서 이용된 바와 같이, "벡터"는 자신과 연관된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 일부 구체예에서, 벡터는 그들이 숙주 세포, 예를 들면, 진핵 및/또는 원핵 세포에서 연결된 핵산의 염색체외 복제 및/또는 발현을 할 수 있다. 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 주도할 수 있는 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 지칭된다.

[0093] *야생형*: 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "야생형"은 자연에서 "정상적인" (돌연변이체, 병든, 변형된 등과 대조적으로) 상태 또는 배경에서 발견되는 바와 같은 구조 및/또는 활성을 갖는 실체를 지칭하는 당분야에서 이해되는 의미를 갖는다. 당업자는 야생형 유전자와 폴리펩티드가 종종 복수의 상이한 형태 (가령, 대립형질)로 존재한다는 것을 인지할 것이다.

[0094] **DV 명명법**

[0095] DV 명명법은 전형적으로, DV 유전자형을 나타내는 로마 숫자 (가령, "I," "II," "III," "IV," 등) 및 DV 아형을 나타내는 소문자 (가령, "a," "b," 등)을 활용하는 것으로 당업자에 의해 널리 알려져 있다. 비록 명명 규칙이 당분야에서 일반적으로 인정되긴 하지만, 당업자는 명명 규칙이 간행물, 표현, 대화 등에서 항상 엄격하게 추종되는 것은 아니라는 것을 인식한다. 따라서, 당업자는 예로서, "DV Ia," "DV 유전자형 Ia," 및 "DV 아형 Ia"가 당업자에 의해 교체가능하게 이용될 수 있고, 그리고 3가지 용어 모두 DV 유전자형 I, 아형 a를 지칭하는 것으로 의도되는 것으로 암시된다는 것을 인식할 것이다.

[0096] 본원에서 이용된 바와 같이, 로마 숫자 (가령, "I," "II," "III," "IV," 등)은 DV 유전자형을 지칭하기 위해 이용되고, 그리고 소문자 (가령, "a," "b," 등)은 DV 아형을 지칭하기 위해 이용된다. 또한, 특정 유전자형의 DV가 본원에서 지칭될 때, 이것은 지명된 유전자형의 모든 아형을 포괄하는 것으로 의미되는 것으로 이해될 것이다. 한 가지 실례를 들자면, "유전자형 I"는 유전자형 I의 모든 아형 (가령, 유전자형 I, 아형 a; 유전자형 I, 아형 b; 등)을 지칭하기 위해 본원에서 이용된다.

[0097] 본원에서 이용된 바와 같이, 유전자형과 아형 지정 뒤에 존재하는 임의의 로마 숫자 (가령, "I," "II," "III," "IV," 등)은 DV 균주를 지칭하는 것으로 이해될 것이다.

[0098] **일정한 구체예의 상세한 설명**

[0099] 본 발명은 특정 구조적 및/또는 기능적 특징을 갖는 유용한 항-DV 항체 작용제뿐만 아니라 이런 항체 작용제에 관련된 조성물과 방법을 제공한다.

[0100] *<u>뎅기 바이러스 (DV) 감염</u>*

[0101] DV 감염은 주요 절지동물-매개 바이러스 질환을 대표하는데, 3.5 십억 이상의 사람들이 상기 질환에 대한 위험 지역에서 살고 있고, 그리고 전 세계적으로 200 백만 건 이상의 감염이 발생하고 연간 21,000명 사망을 유발한다. 특히, 보고된 뎅기 바이러스 감염의 연간 평균 숫자, 지리학적 확산, 그리고 질환의 심각도 모두 근년에 극적으로 증가하였다. 뎅기 바이러스 전염병은 유의미한 이환율을 유발하고, 실제적인 경제적 비용 및 건강 관리 충격을 야기할 수 있다 (Guzman et al, 2010 Nature Reviews Microbiol. 8:S7-16).

[0102] DV 감염은 아에데스 아에집티 (*Aedes aegypti*) 모기에 의해 일차적으로 전파된 4가지 관련된 바이러스 중에서 한 가지에 의해 유발되고, 그리고 열대-와 아열대 지역에 풍토성이다. 포유동물에서 감염은 감염된 *아에데스* (*Aedes*) 모기의 혈분 동안 DV의 주입에 의해 시작되는데, 여기서 DV는 혈관외 조직에서 일차적으로 놓인다. 모기 쏘임 후 DV의 잠복기는 3 내지 14 일이다. 수지상 세포, 단핵구, 그리고 대식세포는 DV의 첫 번째 표적에 속

한다. 피부와 림프 신경절에서 초기 복제 후, DV는 급성 열성 시기, 일반적으로 3 내지 5 일의 코스에서 혈액 내에 나타난다.

[0103] 뎅기 바이러스 감염의 일과적인 검사실 진단은 DV의 단리 및/또는 DV에 특정한 항체의 검출에 기초된다. 감염은 여러 상이한 증후군을 유발할 수 있고, 감염된 개체의 연령 및/또는 면역학적 상태에 의해 영향을 받는다. 원발성 DV 감염은 무증상이거나 또는 뎅기열을 유발할 수 있다. 뎅기열은 전형적으로 2가지 상을 갖는 높은 열, 그리고 최소한 하나의 추가 증상, 예를 들면, 두통 (종종 심각한), 다양한 신체 부위 (가령, 눈, 관절, 근육, 뼈, 배) 중에서 한 가지에서 통증 (심각할 수 있다), 피부 폭발 또는 발진, 경미한 출혈 현시 (가령, 코 또는 잇몸 출혈, 점상 출혈, 쉬운 타박상), 림프절병증, 구토, 변색 (흑색) 대변, 기분 효과, 예를 들면, 탈진, 졸음 또는 자극감수성, 창백한, 차가운, 또는 냉습 피부, 호흡 어려움, 낮은 백혈구 수, 생물체의 조직 (가령, 혈액, 골수 등) 및/또는 장기 (가령, 간) 중에서 하나 또는 그 이상에서 순환하는 바이러스 입자에 의해 특징된다 (예로서, 질병 관리 본부 설명을 참조한다; 또한 US 2011/0189226을 참조한다). 감소된 백혈구와 혈소판 숫자가 빈번하게 일어난다.

[0104] 뎅기 출혈열 (DHF)은 DV 감염의 잠재적으로 치명적인 합병증이다. DHF는 극심한 기면과 졸음에 의해 특징되고, 높은 열 및 뎅기열과 연관된 다른 증상과 연계된다. 증가된 맥관 투과성 및 비정상적인 항상성은 혈액양에서 감소, 저혈압, 그리고 심각한 사례에서, 저혈량 쇼크와 내출혈을 야기할 수 있다. 출혈성 뎅기 열의 발생에서 주요 역할을 수행하는 것으로 보이는 2가지 인자는 다음과 같다: 높은 수준의 바이러스혈증을 동반하는 급속한 바이러스 복제; 그리고 높은 수준의 염증 매개체의 방출을 동반하는 주요 염증 반응. 치료가 없으면, 출혈성 뎅기 열에 대한 사망률은 10%에 도달할 수 있다.

[0105] 아동은 DV 감염의 효과에 특히 감수성인데, 이것은 반복된 노출 시에 극적으로 증가할 수 있다. 초기 뎅기 바이러스 감염 동안, 대부분의 아동은 무증상 감염 또는 경미한 미분화된 열성 증후군을 경험한다. 이차성 뎅기 바이러스 감염 동안, 상기 질환의 병태생리학은 종종 극적으로 변한다. 순차적 감염은 뎅기 쇼크 증후군 (DSS)으로 알려져 있는 급성 맥관 투과성 증후군을 유발할 수 있다. DSS는 통상적으로, DHF의 진행이고 빈번하게 치명적이다. DSS는 급속하고 불량한 용적 맥박, 저혈압, 차가운 사지, 그리고 안절부절에 의해 특징된다. 의학적 개입이 없으면, DSS에 대한 치사율은 40-50%에 도달할 수 있다 (Thullier et al, 1999 Journal of Biotechnology 69:183-190). DSS의 심각도는 연령-의존성이고, 맥관 누출은 어린 아동에서 가장 심각하다.

[0106] 성인에서 DV 감염은 종종, 심각한 출혈을 야기할 수 있는 출혈에 대한 경향을 동반한다. DV 감염은 이들이 천식, 당뇨병, 및/또는 다른 만성 질환을 앓는 개체에서 일어날 때, 치명적일 수 있다 (Guzman et al, 2010 Nature Reviews Microbiol. 8:S7-16).

[0107] DV의 이차성 사례에서 심각한 질환의 증가된 위험을 설명하기 위해 제안된 선도적인 이론은 항체 의존성 증강 (ADE)이다. 뎅기 바이러스 (DVs)는 각 혈청형에 독특한 항체 에피토프뿐만 아니라 혈청형 사이에 또는 중에서 공유된 에피토프를 전시한다. 개체는 원발성 DV 감염을 경험하고 (이로부터 회복하고), 그리고 모든 DV 혈청형 (DV1-4)과 교차 반응하는 강건한 항체 반응을 전개할 수 있다. 하지만, 교차 반응성에도 불구하고, 항체는 동일한 (상동성) 혈청형에 의한 재감염을 단지 예방할 뿐이고, 그리고 개체는 상이한 (이종유래) 혈청형으로 차후 감염에 감수성이다. 새로운 혈청형으로 이차성 뎅기 감염을 경험하는 개체는 진전하는 DHF의 훨씬 큰 위험에 직면하는데, 이것은 DV에 대한 기존의 면역성이 질환을 악화시킬 수 있다는 것을 지시한다. DV의 ADE 이론은 첫 번째 감염으로부터 약한 중화 항체가 두 번째 혈청형에 결합하고 FcγR 보유 골수 세포, 예를 들면, 단핵구와 대식세포의 감염을 증강한다고 상정한다 (Wahala et al., 2011 Viruses 3: 2374-2395).

[0108] DV 감염의 심각한 형태의 발달을 설명하기 위해, 기전의 최소한 3가지 유형이 제안되었다: (i) 이들은 특히 독성 바이러스 균주에 의해 유발될 지도 모른다; (ii) 기존의 아중화 항체는 DV의 숙주 세포로서 지정된 단핵구 또는 대식세포에 의한 DV의 항체-매개된 흡수를 증강할 수 있다 (가령, ADE); 그리고 (iii) 상기 바이러스의 비-구조 단백질 (NS1)에 대한 항체는 피브리노겐, 혈소판 및 내피 세포와 교차 반응하고, 따라서 출혈을 촉발할 지도 모른다.

[0109] 현재, 뎅기열에 대한 특정한 치료법은 없다. 권장된 요법은 증상을 해소하고, 그리고 장기 요양, 해열제 및/또는 진통제를 통한 열과 통증의 제어, 그리고 적절한 수화를 포함한다. 노력은 액체 손실의 균형화, 응고 인자의 대체 및 헤파린의 주입에 집중한다. DV의 서열과 항원 변이성은 효과적인 백신 또는 치료제를 개발하는 노력을 어렵게 하였다 (Whitehead et al., 2007 Nature Reviews Microbiology 5:518-528). 유감스럽게도, 선도적인 백신 후보는 최근에, 2 단계 연구에서 단지 30%의 보호 효능을 증명하였다 (Thomas et al., 2011 Curr Op Infectious Disease 24:442-450; Sabchareon et al., 2012 Lancet 380(9853):1559-1567). 이런 이유로, 향상

된 DV 요법, 백신의 개발이 필요하다. 모든 DV 혈청형에 적용가능한 치료법의 개발은 특히 귀중할 것이다. 이런 요법은 특히 개발도상국에서 인간 건강에 대한 엄청난 영향을 줄 것이다.

[0110] *DV 항원*

[0111] DV 감염은 유사한 혈청학적 유형을 갖지만 항원적으로 다른 4가지 바이러스 (DV1-4)에 의해 유발된다. DV는 플라비비리대 (*Flaviviridae*) 패밀리 내에 속 플라비바이러스에 속하는 양성 단일 가닥 RNA 바이러스이다. 상기 비리온은 지질다당질 외피와 함께, 40-50 nm의 직경을 갖는 구형 입자를 포함한다. 길이에서 대략 11 kb인 RNA 유전체는 5' 유형 I 단부를 포함하지만 3' 폴리-A 꼬리를 결여한다. 유전체의 조직은 하기 원소를 포함한다: 5' 비-코딩 영역 (NCR), 구조 단백질 (캡시드 (C), 예비-막/막 (prM/M), 외피 (E))을 인코딩하는 영역 및 비-구조 단백질 (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5)과 3' NCR을 인코딩하는 영역.

[0112] 바이러스 유전체학 RNA는 캡시드 단백질과 연관되어 뉴클레오캡시드를 형성한다. 플라비바이러스의 전형으로서, 뎅기 바이러스 유전체는 중단되지 않은 코딩 영역을 인코딩하고, 상기 코딩 영역은 단일 다단백질로 번역되고, 이것은 번역후 처리된다. DV의 중요한 생물학적 성질에는 수용체 결합, 적혈구의 혈구응집, 중화 항체의 유도 및 보호 면역 반응이 포함되고, E 단백질과 연관된다 (Wahala et al., 2011 Viruses 3:2374-2395).

[0113] 약 19 kDa의 당단백질인 PrM 단백질은 3개 이황화 다리를 형성하는 6개의 고도로 보존된 시스테인 잔기를 내포하고, 그리고 성숙 동안 퓨린 또는 퓨린-유사 단백분해효소에 의해 Pr과 M 단백질로 개열된다.

[0114] 약 40 kDa의 당단백질인 NS1 단백질은 6개 이황화 다리를 형성하는 12개의 고도로 보존된 시스테인 잔기를 내포하고, 그리고 세포내에, 세포 표면 상에, 그리고 이들 세포 외측에 존재한다 (Lai et al., 2008 Journal of Virology 82(13):6631-43).

[0115] 대략 55 kDa의 당단백질인 E 단백질은 6개 이황화 다리를 형성하는 12개의 엄격하게 보존된 시스테인 잔기를 내포하고, 그리고 비리온의 성숙 이전에, PrM 단백질과의 이형이합체로서 존재한다. E 단백질의 엑토도메인의 x-선 결정학적 연구는 나선형 스템 앵커 및 2개의 역평행 막경유 도메인에 의해 바이러스 막에 연결된 3개의 상이한 베타-배럴 도메인을 밝혔다. 도메인 III (EDIII)은 면역글로불린-유사 접힘을 채택하고, 그리고 수용체 상호작용에서 결정적인 역할을 수행하는 것으로 제안되었다. 도메인 II (EDII)는 2개의 긴 손가락-유사 구조로 구성된 신장된 도메인이고, 첨단에서 고도로 보존된 13개 아미노산 융합 루프 (EDII-FL)를 내포하고, 그리고 E 단백질의 막 융합과 이합체화에 참여한다. E의 중심 도메인 (도메인 I; EDI)은 각각, 1개와 4개 유연한 링커에 의해 EDIII과 EDII에 연결된 9-가닥 β-배럴이다. E 단백질은 플라비바이러스 생활 주기 동안 바이러스 어셈블리, 수용체 부착, 입장, 바이러스 융합, 그리고 아마도 면역 회피에 중요하고, 그리고 따라서, 바이러스 입자 상에서 여러 상이한 입체형태와 배열을 채택하는데 필요한 동적 단백질이다. 게다가, E 단백질은 중화 항체와 증강 항체 둘 모두의 주요 표적이다 (Lai et al., 2008 Journal of Virology 82:6631-6643; Pierson et al., 2008 Cell Host & Microbe 4:229-38).

[0116] DV는 소포체 (ER)의 막 상에서 조립되고, 그리고 상기 바이러스는 미성숙 바이러스 입자로서 ER의 내강 내로 발아한다. 평활면을 갖는 성숙 바이러스 입자와 달리, ER 내로 발아하는 미성숙 바이러스 입자는 바이러스 외피 상에 정20면체 대칭을 갖는 60개 스파이크된 투사를 형성하는 E/prM 이형이합체의 삼합체에 의해 창출된 거친 표면을 갖는다 (Perera et al., 2008 Antivir. Res. 80 11-22). 각 삼합체의 E 단백질은 비리온의 표면으로부터 멀리 돌출하고, 그리고 융합 루프를 포함하는 EDII의 원위 단부를 거쳐 prM과 상호작용한다. 미성숙 비리온 상에서 PrM은 바이러스 떠남 동안 낮은 pH 골지-유래된 분비 구획에서 올리고머성 재배열을 겪는 E 단백질의 능력을 제한하고, 따라서 미성숙하고 우발적인 융합을 예방한다 (Guirakhoo et al., 1991 Journal of Virology 72:1323-1329; Heinz et al., 1994 Journal of Virology 198(1):109-117). 미성숙 비리온이 트랜스-골지 네트워크 (TGN)의 산성 구획을 통해 나아감에 따라서, prM과 E 단백질의 방향에서 변화는 세포 세린 단백분해효소 퓨린에 대한 부위를 드러낸다. 이러한 낮은 pH 환경에서, 미성숙 비리온의 E 단백질은 비리온의 표면에 편평하게 기대고 T = 3 유사-정20면체 대칭으로 배열되는 역평행 이합체를 형성한다 (Yu et al., 2009 Journal of Virology 83(23):12101-12107). prM 단백질은 퓨린 개열 후 방출되고 중성 pH로의 전이가 세포외 공간에서 일어날 때까지, EDII의 융합 루프를 계속 감춘다. 결과의 성숙 감염성 바이러스는 90 E 단백질 이합체 및 180개 사본의 ~70 아미노산 M 단백질로 구성된 상대적으로 부드러운 입자이다. 이러한 형상에서, 성숙 DV 상에서 E 단백질은 대칭의 2-, 3-, 또는 5-접힘 축에 대한 그들의 근접에 의해 규정된 3가지 상이한 환경에서 존재한다 (Kuhn et al., 2002 Cell 108:717-25). 따라서, 모든 E 단백질 아단위는 바이러스 표면과 입체 상에서 동일한 환경에 있지 않고, 그리고 다른 고려 사항은 다른 것들에 비하여 일부 E 아단위의 수용체와 항체와의 우선적 상호작용을 유발한다.

[0117] E 단백질 상에서 고도로 보존된 융합 루프를 인식하는 항체는 4가지 모든 DV 혈청형에 대한 광범위한 반응성을 증명한다; 하지만 이들의 중화 효능은 아마도, 이러한 에피토프가 성숙 DV에서 거의 접근불능이기 때문에, 전형적으로 제한된다. E 단백질 도메인 III (EDIII)의 'A' β-가닥을 인식하는 일부 항체는 특정 DV 균주를 강력하게 중화시키는 것으로 밝혀졌지만, 4가지 모든 혈청형에 대하여 효과적인 것으로는 알려져 있지 않다 (Lok et al., Nature Structural & Molecular Biol. 15:312-317). 'A' β-가닥은 EDIII 상에서 위치 305-308 (DV3 넘버링)에서 중심된 부분복합체 에피토프의 부분이다.

[0118] 본원에서 설명된 바와 같이, 본 발명은 E 항원, 그리고 특히 EDIII 도메인이 광범위한-스펙트럼 항-DV 항체 작용제에 대한 유용한 항원성 표적으로서 역할할 수 있다는 발견을 포괄한다. 본 발명은 특히, E 항원 (가령, EDIII 도메인)에 결합하지만 모든 DV 혈청형을 중화시키지는 못하는 항체가 DV 혈청형 1-4 모두를 중화시키는 변이체, 및/또는 다른 항체 작용제를 생산하기 위해 합리적으로 가공될 수 있다는 것을 증명한다 (예로서, 도면 3 참조). 게다가, 본 발명은 E 항원 (가령, EDIII 도메인)에 결합하고 전체가 아닌 일부 DV 혈청형을 중화시키는 항체가 부모 항체와 비교하여 일정한 다른 균주 및/또는 아형에 대하여 그들의 활성을 유의미하게 고갈시키지 않으면서, 부모 항체와 비교하여 하나 또는 그 이상의 특정 균주 및/또는 혈청형에 대하여 중화 활성을 획득한 변이체, 및/또는 다른 항체 작용제를 생산하기 위해 합리적으로 가공될 수 있다는 것을 증명한다.

[0119] *4E11 항체*

[0120] 항체는 부분적으로, 그들의 높은 생화학적 특이성 및 그들의 확립된 안전성 기록으로 인해, 항바이러스 치료제의 효과적인 부류인 것으로 증명되었다. 부가적으로, 항체는 긴 혈청 반감기 (~21 일)를 갖고, 사람들에서 예방적 이용, 뎅기 바이러스를 비롯하여 급속한 발생을 보여주는 감염성 질환에 대한 특정 요구의 적용을 실시가능하게 한다.

[0121] 플라비바이러스 감염에 대하여 보호하는 항체는 (1) 수용체 결합의 직접적인 중화, (2) 바이러스 융합의 저해, (3) Fc-γ-수용체-의존성 바이러스 청소, (4) 바이러스 또는 감염된 세포의 보체-매개된 용해, 그리고 (5) 감염된 세포의 항체-의존성 세포독성 중에서 하나 또는 그 이상을 비롯한 복수의 기전을 통해 작용하는 것으로 생각된다 (Pierson et al., 2008 Cell Host & Microbe 4:229-38). 플라비바이러스 중화는 복수의 항체에 의한 결합을 필요로 하는 것으로 생각된다 (Dowd et al., 2011 Virology 411:306-15). 부착 후 시기에서 웨스트 나일 바이러스를 중화시키는 EDIII 결합 mAb인 E16로 연구는 ~30개 항체가 효과적인 중화를 위해 결합해야 한다는 것을 지시한다. 연구는 항체 결합의 친화성 및 접근가능한 에피토프의 전체 숫자 둘 모두 항체의 중화 효능에 기여한다고 제안하였다. 따라서, 심지어 높은 친화성으로 결합하는 항체의 경우에도, 항체는 접근가능한 에피토프의 숫자가 중화에 필요한 일정한 수준보다 낮으면, 중화에 실패할 것이다. 반대로, 더욱 낮은 친화성 항체는 많은 에피토프가 결합에 접근가능하면, 중화에 성공할 지도 모른다.

[0122] 이미 언급된 바와 같이, 뎅기 바이러스 (DVs)는 각 혈청형에 독특한 항체 에피토프 및 혈청형 사이에 공유된 에피토프를 전시한다. 항체가 DV를 어떻게 중화시키거나 또는 증강하는 지를 이해하기 위한 대부분의 연구는 생쥐 단일클론 항체 (mAbs)로 완료되었다. E 단백질이 비리온의 표면 상에서 노출된 주요 항원이기 때문에, E 단백질에 결합하는 생쥐 mAb는 많은 분석의 초점이 되고 있다. 비록 중화 생쥐 mAb가 3개의 도메인 모두에 지도화되었는데, 가장 강한 중화 mAb는 혈청형-특이적이고, 그리고 비리온의 표면으로부터 돌출되는 EDIII에 결합한다. 외측 능선과 A-가닥 에피토프로 지정된 EDIII 상에서 2개의 부분적으로 중복 에피토프는 DV를 중화시키는 생쥐 mAb의 주요 표적이다.

[0123] 외측 능선 에피토프는 혈청형-특이적 강한 중화 항체와 상호작용한다. 예로서, mAb 3H5는 DV 혈청형 2의 EDIII-LR에 위치하는 것이 확인되고, 그리고 이들 mAb의해 인식된 에피토프는 A-가닥 (아미노산 304) 및 FG 루프 (잔기 383과 384) 둘 모두에 위치된다 (Sukupolvi-Petty et al., 2007 Journal of Virology 81(23): 12816-12826).

[0124] 하지만, EDIII에 결합하는 모든 항체가 유형-특이적 중화 활성을 전시하는 것은 아니다. A-가닥 에피토프에 결합하는 mAb는 DV의 하나 이상의 혈청형과 교차 반응하고, 그리고 뎅기 바이러스 부분복합체 중화 mAb로 지정된다. 예로서, 부분복합체-특이적 mAb 1A1D-2는 EDIII의 외측면의 A-가닥 상에 중심된 에피토프를 인식하고, 그리고 DV 혈청형 1-3 (DV1-3)에 의한 감염을 중화시킬 수 있지만, DV 혈청형 4 (DV4)를 중화시킬 수 없다 (Lok et al., 2008 Nature Struct Mol Biol 15(3):312-317; Roehrig et al., 1998 Virology 246(2):317-328; Sukupolvi-Petty et al., 2007 Journal of Virology 81(23): 12816-12826). 이러한 mAb의 특이성에 대한 분자

기초가 조사되었다; 1A1D-2 에피토프의 중심에서 3개 잔기 중에서 하나만 4가지 모든 DV 혈청형 (DV1-4) 사이에서 보존된다. 유사한 A-가닥 에피토프는 또한, 광범위한 중화 교차 반응성 DV mAb 4E11에 의해 인식된다 (Thullier et al., 2001 Journal Gen Virol. 82(8):1885-1892). 하지만, 실험적 접근법은 지금까지, 4가지 모든 DV 혈청형을 강력하게 중화할 수 있는 항체를 산출하는데 실패하였다

[0125] E 당단백질의 EDIII 내에 결합하는, 4E11로서 알려져 있는 한 가지 특정 뮤린 단일클론 항체는 DV 혈청형 1-4에 대하여 유력한 중화 활성을 보여준다. 4E11은 E 당단백질의 DV EDIII 상에서 입체형태적 에피토프에 결합하고 4가지 모든 혈청형과 교차 반응한다. 4E11은 숙주 세포에 부착을 간섭함으로써 DV1-3을 강력하게 중화시킨다. 하지만, 이것은 불량한 친화성을 갖고, 그리고 이런 이유로, DV4에 대하여 약한 중화 활성을 갖는다.

[0126] 생쥐 단일클론 항체 4E11을 분비하는 하이브리도마 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC) 수탁 번호: HB-9259에서 기탁되었다. 야생형 ("wt") 4E11 중쇄 (HC; 서열 번호 1)와 경쇄 (LC; 서열 번호 2)의 서열은 공지된다. wt 4E11 프레임워크 (FR)와 상보성 결정 영역 (CDRs)의 서열은 공지된다 (wt 4E11 HC FR1은 서열 번호 3이고, wt 4E11 HC FR2는 서열 번호 4이고, wt 4E11 HC FR3은 서열 번호 5이고, wt 4E11 HC FR4는 서열 번호 6이고, wt 4E11 HC CDR1은 서열 번호 7이고, wt 4E11 HC CDR2는 서열 번호 8이고, wt 4E11 HC CDR3은 서열 번호 9이고; wt 4E11 LC FR1은 서열 번호 10이고, wt 4E11 LC FR2는 서열 번호 11이고, wt 4E11 LC FR3은 서열 번호 12이고, wt 4E11 LC FR4는 서열 번호 13이고, wt 4E11 LC CDR1은 서열 번호 14이고, wt 4E11 LC CDR2는 서열 번호 15이고, wt 4E11 LC CDR3은 서열 번호 16이다).

[0127] 서열 번호 1:

[0128] EVKLLEQSGAELVKPGASVRLSCTASGFNIKDTYMSWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGDTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLHLSSLTSGDTAVYYCSRGWEGFAYWGQGTLVTVSA

[0129] 서열 번호 2:

[0130] ELVMTQTPASLAVSLGQRATISCRASENVDRYGNSFMHWYQQKAGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFCQRSNEVPWTFGGGTKLEIKR

[0131] 서열 번호 3:

[0132] EVKLLEQSGAELVKPGASVRLSCTAS

[0133] 서열 번호 4:

[0134] YMSWVKQRPEQGLEWIGRI

[0135] 서열 번호 5:

[0136] TKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLHLSSLTSGDTAVYYCSR

[0137] 서열 번호 6:

[0138] WGQGTLVTVSA

[0139] 서열 번호 7:

[0140] GFNIKDT

[0141] 서열 번호 8:

[0142] DPANGD

[0143] 서열 번호 9:

[0144] GWEGFAY

[0145] 서열 번호 10:

[0146] ELVMTQTPASLAVSLGQRATISC

[0147] 서열 번호 11:

[0148] WYQQKAGQPPKLLIY

[0149] 서열 번호 12:

[0150] GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFC

[0151] 서열 번호 13:

[0152] FGGGTKLEIKR

[0153] 서열 번호 14:

[0154] RASENVDRYGNSFMH

[0155] 서열 번호 15:

[0156] RASNLES

[0157] 서열 번호 16:

[0158] QRSNEVPWT

[0159] 본 발명은 wt 4E11의 변이체인 항체 (또는 다른 항체 작용제)를 개발하는 것이 바람직할 것이라는 인식을 포괄한다. 본 발명은 특히, 이런 항체와 항체 작용제를 제공한다. 다시 말하면, 본 발명은 4E11과 유의미한 구조적 동일성을 보여주고, 그리고 게다가, wt 4E11에서 관찰된 것과 비교하여 향상된 기능적 특징 (가령, DV4의 중화)을 보여주는 다양한 항체 작용제를 제공한다.

[0160] 본 발명은 항원-항체 상호작용을 도킹하기 위한 신규한 채점 미터단위를 제공한다. 채점 미터단위 프레임워크는 물리화학적 특질 및 분자간 경계면에서 관찰된 쌍별 아미노산 상호작용의 성향에 따라 단백질-단백질 경계면을 순위매긴다. 본 발명은 현존하는 항체의 성질을 변경하기 위해 이러한 프레임워크를 이용한다. 일부 구체예에서, 항원에 대한 항체의 특이성과 친화성이 변경된다. 일부 구체예에서, 변형된 항체는 단일클론 항체이다. 일부 구체예에서, 본 발명에서 개시된 프레임워크는 항-DV 중화 mAb에 대한 더욱 넓은 특이성과 친화성을 영리하게 실행하는데 이용된다.

[0161] 도킹된 모델을 이용하여, DV의 4가지 모든 혈청형 (DV1-4)에 결합하는 항-DV 항체의 방식이 조사되고, 그리고 DV4를 향한 이들 항체의 불량한 친화성의 구조적 기초가 확인되었다. 돌연변이는 DV1-3을 향한 친화성과 중화 활성을 유지하면서, DV4를 향한 그들의 친화성 및 따라서, 그들의 중화 활성을 향상시키기 위해, 이들 항체의 파라토프에서 세심하게 설계되었다. 돌연변이를 설계하기 위해, 이들 mAb의 CDR 루프 잔기는 하나씩 세심하게 조사되었다. 제공된 CDR 위치에서, "야생형" 잔기는 글리신 (Gly)과 프롤린 (Pro)을 제외한 나머지 아미노산에 의해 조직적으로 치환되었고, 그리고 대체의 확률은 각 경우에서 통계학적 쌍별 성향을 이용하여 평가되었다. Gly와 Pro 잔기는 중추 입체형태에서 변성을 방지하기 위해 변형되지 않았다. 높은 대체 잠재력을 갖는 단일 돌연변이는 (1) phi-psi 값을 변경하지 않고; (2) 극성 기를 매몰시키지 않고; 그리고 (3) 향상된 H-결합, 염 가교, 반 데르 발스, 소수성 접촉, 그리고 충전을 갖는 돌연변이를 찾기 위해 모형화되고, 그리고 계산적으로 재평가되었다. 계산적 접근법에 의해 확인된 유망한 단일 돌연변이는 DV1-3 EDIII을 향한 친화성을 유지하면서 DV4 EDIII를 향한 친화성을 향상시키는 양성 돌연변이를 확인하는 고처리량 간접적인 효소 연결된 면역흡착 검정 (ELISA) 방법을 이용하여 스크리닝되었다. 최종적으로, 양성 단일 돌연변이는 높은 친화성 항체를 합리적으로 설계하기 위해 합동되었다. 경쟁 ELISA 실험은 가공된 항체 및 4가지 혈청형 각각으로부터 EDIII 사이에 평형에서 및 용해 상태에서, 친화성을 결정하기 위해 수행되었다. 결합 계량은 표면 플라스몬 공명 (SPR) 분석을 이용하여 실증되었다.

[0162] 일부 구체예에서, A-가닥 에피토프에 대한 항체는 DV의 4가지 모든 혈청형을 결합하기 위해 가공될 수 있다. 일부 구체예에서, wt 4E11 항-DV 항체는 DV1-3을 향한 친화성을 유지하면서 DV4를 향한 이의 친화성, 그리고 따라서, 중화 활성을 향상시키기 위해 변형된다. 일부 구체예에서, 가공된 항체 중에서 하나는 DV1과 DV3의 EDIII을 향한 본래 친화성을 유지하면서, 각각 DV2와 DV4의 EDIII를 향한 친화성에서 ~15와 ~450 배 향상을 전시한다. 일부 구체예에서, wt mAb 4E11과 비교하여, 가공된 항체는 다른 혈청형을 향한 "야생형" 활성을 여전히 유지하면서, DV4를 향한 >75 배 증가된 중화 잠재력을 보여주었다. 본 발명에 따른 가공된 4E11 항체는 뎅기 질환을 치료하는 치료적 항체에 대한 흥미로운 후보를 대표한다.

[0163] *제공된 변이체 DV 항체 작용제*

[0164] 제공된 항체 작용제는 항체 작용제의 특징 및/또는 활성을 향상시키기 위한 방식으로 가공되고, 생산되고, 및/또는 정제될 수 있는 것으로 인지될 것이다. 예로서, 제공된 항체 작용제의 향상된 특징에는 그 중에서도 특히, 증가된 안정성, 향상된 결합 친화성 및/또는 항원항체결합력, 증가된 결합 특이성, 증가된 생산, 감소된 응집, 감소된 비특이적 결합이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0165] 일반적으로, 본원에서 설명된 바와 같이, 제공된 항체 작용제는 예로서, 다중클론 항체; 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 변형된 항체, 예를 들면, 키메라 항체, 재성형된 항체, 인간화 항체, 또는 이의 단편 (가령, Fab', Fab, $F(ab')_2$); 또는 생합성 항체, 예를 들면, 단일 사슬 항체, 단일 도메인 항체 (DAB), Fv, 단일 사슬 Fv (scFv) 등이거나 또는 이를 포함할 수 있다.

[0166] 다중클론 항체와 단일클론 항체를 만들고 이용하는 방법은 예로서, Harlow et al., Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol I. Cold Spring Harbor Laboratory (Dec. 1, 1998)에서 설명된다. 변형된 항체 작용제, 예를 들면, 항체와 항체 단편 (가령, 키메라 항체, 재성형된 항체, 인간화 항체, 또는 이들의 단편, 예를 들면, Fab', Fab, $F(ab')_2$ 단편); 또는 생합성 항체 (가령, 단일 사슬 항체, 단일 도메인 항체 (DABs), Fv, 단일 사슬 Fv (scFv) 등)를 만들기 위한 방법은 당분야에 공지되어 있고, 그리고 예로서, Zola, Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives, Springer Verlag에서 발견될 수 있다 (Dec. 15, 2000; 1st edition).

[0167] 본 발명은 DV의 4가지 모든 혈청형 (DV1-4)에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 더욱 높은 친화성으로 DV1에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV2에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 더욱 높은 친화성으로 DV2에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV3에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 더욱 높은 친화성으로 DV3에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV4에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 더욱 높은 친화성으로 DV4에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1, DV2, DV3, 그리고 DV4에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 더욱 높은 친화성으로 DV1, DV2, DV3, 그리고 DV4에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 더욱 높은 친화성으로 DV4에 결합하고, 그리고 DV1, DV2, 그리고 DV3에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 이들 DV 혈청형에 대한 결합 친화성을 유지하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1과 DV4에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 더욱 높은 친화성으로 이들 DV 혈청형에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 더욱 높은 친화성으로 DV1과 DV4에 결합하고, 그리고 DV2와 DV3에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 이들 DV 혈청형에 대한 그들의 결합 친화성을 유지한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV2와 DV4에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 더욱 높은 친화성으로 이들 DV 혈청형에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 더욱 높은 친화성으로 DV2와 DV4에 결합하고, 그리고 DV1과 DV3에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 이들 DV 혈청형에 대한 그들의 결합 친화성을 유지한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV3과 DV4에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 더욱 높은 친화성으로 이들 DV 혈청형에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 더욱 높은 친화성으로 DV3과 DV4에 결합하고, 그리고 DV1과 DV2에 대한 다른 항체의 친화성과 비교하여, 이들 DV 혈청형에 대한 그들의 결합 친화성을 유지한다.

[0168] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 DV1-4 중에서 하나 또는 그 이상에 대한 상이한 항체의 친화성보다 최소한 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 그 이상의 친화성으로, DV1-4 중에서 하나 또는 그 이상에 결합한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 DV1-4 중에서 하나 또는 그 이상에 대한 상이한 항체의 친화성보다 최소한 2-배, 최소한 5-배, 최소한 10-배, 최소한 20-배, 최소한 30-배, 최소한 40-배, 최소한 50-배, 최소한 60-배, 최소한 70-배, 최소한 80-배, 최소한 90-배, 최소한 100-배, 최소한 200-배, 최소한 300-배, 최소한 400-배, 최소한 500-배 또는 그 이상의 친화성으로, DV1-4 중에서 하나 또는 그 이상에 결합한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 서로의 2배 이내, 5배 이내, 10배 이내, 25배 이내, 50배 이내, 100배 이내, 150배 이내, 200배 이내, 250배 이내, 300배 이내, 350배 이내, 또는 400-배 이내 친화성인, 상이한 DV 혈청형에 대한 결합 친화성을 보여준다.

[0169] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 본원에서 설명된 및/또는 예시된 바와 같은 범위 내에 중화 IC_{50} (ug/ml)을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하계가 약 0.05 ug/ml이고 상계가 약 10 ug/ml인 중화 IC_{50} (ug/ml)을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하계가 0.05 ug/ml, 0.1 ug/ml, 0.2

ug/ml, 0.3 ug/ml, 0.4 ug/ml, 0.5 ug/ml, 0.6 ug/ml, 0.7 ug/ml, 0.8 ug/ml, 0.9 ug/ml, 1.0 ug/ml, 1.1 ug/ml, 1.2 ug/ml, 1.3 ug/ml, 1.4 ug/ml, 1.5 ug/ml, 1.6 ug/ml, 1.7 ug/ml, 1.8 ug/ml, 1.9 ug/ml, 2.0 ug/ml, 2.5 ug/ml, 3.0 ug/ml, 3.5 ug/ml, 4.0 ug/ml, 4.5 ug/ml, 5.0 ug/ml 또는 그 이상으로 구성된 군에서 선택되고, 그리고 상계가 하계보다 더욱 높고 1.5 ug/ml, 1.6 ug/ml, 1.7 ug/ml, 1.8 ug/ml, 1.9 ug/ml, 2.0 ug/ml, 2.5 ug/ml, 3.0 ug/ml, 3.5 ug/ml, 4.0 ug/ml, 4.5 ug/ml, 5.0 ug/ml, 5.5 ug/ml, 6.0 ug/ml, 6.5 ug/ml, 7.0 ug/ml, 7.5 ug/ml, 8.0 ug/ml, 8.5 ug/ml, 9.0 ug/ml, 9.5 ug/ml, 10.0 ug/ml 또는 그 이상으로 구성된 군에서 선택되는 중화 IC_{50} (ug/ml)을 보여준다.

[0170] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 40000nM 보다 적은, 30000nM 보다 적은, 20000nM 보다 적은, 10000nM 보다 적은, 5000nM 보다 적은, 2000nM 보다 적은, 1500nM 보다 적은, 1000nM 보다 적은, 500nM 보다 적은, 250nM 보다 적은, 225nM 보다 적은, 200nM 보다 적은, 175nM 보다 적은, 150nM 보다 적은, 125nM 보다 적은, 100nM 보다 적은, 75nM 보다 적은, 50nM 보다 적은, 25nM 보다 적은, 15nM 보다 적은, 10 nM 보다 적은, 5nM 보다 적은, 2.5nM 보다 적은, 1nM 보다 적은, 0.5nM 보다 적은, 0.25nM 보다 적은, 0.1nM 보다 적은 K_D (nM)로 DV1-4에 결합을 보여준다.

[0171] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하계가 약 $0.01x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$이고 상계가 약 $5.0x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$인 K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)으로 DV1-4에 결합을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 항체는 하계가 $0.01x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, $0.05x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, $0.1x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, $0.5x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, $1.0x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, $2.0x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, $5.0x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, $7.0x10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, 또는 그 이상으로 구성된 군에서 선택되고, 그리고 상계가 하계보다 더욱 높고 $1.0x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$, $1.5x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$, $2.0x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$, $2.5x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$, $3.0x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$, $3.5x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$, $4.0x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$, $4.5x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$, $5.0x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$, 또는 그 이상으로 구성된 군에서 선택되는 K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)으로 DV1-4에 결합을 보여준다.

[0172] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하계가 약 $5x10^{-4}$ s^{-1}이고 상계가 약 $900x10^{-4}$ s^{-1}인 K_{off} (s^{-1})로 DV1-4에 대한 결합을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하계가 $5x10^{-4}$ s^{-1}, $10x10^{-4}$ s^{-1}, $12x10^{-4}$ s^{-1}, $13x10^{-4}$ s^{-1}, $14x10^{-4}$ s^{-1}, $15x10^{-4}$ s^{-1}, $18x10^{-4}$ s^{-1}, $20x10^{-4}$ s^{-1}, 또는 그 이상으로 구성된 군에서 선택되고, 그리고 상계가 하계보다 더욱 높고 $50x10^{-4}$ s^{-1}, $100x10^{-4}$ s^{-1}, $120x10^{-4}$ s^{-1}, $140x10^{-4}$ s^{-1}, $150x10^{-4}$ s^{-1}, $200x10^{-4}$ s^{-1}, $300x10^{-4}$ s^{-1}, $400x10^{-4}$ s^{-1}, $500x10^{-4}$ s^{-1}, $600x10^{-4}$ s^{-1}, $700x10^{-4}$ s^{-1}, $800x10^{-4}$ s^{-1}, $900x10^{-4}$ s^{-1}, 또는 그 이상으로 구성된 군에서 선택되는 K_{off} (s^{-1})로 DV1-4에 대한 결합을 보여준다.

[0173] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 DV1-4의 E 당단백질에 결합한다. 일정한 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 DV1-4의 EDIII (서열 번호 17-20)에 결합한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 DV1-4의 A-가닥에 결합한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 더욱 높은 친화성으로 DV4의 EDIII (서열 번호 20)에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 더욱 높은 친화성으로 DV4의 A-가닥에 결합하는 항체 작용제를 제공한다.

[0174] 서열 번호 17:

[0175] MCTGSF**K**LEKEVAETQHGTVLVQVKYEG**T**DAPCKIPFSSQDEKGVTQNGRLITANPIVTD**K**EK**P**VNIEAEPPFGESYIVVGAGE**K**ALK**L**SWFK

[0176] 서열 번호 18:

[0177] MCTGKF**K**VVKEIAETQHGTMVIRVQYEG**D**DSPCKIPFEIMDLEKKHVLGRLITVNPIVIE**K**DS**P**INIEAEPPFGDSYIIIGVEP**G**QLK**L**NWFK

[0178] 서열 번호 19:

[0179] MCTNTF**V**LKKEVSETQHGTILIKVEYKG**E**DAPCKIPFSTEDGQGKAHNGRLITANPVVTK**K**EE**P**VNIEAEPPFGESNIVIGIGD**N**ALK**I**NWYK

[0180] 서열 번호 20:

[0181] MCSGKF**S**IDKEMAETQHGTTVVKVKYEG**A**GAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRIISSTPLAEN**T**NS**V**TNIELEPPFGDSYIVIGVGN**S**AL**T**L**H**WFR

[0182] 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1-4의 EDIII (서열 번호 17-20)에서 위치 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 323, 325, 327, 329, 360, 361, 362, 363, 364, 385, 387, 388, 389, 390, 391, 및/또는 이들의 조합에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 작용제를 확인한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1-4의 EDIII (서열 번호 17-20)에서 위치 305, 310, 311, 323, 327, 329, 및/또는 이들의 조합에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기에 결합하는 항체 작용제를 확인한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1-4의 EDIII (서열 번호 17-20)에서 위치 305, 310, 311, 323, 327, 그리고 329에서 아미노산 잔기에 결합하는 항체 작용제를 확인한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1-4의 EDIII (서열 번호 17-20)에서 위치 305에서 아미노산 잔기에 결합하는 항체 작용제를 확인한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1-4의 EDIII (서열 번호 17-20)에서 위치 310에서 아미노산 잔기에 결합하는 항체 작용제를 확인한다. 일정한 구체예에서, 본 발명은 DV1-4의 EDIII (서열 번호 17-20)에서 위치 311에서 아미노산 잔기에 결합하는 항체 작용제를 확인한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1-4의 EDIII (서열 번호 17-20)에서 위치 323에서 아미노산 잔기에 결합하는 항체 작용제를 확인한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1-4의 EDIII (서열 번호 17-20)에서 위치 327에서 아미노산 잔기에 결합하는 항체 작용제를 확인한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 DV1-4의 EDIII (서열 번호 17-20)에서 위치 329에서 아미노산 잔기에 결합하는 항체 작용제를 확인한다.

[0183] 일부 구체예에서, 위치 305에서 세린, 리신, 및/또는 트레오닌 잔기는 제공된 항체 작용제에 결합에 기여한다. 일부 구체예에서, 위치 310에서 리신 잔기는 제공된 항체 작용제에 결합에 기여한다. 일부 구체예에서, 위치 311에서 리신 잔기는 제공된 항체 작용제에 결합에 기여한다. 일부 구체예에서, 위치 323에서 아르기닌, 리신, 및/또는 글루타민 잔기는 제공된 항체 작용제에 결합에 기여한다. 일부 구체예에서, 위치 327에서 세린 및/또는 글루탐산염 잔기는 제공된 항체 작용제에 결합에 기여한다. 일부 구체예에서, 위치 329에서 아르기닌, 아스파르트산염, 및/또는 글루탐산염 잔기는 제공된 항체 작용제에 결합에 기여한다.

[0184] 일부 구체예에서, 본 발명은 야생형 ("wt") DV 항체와 비교하여 더욱 높은 친화성으로 DV1에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 wt 또는 부모 참고 DV 항체와 비교하여 더욱 높은 친화성으로 DV2에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 참고 항체, 예를 들면, wt DV 항체와 비교하여 더욱 높은 친화성으로 DV3에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 참고 DV 항체와 비교하여 더욱 높은 친화성으로 DV4에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 참고 DV 항체와 비교하여 더욱 높은 친화성으로 DV1, DV2, DV3, 그리고 DV4에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 참고 DV 항체와 비교하여 더욱 높은 친화성으로 DV4에 결합하고 DV1, DV2, 그리고 DV3에 대한 결합 친화성을 유지하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 참고 (wt) DV 항체와 비교하여 더욱 높은 친화성으로 DV2와 DV4에 결합하는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 참고 DV 항체와 비교하여 더욱 높은 친화성으로 DV2와 DV4에 결합하고 DV1과 DV3에 대한 그들의 결합 친화성을 유지한다. 일부 구체예에서, wt DV 항체는 wt 4E11 항체이다.

[0185] 본원에서 설명된 바와 같이, 본 발명은 4E11과 일정한 구조적 (즉, 서열) 관계를 보여주고 및/또는 wt 4E11과 비교하여 예로서 일정한 향상된 기능적 속성을 비롯한 특정 기능적 속성을 갖는 항체 작용제를 제공한다.

[0186] 일부 구체예에서, 본 발명은 아미노산 서열이 wt 4E11과 특정된 수준의 상동성 및/또는 동일성을 보여주는 항체 작용제를 제공한다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 wt 4E11 (즉, 서열 번호 1-2)과 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 80%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99% 동일성을 보여준다.

[0187] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 서열 GFNIKDT (서열 번호 23)를 포함하는 중쇄 (HC; 서열 번호 21) CDR1, 서열 DPENGD (서열 번호 24)를 포함하는 HC CDR2, 서열 GWEGFAY (서열 번호 25)를 포함하는 HC CDR3, 서열 RASENVDKYGNSFMH (서열 번호 26)를 포함하는 경쇄 (LC; 서열 번호 22) CDR1, 서열 RASELQW (서열 번호 27)를 포함하는 LC CDR2 영역 및 서열 QRSNEVPWT (서열 번호 28)를 포함하는 LC CDR3 영역을 갖는다.

[0188] 서열 번호 21:

[0189] EVKLLEQSGAELVKPGASVRLSCTASGFNIKDTYMSWVKQRPEQGLEWIGRIDP**E**NGDTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLHLSSLTSGDTAVYYCSRGWEGFAYWGQGTLVTVSA

[0190] 서열 번호 22:

[0191] ELVMTQTPASLAVSLGQRATISCRASENVD**K**YGNSFMHWYQQKAGQPPKLLIYRAS**ELQW**GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFCQRSNEVPWTFGGGTKLEIKR

[0192] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 wt 4E11의 상응하는 CDR 또는 FR (즉, 서열 번호 7-9, 14-16 또는 3-6, 10-13 중에서 하나 또는 그 이상)에 서열에서 동일한 하나 또는 그 이상의 CDR 및/또는 하나 또는 그 이상의 FR을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 하기에 논의된 바와 같은 wt 4E11의 상응하는 CDR 및/또는 FR과 특정된 정도의 상동성 및/또는 동일성을 보여주는 하나 또는 그 이상의 CDR 및/또는 FR을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 모든 CDR과 FR은 최소한 특정된 수준의 상동성 및/또는 동일성을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제는 wt 4E11과 비교하여 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이내의 치환을 함께 내포하는 CDR과 FR 서열을 갖는다.

[0193] 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 작용제의 상보성 결정 영역 (CDR) 1은 wt 4E11 (서열 번호 7 및 서열 번호 14)과 최소한 65%, 70%보다 많은, 75%보다 많은, 80%보다 많은, 85%보다 많은, 90%보다 많은, 95%보다 많은, 또는 99%보다 많은 동일성을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR1은 wt 4E11의 것과 동일하고 및/또는 wt 4E11 (서열 번호 7 및 서열 번호 14)의 CDR1과 비교하여 임의의 아미노산 치환을 내포하지 않는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR1은 wt 4E11 (서열 번호 7 및 서열 번호 14)과 비교하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR1은 wt 4E11 (서열 번호 7 및 서열 번호 14)과 비교하여 2개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR은 wt 4E11과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개 치환, 그리고 일부 구체예에서 1, 2, 또는 3개 치환을 갖는다.

[0194] 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 작용제의 CDR2는 wt 4E11 (서열 번호 8 및 서열 번호 15)과 최소한 65%, 70%보다 많은, 75%보다 많은, 80%보다 많은, 85%보다 많은, 90%보다 많은, 95%보다 많은, 또는 99%보다 많은 동일성을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR2는 wt 4E11의 것과 동일하고 및/또는 wt 4E11 (서열 번호 8 및 서열 번호 15)의 CDR2와 비교하여 임의의 아미노산 치환을 내포하지 않는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR2는 wt 4E11 (서열 번호 8 및 서열 번호 15)과 비교하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR2는 wt 4E11 (서열 번호 8 및 서열 번호 15)과 비교하여 2개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR은 wt 4E11과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개 치환, 그리고 일부 구체예에서 1, 2, 또는 3개 치환을 갖는다.

[0195] 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 작용제의 CDR3은 wt 4E11 (서열 번호 9 및 서열 번호 16)과 최소한 65%, 70%보다 많은, 75%보다 많은, 80%보다 많은, 85%보다 많은, 90%보다 많은, 95%보다 많은, 또는 99%보다 많은 동일성을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR3은 wt 4E11의 것과 동일하고 및/또는 wt 4E11 (서열 번호 9 및 서열 번호 16)의 CDR3과 비교하여 임의의 아미노산 치환을 내포하지 않는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR3은 wt 4E11 (서열 번호 9 및 서열 번호 16)과 비교하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR3은 wt 4E11 (서열 번호 9 및 서열 번호 16)과 비교하여 2개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 CDR은 wt 4E11과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개 치환, 그리고 일부 구체예에서 1, 2, 또는 3개 치환을 갖는다.

[0196] 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 작용제의 제공된 프레임워크 영역 1 (FR1)은 wt 4E11 (서열 번호 3 및 서열 번호 10)과 65%보다 많은, 70%보다 많은, 75%보다 많은, 80%보다 많은, 85%보다 많은, 90%보다 많은, 95%보다 많은, 또는 99%보다 많은 퍼센트 동일성을 공유할 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR1은 wt 4E11 (서열 번호 3 및 서열 번호 10)과 비교하여 아미노산 치환을 갖지 않을 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR1은 wt 4E11 (서열 번호 3 및 서열 번호 10)과 비교하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR1은 wt 4E11 (서열 번호 3 및 서열 번호 10)과 비교하여 2개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다.

[0197] 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 작용제의 제공된 프레임워크 영역 2 (FR2)는 wt 4E11 (서열 번호 4 및 서열 번호 11)과 65%보다 많은, 70%보다 많은, 75%보다 많은, 80%보다 많은, 85%보다 많은, 90%보다 많은, 95%보다 많은, 또는 99%보다 많은 퍼센트 동일성을 공유할 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR2는 wt 4E11 (서열 번호 4 및 서열 번호 11)과 비교하여 아미노산 치환을 갖지 않을 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR2는 wt 4E11 (서열 번호 4 및 서열 번호 11)과 비교하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR2는 wt 4E11 (서열 번호 4 및 서열 번호 11)과 비교하여 2개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다.

[0198] 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 작용제의 제공된 프레임워크 영역 3 (FR3)은 wt 4E11 (서열 번호 5 및 서열 번호 12)과 65%보다 많은, 70%보다 많은, 75%보다 많은, 80%보다 많은, 85%보다 많은, 90%보다 많은, 95%보다 많은, 또는 99%보다 많은 퍼센트 동일성을 공유할 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR3은 wt 4E11 (서열 번호

5 및 서열 번호 12)과 비교하여 아미노산 치환을 갖지 않을 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR3은 wt 4E11 (서열 번호 5 및 서열 번호 12)과 비교하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR3은 wt 4E11 (서열 번호 5 및 서열 번호 12)과 비교하여 2개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다.

[0199] 일부 구체예에서, 본 발명의 항체 작용제의 제공된 프레임워크 영역 4 (FR4)는 wt 4E11 (서열 번호 6 및 서열 번호 13)과 65%보다 많은, 70%보다 많은, 75%보다 많은, 80%보다 많은, 85%보다 많은, 90%보다 많은, 95%보다 많은, 또는 99%보다 많은 퍼센트 동일성을 공유할 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR4는 wt 4E11 (서열 번호 6 및 서열 번호 13)과 비교하여 아미노산 치환을 갖지 않을 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR4는 wt 4E11 (서열 번호 6 및 서열 번호 13)과 비교하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다. 일부 구체예에서, 제공된 FR4는 wt 4E11 (서열 번호 6 및 서열 번호 13)과 비교하여 2개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 가질 것이다.

[0200] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VH CDR은 wt 4E11 (서열 번호: 7-9)과 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 80%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99% 동일성을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VH CDR은 wt 4E11 (서열 번호: 7-9)과 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 80%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99% 동일성을 보여주지만, CDR 내에 최소한 하나의 아미노산 치환의 치환에 의해 다르다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VH CDR은 wt 4E11 항체의 위치 55에서 상응하는 아미노산 잔기의 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 위치 55에서 대용품 아미노산 잔기는 글루탐산염과 아스파르트산염으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 위치 55에서 대용품 아미노산 잔기는 글루탐산염이다. 일부 구체예에서, wt 4E11의 위치 55에서 아미노산 잔기에 상응하는 제공된 항체의 VH CDR에서 아미노산 잔기는 알라닌이 아니다.

[0201] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VL CDR은 wt 4E11 (서열 번호: 14-16)과 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 80%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99% 동일성을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VL CDR은 wt 4E11 (서열 번호: 14-16)과 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 80%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99% 동일성을 보여주지만, CDR 내에 최소한 하나의 아미노산 치환의 치환에 의해 다르다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VL CDR은 wt 4E11 항체의 위치 31, 57, 59, 60 및/또는 이들의 조합에서 상응하는 아미노산 잔기의 하나 또는 그 이상의 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VL CDR은 wt 4E11 항체의 위치 31에서 상응하는 아미노산 잔기의 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 위치 31에서 대용품 아미노산 잔기는 리신이다. 일부 구체예에서, wt 4E11의 위치 55에서 아미노산 잔기에 상응하는 제공된 항체 작용제의 VL CDR에서 아미노산 잔기는 아르기닌이 아니다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VL CDR은 wt 4E11 항체의 위치 57에서 상응하는 아미노산 잔기의 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 위치 57에서 대용품 아미노산 잔기는 글루탐산염과 세린으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 위치 57에서 대용품 아미노산 잔기는 글루탐산염이다. 일부 구체예에서, wt 4E11의 위치 57에서 아미노산 잔기에 상응하는 제공된 항체 작용제의 VL CDR에서 아미노산 잔기는 아스파라긴이 아니다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VL CDR은 wt 4E11 항체의 위치 59에서 상응하는 아미노산 잔기의 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 위치 59에서 대용품 아미노산 잔기는 글루타민과 아스파라긴으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 위치 59에서 대용품 아미노산 잔기는 글루타민이다. 일부 구체예에서, wt 4E11의 위치 59에서 아미노산 잔기에 상응하는 제공된 항체 작용제의 VL CDR에서 아미노산 잔기는 글루탐산염이 아니다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VL CDR은 wt 4E11 항체의 위치 60에서 상응하는 아미노산 잔기의 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 위치 60에서 대용품 아미노산 잔기는 트립토판, 티로신, 그리고 아르기닌으로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 위치 60에서 대용품 아미노산 잔기는 트립토판이다. 일부 구체예에서, wt 4E11의 위치 60에서 아미노산 잔기에 상응하는 제공된 항체 작용제의 VL CDR에서 아미노산 잔기는 세린이 아니다.

[0202] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VH와 VL CDR은 wt 4E11 (각각, 서열 번호: 7-9 및 14-16)과 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 80%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99% 동일성을 보여준다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VH와 VL CDR은 wt 4E11 (각각, 서열 번호: 7-9 및 14-16)과 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 80%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 99% 동일성을 보여주지만, 이들 CDR 내에 최소한 하나의 아미노산 치환의 치환에 의해 다르다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 VH CDR은 wt 4E11 항체의 위치 55에서 상응하는 아미노산 잔기의 치환을 갖고, 그리고 제공된 항체 작용제의 VL CDR은 wt 4E11 항체의 위치 31, 57, 59와 60에서 상응하는 아미노산 잔기의 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 위치 55에서 대용품 아미노산 잔기는 글루탐산염이다. 일부 구체예에서, 위치 31에서 대용품 아미노산 잔기는 리신이다. 일부 구체예에서, 위치 57에서 대용품 아미노산 잔기는 글루탐산염이다. 일부 구체예에서, 위치 59에서 대용품 아미노산 잔기는 글루타민이다. 일

부 구체예에서, 위치 60에서 대용품 아미노산 잔기는 트립토판이다.

[0203] 일부 구체예에서, 본 발명은 40000nM 보다 적은, 30000nM 보다 적은, 20000nM 보다 적은, 15000nM 보다 적은, 10000nM 보다 적은, 8000nM 보다 적은, 5000nM 보다 적은, 4000nM 보다 적은, 3000nM 보다 적은, 2000nM 보다 적은, 1500nM 보다 적은, 1000nM 보다 적은, 500nM 보다 적은, 250nM 보다 적은, 225nM 보다 적은, 200nM 보다 적은, 175nM 보다 적은, 150nM 보다 적은, 125nM 보다 적은, 100nM 보다 적은, 75nM 보다 적은, 또는 50nM 보다 적은 K_D (nM)로 EDIII-DV4 (서열 번호 20)에 결합을 보여주는 항체 작용제를 제공한다.

[0204] 일부 구체예에서, 본 발명은 3nM 보다 적은, 2.5nM 보다 적은, 2nM 보다 적은, 1.5nM 보다 적은, 1.0nM 보다 적은, 0.5nM 보다 적은, 0.4nM 보다 적은, 0.3nM 보다 적은, 0.2nM 보다 적은, 0.1nM보다 적은, 또는 0.05nM 보다 적은 K_D (nM)로 EDIII-DV1 (서열 번호 17)에 결합을 보여주는 항체 작용제를 제공한다.

[0205] 일부 구체예에서, 본 발명은 15 nM 보다 적은, 12nM 보다 적은, 10nM 보다 적은, 8nM 보다 적은, 7nM 보다 적은, 5nM 보다 적은, 2.5nM 보다 적은, 2nM 보다 적은, 1.5nM 보다 적은, 1nM 보다 적은, 0.5nM 보다 적은, 0.4nM 보다 적은, 0.3nM 보다 적은, 0.2nM 보다 적은, 또는 0.1nM보다 적은 K_D (nM)로 EDIII-DV2 (서열 번호 18)에 결합을 보여주는 항체 작용제를 제공한다.

[0206] 일부 구체예에서, 본 발명은 120nM 보다 적은, 100nM 보다 적은, 50nM 보다 적은, 40nM 보다 적은, 35nM 보다 적은, 30nM 보다 적은, 25nM 보다 적은, 20nM 보다 적은, 15nM 보다 적은, 10nM 보다 적은, 5nM 보다 적은, 2.5nM 보다 적은, 또는 1.0nM 보다 적은 K_D (nM)로 EDIII-DV3 (서열 번호 19)에 결합을 보여주는 항체 작용제를 제공한다.

[0207] 일부 구체예에서, 본 발명은 wt 4E11보다 EDIII-DV4에 결합에 대해 최소한 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 60-배, 70-배, 80-배, 90-배, 100-배, 200-배, 300-배, 400-배, 500-배, 또는 그 이상 친화성을 갖는 항체 작용제를 제공한다.

[0208] 일부 구체예에서, 본 발명은 wt 4E11보다 EDIII-DV2에 결합에 대해 최소한 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 60-배, 70-배, 80-배, 90-배, 또는 그 이상 친화성을 갖는 항체 작용제를 제공한다.

[0209] 일부 구체예에서, 본 발명은 wt 4E11보다 EDIII-DV1 및/또는 EDIII-DV3에 결합에 대해 최소한 1-배, 1.5-배, 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 60-배, 또는 그 이상 친화성을 갖는 항체 작용제를 제공한다.

[0210] 일부 구체예에서, 본 발명은 60 ug/ml 또는 그 이하, 50 ug/ml 또는 그 이하, 40 ug/ml 또는 그 이하, 30 ug/ml 또는 그 이하, 20 ug/ml 또는 그 이하, 10 ug/ml 또는 그 이하, 5 ug/ml 또는 그 이하, 4 ug/ml 또는 그 이하, 3 ug/ml 또는 그 이하, 2 ug/ml 또는 그 이하의 EDIII-DV4 (서열 번호 20)의 중화 IC_{50} (ug/ml)을 보여주는 항체 작용제를 제공한다.

[0211] 일부 구체예에서, 본 발명은 7.0 ug/ml 또는 그 이하, 6.0 ug/ml 또는 그 이하, 5.0 ug/ml 또는 그 이하, 4.0 ug/ml 또는 그 이하, 3.0 ug/ml 또는 그 이하, 2.0 ug/ml 또는 그 이하, 1.5 ug/ml 또는 그 이하, 1.0 ug/ml 또는 그 이하, 0.90 ug/ml 또는 그 이하, 0.80 ug/ml 또는 그 이하, 0.70 ug/ml 또는 그 이하, 0.60 ug/ml 또는 그 이하, 0.50 ug/ml 또는 그 이하의 EDIII-DV3 (서열 번호 19)의 중화 IC_{50} (ug/ml)을 보여주는 항체 작용제를 제공한다.

[0212] 일부 구체예에서, 본 발명은 0.2 ug/ml 또는 그 이하, 0.19 ug/ml 또는 그 이하, 0.18 ug/ml 또는 그 이하, 0.17 ug/ml 또는 그 이하, 0.16 ug/ml 또는 그 이하, 0.15 ug/ml 또는 그 이하, 0.14 ug/ml 또는 그 이하, 0.13 ug/ml 또는 그 이하, 0.12 ug/ml 또는 그 이하, 0.11 ug/ml 또는 그 이하, 0.10 ug/ml 또는 그 이하, 0.09 ug/ml 또는 그 이하, 0.07 ug/ml 또는 그 이하, 0.06 ug/ml 또는 그 이하, 0.05 ug/ml 또는 그 이하, 0.04 ug/ml 또는 그 이하, 0.03 ug/ml 또는 그 이하, 0.02 ug/ml 또는 그 이하, 0.01 ug/ml 또는 그 이하의 EDIII-DV2 (서열 번호 18)의 중화 IC_{50} (ug/ml)을 보여주는 항체 작용제를 제공한다.

[0213] 일부 구체예에서, 본 발명은 5.0 ug/ml 또는 그 이하, 4.0 ug/ml 또는 그 이하, 3.0 ug/ml 또는 그 이하, 2.5 ug/ml 또는 그 이하, 2.0 ug/ml 또는 그 이하, 1.5 ug/ml 또는 그 이하, 1.0 ug/ml 또는 그 이하, 0.90 ug/ml 또는 그 이하, 0.70 ug/ml 또는 그 이하, 0.50 ug/ml 또는 그 이하, 0.40 ug/ml 또는 그 이하, 0.30 ug/ml 또는 그 이하, 0.20 ug/ml 또는 그 이하, 0.10 ug/ml 또는 그 이하의 EDIII-DV1 (서열 번호 17)의 중화 IC_{50}

(ug/ml)을 보여주는 항체 작용제를 제공한다.

[0214] 일부 구체예에서, 본 발명은 wt 4E11보다 EDIII-DV4의 중화에 대한 IC_{50}의 최소한 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 60-배, 70-배, 80-배, 90-배, 100-배, 150-배, 200-배, 400-배, 500-배, 또는 그 이상 감소를 갖는 항체 작용제를 제공한다.

[0215] 일부 구체예에서, 본 발명은 wt 4E11보다 EDIII-DV2의 중화에 대한 IC_{50}의 최소한 1-배, 1.5-배, 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 60-배, 또는 그 이상 감소를 갖는 항체 작용제를 제공한다.

[0216] 일부 구체예에서, 본 발명은 wt 4E11보다 EDIII-DV1 및/또는 EDIII-DV3의 중화에 대한 IC_{50}의 최소한 1-배, 1.5-배, 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 60-배, 또는 그 이상 감소를 갖는 항체 작용제를 제공한다.

[0217] 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제에서 하나 또는 그 이상의 서열은 당분야에 공지된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 특징 또는 활성을 향상시키기 위해 (가령, 안정성을 증가시키고, 응집을 감소시키고, 면역원성을 감소시키고, 기타 등등을 위해) 가공되었다 (가령, 친화성 성숙 또는 다른 최적화 접근법에 의해).

[0218] 일부 구체예에서, 항체 작용제는 페길화, 메틸화, 시알화, 아미노화 또는 황산화에 의해 변형된다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 중합성 미셀을 생산하기 위해 양친매성 코어/껍질에 접합된다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 초분기된 거대 분자 (즉, 덴드리머)에 접합된다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 알부민, 키토산, 헤파린, 파클리탁셀, 폴리-(L-글루탐산염), N-(2-히드록시프로필) 메타크릴아미드 (HPMA), 폴리-(L-락티드) (PLA), 폴리(아미도아민) (PAMAM), 엽산염 및/또는 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 자연 중합체에 접합된다. 일부 구체예에서, 항체 작용제는 친수성 아미노산의 하나 또는 그 이상의 긴 비구조화된 꼬리 (rPEG)를 포함한다. 일부 구체예에서, 항체 결합 부위를 변경하지 않는 반응 조건을 이용하여, 면역글로불린의 Fc 영역에서 술피드릴 기를 선별적으로 도입함으로써 면역글로불린의 유도체화가 예기된다. 이러한 방법에 따라 생산된 항체 접합체는 향상된 수명, 특이성과 감수성을 전시할 수 있다 (본원에서 참조로서 편입된 U.S. 특허 번호 5,196,066). 작동체 또는 리포터 분자의 부위-특이적 부착 역시 기존 문헌 (O'Shannessy *et al.*, 1987)에서 개시되었는데, 여기서 리포터 또는 작동체 분자는 Fc 영역에서 탄수화물 잔기에 접합된다.

[0219] *항체 및/또는 항체 단편*

[0220] 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 항체 또는 이의 단편이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 단일클론 항체 또는 이의 단편이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 다중클론 항체 또는 이의 단편이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, DV 항체 작용제는 자연적으로-생산된 항체에서 일어나는 바와 같은 이황화 결합에 의해 임의선택적으로 연관된 2개 중쇄 및 2개 경쇄를 내포한다는 점에서, "전장" 항체 이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, DV 항체 작용제는 전장 항체에서 발견되는 서열 전체가 아닌 일부를 내포한다는 점에서, 전장 항체의 단편이거나 또는 이를 포함한다. 예로서, 일부 구체예에서, DV 항체 작용제는 Fab, Fab', F(ab')2, scFv, Fv, dsFv 디아바디, 그리고 Fd 단편이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 항체 단편이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE 또는 이의 단편으로 구성된 군에서 선택되는 항체 부류의 구성원인 항체이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 화학적 합성에 의해 생산된 항체이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 세포에 의해 생산된 항체이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 재조합 세포 배양 시스템을 이용하여 생산된 항체이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 인간 불변 및/또는 가변 영역 도메인을 보유하는, 예로서 생쥐, 쥐, 말, 돼지, 또는 다른 종으로부터 키메라 항체이거나 또는 이를 포함한다.

[0221] 일부 구체예에서, DV 항체 작용제는 Fab', Fab, F(ab')2, 단일 도메인 항체 (DABs), Fv, scFv (단일 사슬 Fv), 항체 CDR을 갖는 폴리펩티드, 이들 CDR을 전시하는 골격 도메인 (가령, 안티칼린) 또는 나노바디가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 하나 또는 그 이상의 항체 단편을 포함한다. 예로서, 제공된 항체는 단지 중쇄만을 포함하는 VHH (즉, 항원-특이적 VHH) 항체일 수 있다. 이런 항체 분자는 라마 또는 다른 낙타 항체 (가령, 낙타 IgG2 또는 IgG3, 또는 이런 낙타 Ig로부터 CDR-전시 프레임)로부터 또는 상어 항체로부터 유래될 수 있다. 일부 구체예에서, DV 항체 작용제는 아비바디 (디아바디, 트리바디, 테트라바디)이거나 또는 이를 포함한다. 다양한 항체-기초된 구조체와 단편을 제조하고 이용하기 위한 기술은 당분야에서 널리 공지되어 있다. 항체를 제조하고

특징짓기 위한 수단 역시 당분야에서 널리 공지되어 있다 (가령, 본원에서 참조로서 편입된 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988을 참조한다).

[0222] 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 하나 또는 그 이상의 "미니-항체" 또는 "미니바디"를 포함한다. 미니바디는 힌지 영역에 의해 sFv로부터 분리된, 그들의 C-말단에서 올리고머화 도메인을 포함하는 sFv 폴리펩티드 사슬이다 (Pack *et al.* (1992) *Biochem* 31:1579-1584). 올리고머화 도메인은 추가 이황화 결합에 의해 더욱 안정될 수 있는 자가-결합 α-나선, 예를 들면, 류신 지퍼를 포함한다. 올리고머화 도메인은 폴리펩티드의 기능적 결합 단백질로의 생체내 접힘을 용이하게 하는 것으로 생각되는 과정인 막을 교차하여 벡터 접힘과 양립하도록 설계된다. 일반적으로, 미니바디는 당분야에서 널리 공지된 재조합 방법을 이용하여 생산된다. 가령, Pack *et al.* (1992) Biochem 31:1579-1584; Cumber *et al.* (1992) *J Immunology* 149B:120-126을 참조한다.

[0223] *항체 작용제 접합체*

[0224] 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 접합체이거나 또는 이를 포함하는데, 여기서 항체 모이어티는 접합된 모이어티와 함께 항체 또는 이의 기능적 부분을 포함하거나 또는 이것으로 구성된다. 일부 특정 구체예에서, 본원에서 설명된 바와 같이 DV 항체 작용제는 하나 또는 그 이상의 활성제 또는 "유상하중", 예를 들면, 치료 또는 검출 작용제와 관련하여 제공되고 및/또는 활용된다. 일부 이런 구체예에서, DV 항체 작용제와 활성제 및/또는 유상하중 사이에 연관은 최소한 하나의 공유 상호작용을 포함하고, 따라서 DV 항체 접합체가 제공된다.

[0225] 일부 구체예에서, 항체 작용제는 치료적 유상하중 작용제이고, 이것은 원하는 활성, 예를 들면, 항-바이러스성 활성, 항염증성 활성, 세포독성 활성 등을 갖는 작동체 실체이다. 치료제는 예로서, 단백질, 탄수화물, 지질, 핵산, 작은 유기 분자, 비-생물학적 중합체, 금속, 이온, 방사성동위원소 등을 비롯한 화학적 실체의 임의의 부류이거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 용도를 위한 치료제는 DV 감염의 하나 또는 그 이상의 증상 또는 원인의 치료에 유관한 생물학적 활성 (가령, 예로서, 항-바이러스성, 통증-경감, 항염증성, 면역조절성, 수면-유도 활성 등)을 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 용도를 위한 치료제는 하나 또는 그 이상의 다른 활성을 갖는다.

[0226] 일부 구체예에서, 항체 작용제는 예로서, 특정한 기능적 성질 및/또는 화학적 특징으로 인해 검정을 이용하여 검출될 수 있는 임의의 모이어티이거나 또는 이를 포함하는 유상하중 검출 작용제이다. 이런 작용제의 무제한적 실례에는 효소, 방사성표지, 합텐, 형광 라벨, 인광성 분자, 화학발광 분자, 발색단, 발광 분자, 광친화성 분자, 유색 입자 또는 리간드, 예를 들면, 비오틴이 포함된다.

[0227] 많은 적절한 유상하중 검출 작용제는 당분야에 공지되어 있고, 항체에 그들의 부착을 위한 시스템 역시 그러하다 (가령, 본원에서 각각 참조로서 편입되는 U.S. 특허 번호 5,021,236; 4,938,948; 그리고 4,472,509를 참조한다). 이런 유상하중 검출 작용제의 실례에는 그 중에서도 특히, 상자성 이온, 방사성 동위원소, 형광색소, NMR-검출가능한 물질, x-선 영상화 작용제가 포함된다. 예로서, 일부 구체예에서, 상자성 이온은 크롬 (III), 망간 (II), 철 (III), 철 (II), 코발트 (II), 니켈 (II), 구리 (II), 네오디뮴 (III), 사마륨 (III), 이테르븀 (III), 가돌리늄 (III), 바나듐 (II), 테르븀 (III), 디스프로지움 (III), 홀뮴 (III), 에르븀 (III), 란타늄 (III), 금 (III), 납 (II), 및/또는 비스무트 (III) 중에서 하나 또는 그 이상이다.

[0228] 일부 구체예에서, 방사성 동위원소는 아스타틴211, 14탄소, 51크롬, 36염소, 57코발트, 58코발트, 구리67, 152Eu, 갈륨67, 3수소, 요오드123, 요오드125, 요오드131, 인듐111, 59철, 32인, 라듐223, 레늄186, 레늄188, 75셀레늄, 35황, 테크니슘99m, 토륨227 및/또는 이트륨90 중에서 하나 또는 그 이상이다. 방사성으로 표지화된 항체 작용제는 당분야에서 널리 공지된 방법에 따라 생산될 수 있다. 예로서, 단일클론 항체는 나트륨 및/또는 칼륨 요오드화물 및 화학적 산화제, 예를 들면, 나트륨 차아염소산염, 또는 효소적 산화제, 예를 들면, 락토페르옥시다아제와의 접촉에 의해 요오드화될 수 있다. 제공된 항체 작용제는 리간드 교환 과정에 의해, 예를 들면, 퍼테크네이트를 주석 용액으로 환원시키고, 환원된 테크네튬를 세파덱스 칼럼 위에서 킬레이팅하고, 그리고 항체를 이러한 칼럼에 적용함에 의해 테크네튬99m으로 표지화될 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 예로서, 퍼테크네이트, 환원제, 예를 들면, $SNCl_2$, 완충액, 예를 들면, 나트륨-칼륨 프탈산염 용액, 그리고 항체를 항온처리함으로써 직접적인 표지화 기술을 이용하여 표지화된다. 금속성 이온으로서 존재하는 방사성동위원소를 항체에 결합하는데 종종 이용되는 중간 기능기는 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA) 또는 에틸렌 디아민테트라아세트산 (EDTA)이다.

[0229] 일부 구체예에서, 형광 라벨은 그 중에서도 특히, Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY

650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 캐스케이드 블루, Cy3, Cy5, 6-FAM, 플루오레세인 이소티오시안산염, HEX, 6-JOE, 오레건 그린 488, 오레건 그린 500, 오레건 그린 514, 퍼시픽 블루, REG, 로다민 그린, 로다민 레드, 레노그라핀, ROX, TAMRA, TET, 테트라메틸로다민, 및/또는 텍사스 레드 중에서 하나 또는 그 이상이거나 또는 이를 포함한다.

[0230] 유상하중에 항체 작용제의 부착 또는 접합을 위한 여러 방법이 당분야에 공지되어 있다. 일부 부착 방법은 예로서, 항체에 부착된 유기 킬레이트화제, 예를 들면, 디에틸렌트리아민펜타아세트산 무수물 (DTPA); 에틸렌트리아민펜타아세트산; N-클로로-p-톨루엔술폰아미드; 및/또는 테트라클로로-3α-6α-디페닐글리코우릴-3을 이용하는 금속 킬레이트약 복합체의 이용을 수반한다 (본원에서 각각 참조로서 편입된 U.S. 특허 번호 4,472,509와 4,938,948). 제공된 DV 항체 작용제는 또한, 커플링 작용제, 예를 들면, 글루타르알데히드 또는 과옥소산염의 존재에서 효소와 반응될 수도 있다. 플루오레세인 마커를 갖는 접합체는 이들 커플링 작용제의 존재에서 또는 이소티오시안산염과의 반응에 의해 제조된다.

[0231] *항체의 생산*

[0232] 항체, 및/또는 이들의 특징적인 부분, 또는 이들을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제공된 항체 작용제는 임의의 가용한 수단에 의해 생산될 수 있다. 항체 (가령, 단일클론 항체 및/또는 다중클론 항체)를 산출하기 위한 방법은 당분야에서 널리 공지되어 있다. 토끼, 생쥐, 쥐, 햄스터, 기니 피그 또는 염소를 비롯하여, 항혈청의 생산을 위한 넓은 범위의 동물 종이 이용될 수 있는 것으로 인지될 것이다. 동물의 선택은 당업자에게 알려져 있는 바와 같이, 조작의 용이함, 비용 또는 혈청의 원하는 양에 따라 결정될 수 있다. 항체 작용제는 또한, 관심되는 면역글로불린 중쇄와 경쇄 서열에 대해 유전자도입된 포유동물 또는 식물의 산출, 그리고 그것으로부터 회수가능한 형태로 항체의 생산을 통해 유전자도입에 의해 생산될 수 있는 것으로 인지될 것이다. 포유동물에서 유전자도입 생산과 관련하여, 항체는 염소, 소, 또는 다른 포유동물의 모유에서 생산되고, 그리고 이로부터 회수될 수 있다. 예로서, U.S. 특허 번호 5,827,690, 5,756,687, 5,750,172, 그리고 5,741,957을 참조한다.

[0233] 제공된 항체 작용제 (항체 및/또는 특징적인 부분 포함)는 예로서, 발명 항체-인코딩 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포 시스템을 활용함으로써 생산될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 제공된 항체 작용제는 화학적 합성 (가령, 자동화된 펩티드 합성장치를 이용)에 의해 부분적으로 또는 완전히 제조될 수 있다.

[0234] 본 발명에 적합한 항체 작용제 제조물을 위한 예시적인 공급원에는 관심되는 단백질을 발현하는 재조합 세포주를 배양하는 것으로부터, 또는 예로서, 항체 생산 세포, 세균, 진균 세포, 곤충 세포, 유전자도입 식물 또는 식물 세포, 유전자도입 동물 또는 동물 세포, 또는 동물의 혈청, 복수 액체, 하이브리도마 또는 골수종 상층액의 세포 추출물로부터 유래된 조건 배양 배지가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적합한 세균 세포에는 대장균 (*Escherichia coli*) 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적합한 대장균 (*E. coli*) 균주의 실례에는 HB101, DH5α, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, 그리고 외래 DNA를 개열하는데 실패하는 임의의 대장균 (*E. coli*) 균주가 포함된다. 이용될 수 있는 적합한 진균의 숙주 세포에는 사카로미세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*)와 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적합한 곤충 세포에는 S2 Schneider 세포, D. Mel-2 세포, SF9, SF21, High-5™, Mimic™ -SF9, MG1과 KC1 세포가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적합한 예시적인 재조합 세포주에는 BALB/c 생쥐 골수종 계통, 인간 망막모세포 (PER.C6), 원숭이 신장 세포, 인간 배아 신장 계통 (293), 아기 햄스터 신장 세포 (BHK), 중국 햄스터 난소 세포 (CHO), 생쥐 세르톨리 세포, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76), 인간 경부 암종 세포 (HeLa), 개의 신장 세포, 버팔로 쥐 간 세포, 인간 폐 세포, 인간 간 세포, 생쥐 유방 종양 세포, TRI 세포, MRC 5 세포, FS4 세포, 그리고 인간 간암 계통 (Hep G2)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0235] 관심되는 항체 작용제는 당분야에 공지된 다양한 벡터 (가령, 바이러스 벡터)를 이용하여 발현될 수 있고, 그리고 세포는 당분야에 공지된 다양한 조건 (가령, 유가식) 하에 배양될 수 있다. 항체를 생산하는 세포를 유전적으로 조작하는 다양한 방법은 당분야에서 널리 공지되어 있다. 예로서, Ausabel et al., eds. (1990), Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York)를 참조한다.

[0236] 제공된 항체 작용제는 원하는 경우에, 여과, 원심분리 및/또는 다양한 크로마토그래프 방법, 예를 들면, HPLC 또는 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 항체 작용제의 단편은 효소, 예를 들면, 펩신 또는 파파인으로 소화를 포함하는 방법에 의해, 및/또는 화학적 환원에 의한 이황화 결합의 개

열에 의해 획득된다.

[0237] *핵산*

[0238] 일정한 구체예에서, 본 발명은 항체 작용제를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 항체 작용제를 인코딩하는 핵산에 상보적인 핵산을 제공한다.

[0239] 일부 구체예에서, 본 발명은 항체 작용제를 인코딩하는 핵산에 혼성화하는 핵산 분자를 제공한다. 이런 핵산은 예로서, 프라이머로서 또는 프로브로서 이용될 수 있다. 몇 가지 실례를 들자면, 이런 핵산은 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에서 프라이머로서, 혼성화 (제자리 혼성화 포함)를 위한 프로브로서, 및/또는 역전사-PCR (RT-PCR)을 위한 프라이머로서 이용될 수 있다.

[0240] 일정한 구체예에서, 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있고, 그리고 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 일부 구체예에서, 핵산은 하나 또는 그 이상의 비-자연 뉴클레오티드를 포함할 수 있다; 일부 구체예에서, 핵산은 단지 자연 뉴클레오티드만을 포함한다.

[0241] *DV-관련된 작용제의 특성화 및/또는 확인*

[0242] 일부 구체예에서, 본 발명은 DV 에피토프 또는 작용제를 모의하고 및/또는 DV에 대한 강한 항체 반응을 유도하는 하나 또는 그 이상의 작용제를 확인하고 및/또는 특징짓는데 이용될 수 있는 항체 작용제를 제공한다.

[0243] 일부 구체예에서, 이런 작용제에는 하나 또는 그 이상의 항체-유사 결합 펩티드모방체가 포함된다. Liu *et al. Cell Mol Biol* (Noisy-le-grand). 2003 Mar;49(2):209-16은 "항체 유사 결합 펩티드모방체" (ABiPs)를 설명하는데, 이들은 삭감된 항체로서 기능하고 더욱 긴 혈청 반감기뿐만 아니라 덜 번거로운 합성 방법의 일정한 이점을 갖는 펩티드이다. 유사하게, 일부 양상에서, 항체-유사 분자는 환상 또는 이중환상 펩티드이다. 예로서, 항원-결합 이중환상 펩티드를 단리하고 (가령, 파지 전시에 의해) 이런 펩티드를 이용하기 위한 방법은 본원에서 참조로서 편입된 U.S. 특허 공개 번호 20100317547에서 제공된다.

[0244] 일부 구체예에서, 이런 작용제는 하나 또는 그 이상의 항체-유사 결합 골격 단백질을 포함한다. 예로서, 일부 구체예에서, 항체로부터 발생하는 하나 또는 그 이상의 CDR은 단백질 골격 위에 합체될 수 있다. 일반적으로, 단백질 골격은 하기 기준 중에서 최대 숫자를 충족할 수 있다: (Skerra A., *J. Mol. Recogn.,* 2000, 13:167-187): 좋은 계통발생적 보존; 공지된 3-차원 구조 (예로서, 결정학, NMR 분광법 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 기술에 의해); 작은 크기; 극소수 전사후 변경 또는 전사후 변경 없음; 및/또는 생산, 발현과 정화의 용이성. 이런 단백질 골격의 기원은 섬유결합소 (가령, 섬유결합소 유형 III 도메인 10), 리포칼린, 안티칼린 (Skerra A., *J. Biotechnol.,* 2001, 74(4):257-75), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)의 단백질 A의 도메인 B로부터 발생하는 단백질 Z, 티오레독신 A 또는 반복된 모티프, 예를 들면, "안키린 반복" (Kohl *et al.*, *PNAS,* 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), "아르마딜로 반복", "류신-풍부한 반복" 및 "테트라트리코펩티드 반복"을 갖는 단백질일 수 있지만 이들에 국한되지 않는다. 예로서, 안티칼린 또는 리포칼린 유도체는 본원에서 참조로서 편입된 US 특허 공개 번호 20100285564, 20060058510, 20060088908, 20050106660, 그리고 PCT 공개 번호 WO2006/056464에서 설명된다. 독소, 예를 들면, 예로서, 전갈, 곤충, 식물, 연체동물 등으로부터 독소로부터 유래된 골격, 그리고 뉴런 NO 신타아제 (PIN)의 단백질 저해제 역시 본 발명에 따라서 이용될 수 있다.

[0245] 일부 구체예에서, 이런 작용제는 인플루엔자 바이러스와 HA 폴리펩티드 수용체 사이에 상호작용을 교란시키는데 이용될 수 있는 미모토프를 포함한다. 일부 구체예에서, 미모토프는 상응하는 표적 에피토프에 의해 유도된 것과 동일한 또는 유사한 항체 반응을 이끌어 내는데 이용된다. 일부 구체예에서, 표적 에피토프는 하나 이상의 DV 혈청형을 교차하여 보존되는 서열이다. 일부 구체예에서, 보존된 에피토프는 DV 혈청형 1-4를 교차하여 보존되는 서열이다. 일부 구체예에서, 에피토프는 E 당단백질의 A-가닥 영역 내에 위치하는 보존된 서열이다. 일부 구체예에서, 미모토프는 펩티드이다. 일부 구체예에서, 미모토프는 소형 분자, 탄수화물, 지질, 또는 핵산이다. 일부 구체예에서, 미모토프는 보존된 인플루엔자 에피토프의 펩티드 또는 비-펩티드 미모토프이다. 일부 구체예에서, 규정된 바이러스 에피토프의 구조를 모방함으로써, 미모토프는 예로서, 자연 결합 상대 그 자체에 결합함으로써, 자연 결합 상대에 결합하는 DV 입자의 능력을 간섭한다.

[0246] 일부 구체예에서, 이런 작용제는 스테이플식 펩티드이다. 일부 구체예에서, 스테이플식 펩티드는 항-DV 항체 (가령, 4E11)의 상응하는 CDR 및/또는 FR과 최소한 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94,

95, 96, 97, 98 또는 99 %보다 큰 상동성 및/또는 동일성을 포함하는 하나 또는 그 이상의 CDR 및/또는 FR을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 스테이플식 펩티드는 항-DV 항체 (가령, 4E11)의 상응하는 VH와 VL 사슬과 최소한 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99 %보다 큰 상동성 및/또는 동일성을 포함하는 하나 또는 그 이상의 VH 및/또는 VL 사슬 서열을 인코딩하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0247] 일정한 구체예에서, 이런 작용제는 핵산, 예를 들면, DNA 또는 RNA이거나 또는 이를 포함한다. 일정한 구체예에서, 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있고, 그리고 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 일부 구체예에서, 핵산은 하나 또는 그 이상의 비-자연 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 핵산은 단지 자연 뉴클레오티드만을 포함한다. 일부 구체예에서, 핵산은 DV 폴리펩티드 내에 에피토프를 모의하도록 설계된다. 일부 구체예에서, 핵산은 하나 또는 그 이상의 DV 혈청형 내에 보존된 에피토프를 모의하도록 설계된다. 일부 구체예에서, 이런 작용제는 하나 또는 그 이상의 올리고뉴클레오티드이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 이런 작용제는 이차 구조, 예를 들면, 루프, 헤어핀, 접힘 또는 이들의 조합을 포함하는 하나 또는 그 이상의 올리고뉴클레오티드이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 이런 작용제는 고차 (삼차 또는 사차) 구조를 포함하는 하나 또는 그 이상의 올리고뉴클레오티드이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 이런 작용제는 앱타머이거나 또는 이를 포함한다.

[0248] 일부 구체예에서, 백신은 환자에서 결여하는 것으로 밝혀진 항체의 생산을 유도하도록 설계될 수 있다. 일부 구체예에서, 백신 조성물은 선천적 입체형태를 갖고, 보호 반응 (가령, 보체 활성화, 바이러스 중화 등)을 매개하고, 및/또는 강한 항체 반응을 유도할 수 있는 항원을 포함하는 것이 바람직하다. 일부 구체예에서, 백신은 항체가 개체에서 자연적으로 생산되지 않는 에피토프 또는 이의 미모토프를 내포한다. 예로서, DV 항체 (가령, 복수의 혈청형을 인식하는 DV 항체)로 단리된 합성 펩티드 미모토프는 미모토프의 본래 단리에서 이용된 항체와 유사한 유력한 면역 반응을 유도하는 잠재력을 갖는다. 이런 백신의 투여는 환자의 면역계가 투여된 에피토프에 대한 항체의 세트를 생산하는 것을 시작하도록 유도할 지도 모른다. 본 발명에 따른 미모토프 (또는 에피토프)는 단독으로 또는 재조합 단백질, 불활성화된 DV 바이러스, 사멸된 DV 바이러스와 합동으로, 및/또는 여러 상이한 미모토프의 칵테일로서 이용될 수 있는 것으로 인지될 것이다.

[0249] 일부 구체예에서, DV에 대한 백신은 능동 면역화 (즉, 미생물, 단백질, 펩티드, 에피토프, 미모토프 등이 개체에 투여되는 면역화)를 위해 활용될 수 있다. 일부 구체예에서, DV에 대한 백신은 DV 외피 당단백질의 DV A-가닥 영역의 최소한 하나의 입체형태적 에피토프를 모의하는 임의의 작용제를 포함하고 이용될 수 있다. 예로서, 작용제는 펩티드, 단백질, 당펩티드, 당단백질, 소형 분자, 미모토프, 유기 화합물, 지질, 사카라이드, 유기금속 화합물, 무기화합물 등이다. 일부 구체예에서, 백신에서 발현된 에피토프는 감염을 예방하는 것으로 알려진 항체가 지향되는 것들을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 백신에서 발현된 에피토프는 바이러스의 상이한 유전자형 및/또는 아형 사이에서 또는 바이러스의 상이한 균주 사이에서 보존된 것들을 포함한다. 일부 구체예에서, DV의 A-가닥 영역의 입체형태적으로 규정된 에피토프를 내포하는 펩티드 또는 단백질이 DV에 의한 감염을 예방하고, 이의 시작을 지연시키고, 이를 치료하고, 이의 증상을 개선하고, 및/또는 이의 심각도를 감소시키기 위해 백신의 제제에서 이용된다. 일부 구체예에서, DV A-가닥 영역 에피토프는 선형 에피토프일 수 있다. 일부 구체예에서, A-가닥 영역 에피토프는 선형과 입체형태적 에피토프의 혼합물일 수 있다. 일부 구체예에서, A-가닥 영역 에피토프는 입체형태적 에피토프일 수 있다. 일부 구체예에서, 펩티드 에피토프는 길이에서 100개 아미노산보다 작다. 일정한 구체예에서, 펩티드 에피토프는 길이에서 50개 아미노산보다 작거나, 40개 아미노산보다 작거나, 30개 아미노산보다 작거나, 20개 아미노산보다 작거나, 또는 10개 아미노산보다 작다. 일부 구체예에서, 백신을 조제하는데 이용되는 펩티드는 DV의 A-가닥 영역 단백질의 펩티드 단편이다. 전형적으로, 선천적 A-가닥 영역 단백질에서 3-차원 접힘과 유사한 방식으로 접히고, 따라서 입체형태적 에피토프의 3-차원 구조를 보존하는 펩티드가 이용된다.

[0250] *DV-결합제를 확인하고 및/또는 특징짓기 위한 시스템*

[0251] 본 발명은 DV 항체 작용제를 시험하고, 특징짓고, 및/또는 확인하기 위한 다양한 시스템을 제공한다. 일부 구체예에서, 제공된 DV 항체 작용제는 다른 DV-결합제 (가령, 항체, 폴리펩티드, 소형 분자 등)을 확인하고 및/또는 특징짓는데 이용된다.

[0252] 일부 구체예에서, 제공된 DV-결합제는 DV-결합제를 하나 또는 그 이상의 후보 기질, 예를 들면, DV 폴리펩티드의 영역, DV 폴리펩티드 상에서 N-글리칸, DV 수용체, 시알화된 DV 수용체, 및/또는 시알화된 DV 수용체 상에서

글리칸과 접촉시키는 것을 수반하는 이런 시스템과 방법에 의해 특징된다.

[0253] 일부 구체예에서, DV-결합제 (가령, 교차 반응성 항체)는 계산적 접근법을 이용하여 조사되고, 특징화되고, 및/또는 확인될 수 있다. 일부 구체예에서, 계산적 접근법은 단백질-단백질 상호작용 및 친화성 증강 돌연변이를 예측하기 위해 단백질-단백질 (가령, 항체-항원) 상호작용에 공통적인 물리화학적 특질을 이용하는 것을 수반한다. 예로서, DV를 중화하는데 있어서 이러한 접근법을 이용하여 생산된 항체의 효능은 이후, 당분야에 공지된 다양한 검정 (가령, 플라크 감소 중화 검사, ELISA, 혈구응집 검정, 그리고 웨스턴 블롯)에 의해 예측될 수 있다.

[0254] 일부 구체예에서, DV-결합제 및/또는 후보 기질은 용해 상태에서 자유롭고, 지지체에 고정되고, 및/또는 세포의 표면에서 및/또는 표면 상에서 발현될 수 있다. 후보 기질 및/또는 작용제는 표지화되고, 따라서 결합의 검출을 허용할 수 있다. DV-결합제 또는 후보 기질 중에서 어느 한쪽은 표지화된 종이다. 이들 물질 중에서 하나가 표지화되고, 그리고 결합에 대한 효과를 결정하기 위해 결합된 라벨과 대비하여 유리 라벨의 양이 계량되는 경쟁적 결합 형식이 수행될 수 있다.

[0255] 일부 구체예에서, 결합 검정은 예로서, 후보 기질을 DV-결합제에 노출하고 후보 기질과 작용제 사이에 결합을 검출하는 것을 수반한다. 결합 검정은 시험관내에서 (가령, 실제적으로 단지 언급된 성분만을 포함하는 후보 튜브에서; 세포-없는 추출물에서; 및/또는 실제적으로 정제된 성분에서) 수행될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 결합 검정은 세포내에서 및/또는 생체내에서 (가령, 세포, 조직, 장기, 및/또는 생물체 내에; 하기에 더욱 상세하게 설명됨) 수행될 수 있다.

[0256] 일정한 구체예에서, 최소한 하나의 DV-결합제는 최소한 하나의 후보 기질과 접촉되고 효과가 검출된다. 일부 구체예에서, 예로서, DV-결합제는 후보 기질과 접촉되고, 그리고 이들 두 실체 사이에 결합이 모니터링된다. 일부 구체예에서, 검정은 후보 기질을 작용제의 특징적인 부분과 접촉시키는 것을 수반할 수 있다. 후보 기질에 DV 작용제의 결합이 검출된다. DV-결합제의 단편, 부분, 동족체, 변이체, 및/또는 유도체는 이들이 하나 또는 그 이상의 후보 기질에 결합하는 능력을 포함한다면, 이용될 수 있는 것으로 인지될 것이다.

[0257] 후보 기질에 DV 작용제의 결합은 당분야에서 널리 공지된 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 구체예에서, 결합 계량은 SPR 분석을 이용하여 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, SPR 분석은 DV-결합제의 친화성과 운동성 결합 파라미터를 계량하는데 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 고체상-결합된 DV 작용제를 수반하고 이들과 하나 또는 그 이상의 후보 기질의 상호작용을 검출하는 검정이 이용될 수 있다. 따라서, DV-결합제는 검출가능한 마커, 예를 들면, 방사성, 형광, 및/또는 발광 라벨을 포함할 수 있다. 게다가, 후보 기질은 간접적인 검출을 허용하는 (가령, 발색 기질을 이용하는 효소를 이용함에 의하여 및/또는 검출가능한 항체에 결합함에 의하여) 물질에 연계될 수 있다. 후보 기질과의 상호작용의 결과로서 DV-결합제의 입체형태에서 변화는 예로서, 검출가능한 마커의 방출에서 변화에 의해 검출될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 고체상-결합된 단백질 복합체는 질량 분광분석법에 의하여 분석될 수 있다.

[0258] 일부 구체예에서, DV-결합제는 비-고정될 수 있다. 일부 구체예에서, 비-고정된 성분은 표지화될 수 있다 (예로서, 방사능 표지, 에피토프 태그, 효소-항체 접합체 등으로). 대안으로 또는 부가적으로, 결합은 면역학적 검출 기술에 의해 결정될 수 있다. 예로서, 반응 혼합물은 웨스턴 블롯팅에 종속되고, 그리고 블롯은 비-고정된 성분을 검출하는 항체로 탐침된다. 대안으로 또는 부가적으로, ELISA는 결합을 검증하는데 활용될 수도 있다. 일부 구체예에서, 후보 기질에 대한 DV 작용제의 결합 친화성은 고처리량 간접적인 ELISA 검정을 이용함으로써 결정될 수 있다.

[0259] 일부 구체예에서, 병변 감소 중화 검사 (FRNT) 검정이 DV-결합제의 활성 또는 중화 효능을 계량하는데 활용될 수 있다. 일부 구체예에서, 항-DV 활성을 생체내에서 계량하기 위해 동물 숙주가 이용될 수 있다.

[0260] 일정한 구체예에서, 세포는 DV 작용제와 후보 기질 사이에 결합에 대해 직접적으로 검정될 수 있다. 면역조직화학 기술, 공초점 기술, 및/또는 결합을 사정하기 위한 다른 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 이런 목적으로 특이적으로 조작된 세포를 비롯하여, 다양한 세포주가 이런 스크리닝 검정에 활용될 수 있다. 스크리닝 검정에서 이용된 세포의 실례에는 포유류 세포, 진균 세포, 세균 세포, 또는 바이러스 세포가 포함된다. 세포는 자극된 세포, 예를 들면, 성장 인자로 자극된 세포일 수 있다. 당업자는 본원에서 개시된 발명이 후보 기질에 결합하는 DV-결합제의 능력을 계량하기 위한 넓고 다양한 세포내 검정을 예기한다는 것을 이해할 것이다.

[0261] 검정에 따라, 세포 및/또는 조직 배양이 필요할 수도 있다. 세포는 다수의 상이한 생리학적 검정 중에서 한 가지를 이용하여 조사될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, 단백질 발현을 모니터링하기 위한 웨스턴 블롯팅 및

/또는 단백질-단백질 상호작용에 대한 검사; 다른 화학적 변경을 모니터링하기 위한 질량 분광분석법 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 분자 분석이 수행될 수 있다.

[0262] 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 결합 검정은 다양한 농도의 DV-결합제 및/또는 후보 기질을 이용하여 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 결합 검정은 일정한 범위의 항체 농도 (가령, 약 100 μg/ml보다 큰, 약 100 μg/ml, 약 50 μg/ml, 약 40 μg/ml, 약 30 μg/ml, 약 20 μg/ml, 약 10 μg/ml, 약 5 μg/ml, 약 4 μg/ml, 약 3 μg/ml, 약 2 μg/ml, 약 1.75 μg/ml, 약 1.5 μg/ml, 약 1.25 μg/ml, 약 1.0 μg/ml, 약 0.9 μg/ml, 약 0.8 μg/ml, 약 0.7 μg/ml, 약 0.6 μg/ml, 약 0.5 μg/ml, 약 0.4 μg/ml, 약 0.3 μg/ml, 약 0.2 μg/ml, 약 0.1 μg/ml, 약 0.05 μg/ml, 약 0.01 μg/ml, 및/또는 약 0.01 μg/ml보다 작은)에서 DV 작용제에 결합하는 후보 기질의 능력을 사정하는데 이용된다.

[0263] 일부 구체예에서, 본원에서 설명된 결합 연구 중에서 한 가지는 고처리량 방식으로 이행될 수 있다. 고처리량 검정을 이용하면, 단일 일자에서 수천여 개의 작용제를 스크리닝하는 것이 가능하다. 일부 구체예에서, 마이크로역가 평판의 각 웰이 선별된 후보 기질에 대하여 별개의 검정을 실행하는데 이용될 수 있고, 또는 농도 및/또는 배양 시간 효과가 관찰되면, 매 5 - 10개 웰이 단일 후보 기질을 검사할 수 있다. 따라서, 단일 표준 마이크로역가 평판은 작용제와 후보 기질 사이에 최대 96개 결합 상호작용을 검정할 수 있고; 1536개 웰 평판이 이용되면, 단일 평판은 작용제와 후보 기질 사이에 최대 1536개 결합 상호작용을 검정할 수 있고; 기타 등등이다. 하루에 많은 평판을 검정하는 것이 가능하다. 예로서, 최대 약 6,000개, 약 20,000개, 약 50,000개, 또는 약 100,000개보다 많은 검정 스크린이 본 발명에 따른 고처리량 시스템을 이용하여 항체와 후보 기질 사이에 결합 상호작용에서 수행될 수 있다.

[0264] 일부 구체예에서, 이런 방법은 동물 숙주를 활용한다. 본원에서 이용된 바와 같이, "동물 숙주"는 인플루엔자 연구에 적합한 임의의 동물 모델을 포함한다. 예로서, 본 발명에 적합한 동물 숙주는 영장류, 흰담비, 고양이, 개, 소, 말, 설치류, 예를 들면, 생쥐, 햄스터, 토끼, 그리고 쥐를 비롯한 임의의 포유류 숙주일 수 있다. 일정한 구체예에서, 본 발명에 이용된 동물 숙주는 흰담비이다. 특히, 일부 구체예에서, 동물 숙주는 작용제 (임의선택적으로, 발명 조성물)의 투여에 앞서 바이러스 노출 또는 감염의 경험이 없다. 일부 구체예에서, 동물 숙주는 작용제의 투여에 앞서 또는 투여와 동시에, 바이러스로 접종되거나, 바이러스로 감염되거나, 또는 만약 그렇지 않으면 바이러스에 노출된다. 본 발명의 실시에서 이용된 동물 숙주는 당분야에 공지된 임의의 방법에 의해 바이러스로 접종되거나, 바이러스로 감염되거나, 또는 만약 그렇지 않으면 바이러스에 노출될 수 있다. 일부 구체예에서, 동물 숙주는 비내에 바이러스로 접종되거나, 바이러스로 감염되거나, 또는 바이러스에 노출될 수 있다.

[0265] 경험 없는 및/또는 접종된 동물이 다양한 연구 중에서 한 가지를 위해 이용될 수 있다. 예로서, 이런 동물 모델은 당분야에 공지된 바와 같은 바이러스 전파 연구를 위해 이용될 수 있다. 바이러스 전파 연구에서 흰담비의 이용은 인간에서 바이러스 전파에 대한 신뢰할 만한 예측자로서 역할할 수 있는 것으로 예기된다. 바이러스 전파 연구는 작용제를 검사하는데 이용될 수 있다. 예로서, DV-결합제는 동물 숙주에서 바이러스 결합 및/또는 감염성을 차단하는데 있어서 상기 작용제의 효능을 결정하기 위해 바이러스 전파 연구 이전에, 동안 또는 이후에 적합한 동물 숙주에 투여될 수 있다. 동물 숙주에서 바이러스 전파 연구로부터 모아진 정보를 이용하여, 인간 숙주에서 바이러스 결합 및/또는 감염성을 차단하는데 있어서 작용제의 효능을 예측할 수 있다.

[0266] *제약학적 조성물*

[0267] 본 발명은 하나 또는 그 이상의 제공된 항체 작용제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명은 최소한 하나의 항체 및 최소한 하나의 제약학적으로 허용되는 부형제를 제공한다. 이런 제약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 추가 치료적 활성 물질을 임의선택적으로 포함하고 및/또는 이들과 합동으로 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 제약학적 조성물은 약제에서 유용하다. 일부 구체예에서, 제공된 제약학적 조성물은 DV 감염의 치료 또는 예방 또는 DV 감염과 연관되거나 상관된 부정적인 영향에서 예방적 작용제 (즉, 백신)로서 유용하다. 일부 구체예에서, 제공된 제약학적 조성물은 치료적 적용, 예를 들면, DV 감염으로 고통받는 또는 DV 감염에 감수성인 개체에서 유용하다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 인간에 투여용으로 조제된다.

[0268] 예로서, 본원에서 제공된 제약학적 조성물은 무균 주사가능 형태 (가령, 피하 주사 또는 정맥내 주입에 적합한 형태)로 제공될 수 있다. 예로서, 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 주사에 적합한 액체 약형으로 제공된다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 임의선택적으로 진공 하에, 분말 (가령, 냉동건조된 및/또는 살균된)로서

제공되고, 이들은 주사에 앞서 수성 희석제 (가령, 물, 완충액, 염 용액 등)로 재구성된다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 물, 염화나트륨 용액, 아세트산나트륨 용액, 벤질 알코올 용액, 인산염 완충된 식염수 등에서 희석되고 및/또는 재구성된다. 일부 구체예에서, 분말은 수성 희석제와 부드럽게 혼합되어야 한다 (가령, 진탕되지 않음).

[0269] 일부 구체예에서, 제공된 제약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 제약학적으로 허용되는 부형제 (가령, 보존제, 비활성 희석제, 분산제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 완충제 등)을 포함한다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 보존제를 포함한다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 보존제를 포함하지 않는다.

[0270] 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 냉장되고 및/또는 동결될 수 있는 형태로 제공된다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 냉장되고 및/또는 동결될 수 없는 형태로 제공된다. 일부 구체예에서, 재구성된 용액 및/또는 액체 약형은 재구성 후 일정한 (가령, 2 시간, 12 시간, 24 시간, 2 일, 5 일, 7 일, 10 일, 2 주, 1 개월, 2 개월, 또는 더욱 긴) 기간 동안 보관될 수 있다.

[0271] 액체 약형 및/또는 재구성된 용액은 투여에 앞서 미립자 물질 및/또는 탈색을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 용액은 탈색 또는 혼탁되면 및/또는 여과 후 미립자 물질이 남아있으면, 이용되지 않아야 한다.

[0272] 본원에서 설명된 제약학적 조성물의 제제는 약리학의 분야에서 공지된 또는 이후 개발된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 구체예에서, 이런 준비 방법은 활성 성분을 하나 또는 그 이상의 부형제 및/또는 하나 또는 그 이상의 다른 보조 성분과 결합시키고, 그리고 이후, 필요하면 및/또는 바람직하면, 산물을 성형하고 및/또는 산물을 원하는 단일- 또는 다중-복용 단위로 포장하는 단계를 포함한다.

[0273] 본 발명에 따른 제약학적 조성물은 대량으로, 단일 단위 분량으로서, 및/또는 복수의 단일 단위 분량으로서 제조되고, 포장되고, 및/또는 판매될 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, "단위 분량"은 미리 결정된 양의 활성 성분을 포함하는 제약학적 조성물의 구별된 양이다. 활성 성분의 양은 개체에 투여되는 분량 및/또는 이런 분량의 편의한 분획물, 예를 들면, 예로서, 이런 분량의 1/2 또는 1/3에 일반적으로 동등하다.

[0274] 본 발명에 따른 제약학적 조성물에서 활성 성분, 제약학적으로 허용되는 부형제, 및/또는 임의의 추가 성분의 상대적 양은 치료된 개체의 정체, 크기, 및/또는 상태에 따라 및/또는 조성물이 투여되는 루트에 따라 변할 수 있다. 실례로서, 조성물은 0.1% 내지 100% (w/w) 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0275] 본 발명의 제약학적 조성물은 제약학적으로 허용되는 부형제를 추가적으로 포함하고, 이것은 본원에서 이용된 바와 같이, 원하는 특정 약형에 적합한 용매, 분산 매체, 희석제, 또는 다른 액체 운반제, 분산 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장성 작용제, 농화 또는 유화 작용제, 보존제, 고체 결합제, 윤활제 등이거나 또는 이들을 포함한다. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)는 제약학적 조성물을 조제하는데 이용되는 다양한 부형제 및 이들의 제조를 위한 공지된 기술을 개시한다. 예로서, 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 유발하거나 또는 만약 그렇지 않으면, 제약학적 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용함으로써 임의의 전통적인 부형제 매체가 물질 또는 이의 유도체와 양립할 수 없는 경우가 아닌 한에 있어서, 이의 이용은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 예기된다.

[0276] *백신*

[0277] 일부 구체예에서, 본 발명은 DV 감염으로 고통받는 또는 DV 감염에 감수성인 개체의 수동 면역화 (즉, 항체가 개체에 투여되는 면역화)에서 이용, 및/또는 검사를 위한 백신 조성물을 제공한다. 일부 구체예에서, 수동 면역화는 항체가 임신 동안 모체로부터 태아로 이전될 때 일어난다. 일부 구체예에서, 수동 면역화는 개체에 직접적으로 항체 작용제의 투여를 포함한다 (가령, 주사, 경구, 코 등에 의해).

[0278] 일부 구체예에서, 예방적 적용은 백신을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 예방접종은 개별 환자에 맞춤된다. 예로서, 하기에 설명된 바와 같이, 혈청은 환자로부터 수집되고 DV의 존재에 대해, 그리고 일부 구체예에서 하나 또는 그 이상의 특정 DV 혈청형에 대해 조사된다. 일부 구체예에서, 제공된 백신의 적절한 수용자는 제공된 항체에 의해 결합된 및/또는 중화된 하나 또는 그 이상의 DV 혈청형으로 감염으로 고통받는 또는 이런 감염에 감수성인 개체이다.

[0279] 일부 구체예에서, 백신은 경구, 비내, 피하, 근육내, 피내, 또는 임의의 다른 의학적으로-적절한 투여 루트를

거쳐 투여된다. 각 투여 루트는 상이한 제제 또는 전달 기전을 필요로 할 수 있는 것으로 인지될 것이고, 그리고 이런 변수 파라미터는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 예기된다. 일부 구체예에서, 투여 루트 및/또는 제제는 부분적으로 개체의 연령 및/또는 상태에 의해 지배될 수 있다. 예로서, 아기에 백신의 투여는 큰 근육 질량으로 인해, 대퇴의 전외측면에 주사를 통해 수행될 수 있다. 개체가 아동 또는 성인이 일부 구체예에서, 삼각근에 백신의 투여가 바람직할 수 있다. 특정 개체에 투여를 위한 적절한 루트 및/또는 제제를 결정하기 위해 건전한 의학적 판단이 이용되어야 하는 것으로 이해된다.

[0280] 일부 구체예에서, 백신 조성물은 최소한 하나의 어쥬번트를 포함한다. 임의의 어쥬번트가 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 다수의 어쥬번트는 공지되어 있다; 많은 이런 화합물의 유용한 개요서는 국립보건원에 의해 준비되고 www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf; 또한 Allison (1998, Dev. Biol. Stand., 92:3-11; 본원에서 참조로서 편입됨), Unkeless et al. (1998, Annu. Rev. Immunol., 6:251-281; 본원에서 참조로서 편입됨), 그리고 Phillips et al. (1992, Vaccine, 10:151-158; 본원에서 참조로서 편입됨)에서 발견될 수 있다. 수백 개의 상이한 어쥬번트가 당분야에 공지되어 있고 본 발명의 실시에서 이용될 수 있다. 본 발명에 따라 활용될 수 있는 예시적인 어쥬번트에는 사이토킨, 겔-유형 어쥬번트 (가령, 알루미늄 수산화물, 알루미늄 인산염, 인산칼슘 등); 미생물 어쥬번트 (가령, CpG 모티프를 포함하는 면역조절성 DNA 서열; 내독소, 예를 들면, 모노포스포릴 지질 A; 외독소, 예를 들면, 콜레라 독소, 대장균 (*E. coli*) 열 불안정 독소, 그리고 백일해 독소; 무라밀 디펩티드 등); 기름-유제와 유화제-기초된 어쥬번트 (가령, 프로인드 어쥬번트, MF59 [Novartis], SAF 등); 미립자 어쥬번트 (가령, 리포솜, 생물분해성 마이크로스피어, 사포닌 등); 합성 어쥬번트 (가령, 비이온성 블록 공중합체, 무라밀 펩티드 유사물질, 폴리포스파젠, 합성 폴리뉴클레오티드 등); 및/또는 이들의 조합이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 다른 예시적인 어쥬번트에는 일부 중합체 (가령, 폴리포스파젠; 본원에서 참조로서 편입된 U.S. 특허 5,500,161에서 설명됨), Q57, QS21, 스쿠알렌, 테트라클로르데카옥시드 등이 포함된다. 제약학적으로 허용되는 부형제는 "제약학적 조성물"이라는 제목의 상기 섹션에서 더욱 상세하게 설명되었다.

[0281] *복합 요법*

[0282] 본 발명에 따른 DV 항체 작용제 및/또는 이들의 제약학적 조성물은 복합 요법으로 이용될 수 있는 것으로 인지될 것이다. "와 합동으로"는 이들 작용제가 동시에 투여되고 및/또는 전달을 위해 함께 조제되어야 한다는 것을 암시하는 것으로 의도되지 않고, 하지만 이들 전달 방법은 본 발명의 범위 내에 있다. 조성물은 하나 또는 그 이상의 다른 원하는 치료제 또는 의학적 절차와 동시에, 이들에 앞서, 또는 이들 이후에 투여될 수 있다. 합동으로 활용된 치료 활성제는 단일 조성물에서 함께 투여되거나 또는 상이한 조성물에서 개별적으로 투여될 수 있는 것으로 인지될 것이다. 일반적으로, 각 작용제는 상기 작용제에 대해 결정된 분량에서 및/또는 시간 일정에서 투여될 것이다.

[0283] 조합 섭생에서 이용하기 위한 요법 (가령, 치료제 또는 절차)의 특정 조합은 원하는 치료제 및/또는 절차의 적합성 및 달성되는 원하는 치료 효과를 고려할 것이다. 본 발명의 제약학적 조성물은 복합 요법 (가령, 복합 백신 요법)으로 이용될 수 있는 것으로 또한, 인지될 것이다, 다시 말하면, 이들 제약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 다른 원하는 치료제 또는 예방접종 절차와 동시에, 이들에 앞서, 또는 이들 이후에 투여될 수 있다.

[0284] 본 발명에 따른 항체 작용제의 치료 효과량은 제공된 제약학적 조성물 및 최소한 하나의 다른 활성 성분과 합동으로 이용을 위해 합동된다. 일부 구체예에서, 활성 성분은 항바이러스제, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 인터페론 (가령, 인터페론 α-2b, 인터페론-γ 등), 항-DV 단일클론 항체, 항-DV 다중클론 항체, RNA 중합효소 저해제, 단백질분해효소 저해제, 헬리카아제 저해제, 면역조절제, 안티센스 화합물, 짧은 간섭 RNA, 짧은 헤어핀 RNA, 마이크로 RNA, RNA 앱타머, 리보자임, 그리고 이들의 조합이다. 조합 섭생에서 이용하기 위한 요법의 특정 조합은 일반적으로, 원하는 치료제 및/또는 절차의 적합성 및 달성되는 원하는 치료 효과를 고려할 것이다. 이용된 이들 요법 및/또는 백신은 동일한 장애에 대해 원하는 효과를 달성하거나 (예로서, 발명 화합물은 다른 DV 백신과 동시에 투여될 수 있다), 또는 이들은 상이한 효과를 달성할 수 있는 것으로 또한, 인지될 것이다.

[0285] 이용된 요법은 동일한 목적을 위한 원하는 효과를 달성할 수 있고 (예로서, DV 감염을 치료하고, 예방하고, 및/또는 이의 시작을 지연하는데 유용한 DV 항체가 DV 감염을 치료하고, 예방하고, 및/또는 이의 시작을 지연하는데 유용한 다른 작용제와 동시에 투여될 수 있다), 또는 이들은 상이한 효과 (가령, 임의의 역효과의 제어)를 달성할 수 있는 것으로 인지될 것이다. 본 발명은 제약학적 조성물의 생체이용률을 향상시키고, 이들의 신진대사를 감소시키고 및/또는 변경하고, 이들의 배출을 저해하고, 및/또는 신체 내에서 이들의 분포를 변경할 수 있

는 작용제와 합동으로 제약학적 조성물의 전달을 포괄한다.

[0286] 일부 구체예에서, 합동으로 활용되는 작용제는 그들이 개별적으로 활용되는 수준을 초과하지 않는 수준에서 활용되어야 한다. 일부 구체예에서, 합동으로 활용된 수준은 개별적으로 활용된 수준보다 더욱 낮을 것이다.

[0287] 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 DV 항체는 인터페론, RNA 중합효소 저해제, 또는 인터페론과 RNA 중합효소 저해제 둘 모두와 함께 투여될 수 있다.

[0288] 일부 구체예에서, 복합 요법은 단일 에피토프 (가령, 단일 입체형태적 에피토프)에 지향된 복수의 항체 작용제의 투여를 수반할 수 있다. 일부 구체예에서, 복합 요법은 예로서, 감염성 과정에서 복수의 기전을 동시에 간섭하기 위해, 상이한 에피토프 (가령, 동일한 바이러스 외피 단백질 상에서 또는 상이한 바이러스 외피 단백질 상에서, 여기서 에피토프는 입체형태적이거나 또는 아닐 수 있다)를 인식하는 복수의 항체 작용제를 포함할 수 있다.

[0289] 일정한 구체예에서, 본 발명에 따른 조성물은 A-가닥 영역에 대한 정확하게 하나의 항체 작용제를 포함한다. 일정한 구체예에서, 조성물은 정확하게 2개의 DV A-가닥 영역 항체 작용제를 포함하고 및/또는 복합 요법은 이들을 활용한다.

[0290] 본 발명에 따른 항체 작용제의 임의의 순열 또는 조합은 복수의 상이한 항체 작용제를 포함하는 조성물 및/또는 복합 요법 섭생을 조제하기 위해 임의의 다른 항체 작용제와 합동될 수 있는 것으로 당업자에 의해 인지될 것이다.

[0291] *투여 방법*

[0292] 본 발명에 따른 DV 항체 작용제 및 본 발명에 따른 이들의 제약학적 조성물은 임의의 적절한 루트와 섭생에 따라 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 루트 또는 섭생은 양성 치료적 이익과 상관된 것이다. 일부 구체예에서, 루트 또는 섭생은 FDA 및/또는 EP에 의해 승인된 것이다.

[0293] 일부 구체예에서, 투여된 정확한 양은 개체별로, 의학 분야에서 널리 공지된 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 인자에 따라 변할 수 있다. 이런 인자에는 예로서, 개체의 종, 연령, 전반적인 상태, 감염의 심각도, 특정 조성물, 이의 투여 방식, 이의 활성 방식, 치료되는 장애와 장애의 심각도; 이용된 특정한 DV 항체 작용제의 활성; 투여된 특정한 제약학적 조성물; 투여 후 조성물의 반감기; 개체의 연령, 체중, 전반적인 건강, 성별, 그리고 식이; 이용된 특정한 화합물의 투여 시간, 투여 루트, 그리고 배출 속도; 치료의 지속 시간; 이용된 특정한 화합물과 합동으로 이용된 또는 합치하는 약물 등 중에서 하나 또는 그 이상이 포함될 수 있다. 제약학적 조성물은 투여의 용이함 및 용량의 균일성을 위해 복용 단위 형태로 조제될 수 있다. 하지만, 본 발명의 조성물의 전체 매일 용법은 건전한 의학적 판단의 범위 내에 주치의에 의해 결정되는 것으로 이해될 것이다.

[0294] 본 발명의 제약학적 조성물은 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 임의의 루트에 의해 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 제약학적 조성물은 경구 (PO), 정맥내 (IV), 근육내 (IM), 동맥내, 척수내, 척수강내, 피하 (SQ), 심실내, 경피, 피부, 피내, 직장 (PR), 질, 복강내 (IP), 위내 (IG), 국소 (가령, 분말, 연고, 크림, 겔, 로션, 및/또는 점적약에 의해), 점막, 비내, 협측, 경장, 유리체, 설하; 기관내 점적주입, 기관지 점적주입, 및/또는 흡입에 의해; 경구 스프레이, 코 스프레이, 및/또는 에어로졸로서, 및/또는 문맥 카테터를 통해 투여된다.

[0295] 특정한 구체예에서, 본 발명에 따른 DV 항체 작용제 및/또는 이들의 제약학적 조성물은 정맥내, 예를 들면, 정맥내 주입에 의해 투여될 수 있다. 특정한 구체예에서, 본 발명에 따른 DV 항체 작용제 및/또는 이들의 제약학적 조성물은 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 특정한 구체예에서, 본 발명에 따른 DV 항체 작용제 및/또는 이들의 제약학적 조성물은 피하 주사에 의해 투여될 수 있다. 특정한 구체예에서, 본 발명에 따른 DV 항체 작용제 및/또는 이들의 제약학적 조성물은 문맥 카테터를 통해 투여될 수 있다. 하지만, 본 발명은 약물 전달의 과학에서 있음직한 진전을 고려하여, 임의의 적절한 루트에 의한 본 발명에 따른 DV 항체 작용제 및/또는 이들의 제약학적 조성물의 전달을 포괄한다.

[0296] 일정한 구체예에서, 본 발명에 따른 DV 항체 작용제 및/또는 본 발명에 따른 이들의 제약학적 조성물은 원하는 치료 효과를 획득하기 위해 하루에 개체 체중의 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 25 mg/kg을 전달하는데 충분한 용량 수준에서 투여될

수 있다. 원하는 용량은 하루 3회보다 많이, 하루 3회, 하루 2회, 하루 1회, 격일, 3일마다, 매주, 2주마다, 3주마다, 4주마다, 2개월마다, 6개월마다, 또는 12개월마다 전달될 수 있다. 일정한 구체예에서, 원하는 용량은 복수의 투여 (가령, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 11회, 12회, 13회, 14회, 또는 그 이상 투여)를 이용하여 전달될 수 있다.

[0297] *예방적 적용*

[0298] 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 DV 항체 작용제는 예방적 적용을 위해 활용될 수 있다. 일부 구체예에서, 예방적 적용은 DV 감염에 감수성인 및/또는 DV 감염의 증상을 전시하는 개체에서 DV 감염, 및/또는 임의의 다른 DV-연관된 질환을 예방하고, 이의 진행을 저해하고, 및/또는 이의 시작을 지연하기 위한 시스템과 방법을 수반한다. 일부 구체예에서, 예방적 적용은 뇌의 감염을 예방하고, 이의 진행을 저해하고, 및/또는 이의 시작을 지연하기 위한 시스템과 방법을 수반한다. 일부 구체예에서, 예방적 적용은 중요 장기 (가령, 간)의 장애를 예방하고, 이의 진행을 저해하고, 및/또는 이의 진행을 지연하기 위한 시스템과 방법을 수반한다.

[0299] *진단적 적용*

[0300] 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 DV 항체 작용제는 진단적 적용을 위해 이용된다. 예로서, DV 항체 작용제의 다양한 결합 프로필에 의해서, 복수의 DV 혈청형을 검출하여 범-DV 항체 작용제를 제공하고, 이와 동시에 감법 분석에 의해 개별 혈청형을 분석할 수 있는 진단적 검정이 이용될 수 있다.

[0301] 진단적 목적을 위해, 항체 작용제는 외피 당단백질의 A-가닥 영역을 검출하고, DV 혈청형을 분간하고, 비리온과 항체를 검출하기 위한 넓고 다양한 형식에서 이용될 수 있다 (가령, 본원에서 참조로서 편입된 U.S. 특허 번호 5,695,390을 참조한다). 항체 작용제는 개별적으로 또는 개체 군의 다른 항체 또는 다른 항체와 합동으로 또는 DV 외피 단백질 상에 존재하는 글리코실 기에 결합하는 렉틴과 합동으로 이용될 수 있다. 진단적 목적을 위해, 넓고 다양한 라벨이 이용될 수 있는데, 이들은 대부분의 경우에 앞서 언급되었다. 이들에는 형광단, 화학발광 모이어티, 방사성동위원소, 효소, 높은 친화성 수용체가 있는 입자 (가령, 콜로이드성 탄소 입자, 금 입자, 라텍스 입자 등) 리간드, 그리고 활성화되면 검출가능한 신호를 제공할 수 있는 프로라벨이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0302] 일부 구체예에서, 표면은 유리 단백질 (가령, 순환하는 단백질)로서 또는 무손상 또는 부분적으로 무손상 비리온의 부분으로서 DV 항원에 결합할 수 있는 단백질로 코팅된다. 복수의 DV 혈청형 또는 렉틴 (가령, 갈란투스 니발리스 렉틴; "GNA")에 결합하는 본 발명의 항체가 이용될 수 있다.

[0303] 일부 구체예에서, 검정은 표면을 유리 또는 DV-연관된 단백질(들)을 내포할 수 있는 배지와 접촉시키는 것을 수반할 수 있고, 여기서 상기 배지는 하나 또는 그 이상의 혈청형의 공지된 A-가닥 영역의 시료 또는 용액일 수 있다. 비특이적으로 결합된 단백질을 제거하기 위한 배양과 세척 후, 검정은 검정되는 것에 따라 다양한 방식으로 진행할 수 있다. 혈청반응양성인 것으로 의심되는 혈액 시료가 검정되는 경우에, 시료는 A-가닥 영역 단백질의 층에 적용되고, 배양되고, 세척될 수 있고, 그리고 단백질 층에 결합된 인간 항체의 존재가 결정될 수 있다.

[0304] 표지화된 α-인간 항체 (주제 항체의 아이소타입에 대한 것이 아님, 여기서 주제 항체는 초기에 이용되었다)가 이용될 수 있다. 혈청반응양성 개체에서 항체에 대한 검정에서, 주제 항체는 이런 개체의 혈청에서 임의의 인간 항-DV 항체를 검출하는데 이용된 동일한 시약으로 대조로서 이용될 수 있다. 시료 내에 항체의 특이성은 주제 항체를 이용함으로써 확증될 수 있는데, 이들은 항-인간 항체와 차별적으로 표지화되고, 그리고 이들이 시료 내에 항체에 의해 차단되는 지를 결정한다.

[0305] 시료가 DV A-가닥 영역 단백질에 대해 검정되는 경우에, 검출은 표지화된 주제 항체를 이용하는데, 선별은 A-가닥 영역 단백질의 유전형분석 또는 검출에 관심이 있는 지에 의존한다. 비특이적으로 결합된 항체를 씻어낸 후, 표지화된 항체의 존재는 공지된 기술에 따라 라벨의 존재를 검출함으로써 결정된다. 대안으로 또는 부가적으로, 주제 항체가 표면에 결합되는 경우에, A-가닥 영역에 대한 표지화된 렉틴이 A-가닥 영역 단백질의 존재를 검출하는데 이용될 수 있다.

[0306] 본 발명에 따른 항체 작용제는 혈청에서 항체, 단일클론 항체, 유전공학의 결과로서 발현된 항체 등을 비롯한 다른 항체의 반응성을 계량하는데 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 무손상 비리온이 이용된다. 일부 구체예에서, 입체형태적으로 보존된 외피 단백질이 이용된다. 비리온 포획에 대하여, 예로서, Kimura et al., 1998, J.

Med. Virology, 56:25-32; Morita et al., 1996, Hapato-Gastroenterology, 43:582-585; Sata et al., 1993, Virology, 196:354-357; 그리고 Hijikata et al., 1993, J. Virol., 67:1953-1958을 참조한다; 이들 모두 본원에 참조로서 편입된다. 한 가지 프로토콜은 고형 지지체를 렉틴 (가령, GNA)으로 코팅하고, 그리고 이후, 표면을 무손상 DV 비리온을 포함하는 배지 (가령, 혈청반응양성 환자의 혈청)와 접촉시키는 단계를 수반한다. 비리온을 파괴할지도 모르는 첨가제 (가령, 세정제)는 통상적으로 회피되어야 한다. 배지를 배양하고 배지의 비특이적으로 결합된 성분을 제거하기 위해 세척한 후, 비리온은 본 발명에 따른 항체 및 시료의 항체와 접촉될 수 있다. 이것은 동시에 또는 연속적으로 수행될 수 있는데, 여기서 시료가 먼저 첨가된다. 다른 항체에 의한 치환에 감수성인 양의 주제 항체가 이용된다. 이런 양은 실험적으로 결정될 수 있고, 그리고 일련의 검사에서 상이한 양의 주제 항체를 이용하는 것이 요망될 수 있다. 시료의 부재와 존재에서 획득된 신호를 이해함으로써, 시료 내에 항체의 반응성 또는 결합 친화성이 결정될 수 있다. 비리온에 결합된 주제 항체의 양을 결정하기 위해 다양한 기술이 이용될 수 있다. 주제 항체가 예로서, 비오틴 또는 다이곡시제닌으로 표지화되는 경우에, 기질이 검출가능한 신호를 생산하는 형광단 또는 효소로 표지화된 스트렙타비딘 또는 항-다이곡시제닌이 주제 항체의 양을 결정하는데 이바지할 수 있다.

[0307] 표지화된 주제 항체 작용제는 생검 재료로부터 DV의 존재를 검정하는데 이용될 수 있다. 표지화된 항체는 고정된 생검 재료, 예를 들면, 간 슬라이스와 함께, 표지화된 주제 항체 중에서 하나 또는 그 이상의 용액과 함께 배양될 수 있다. 비특이적으로 결합된 항체를 씻어낸 후, 생검된 조직의 세포에 결합된 항체의 존재는 라벨의 성격에 따라 검출될 수 있다.

[0308] 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 DV 항체 작용제는 DV 수용체를 확인하는데 이용될 수 있다. 당업자는 이것이 달성될 수 있는 다수의 방식을 인지할 것이다 (Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; 그리고 Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, 1987; 이들 둘 모두 본원에서 참조로서 편입된다). 전형적으로, 단백질과 펩티드 수용체는 DV 외피 당단백질의 A-가닥 영역에 대한 항체가 DV 감염에 감수성인 세포에 DV 비리온의 부착을 저해할 수 있는 지를 결정함으로써 확인될 수 있다. 따라서, DV A-가닥 영역 단백질과 펩티드에 대한 수용체는 이러한 방식으로 확인될 수 있다. 감수성 세포는 DV와 항-DV A-가닥 영역 항체의 존재에서 배양될 수 있고, 그리고 세포-결합 검정은 부착이 항체의 존재에서 감소되는 지를 결정하는데 활용될 수 있다.

[0309] DV에 대한 추정 수용체 및/또는 DV에 대한 추정 수용체의 라이브러리를 발현하는 세포는 DV에 결합하는 그들의 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. 예로서, 추정 DV 수용체 (가령, DV A-가닥 영역에 대한 수용체)를 발현하는 세포는 세포의 표면 상에서 추정 수용체에 DV 단백질 또는 펩티드의 결합을 허용하는데 충분한 시간 동안 및 조건 하에 항체의 존재에서 DV 단백질 또는 펩티드와 접촉될 수 있다. 대안으로 또는 부가적으로, DV 단백질, 펩티드, 또는 비리온은 세포 표면 상에서 추정 수용체와 접촉하기에 앞서 항체와 함께 전배양될 수 있다. 결합은 당분야에 공지된 임의의 수단, 예를 들면, 유세포분석법 등에 의해 검출될 수 있다 (참조: Ausubel et al. 또는 Sambrook et al., 상기). 세포의 부재에서 항체의 부재에서 결합과 비교하여 항체의 존재에서 세포의 표면에 결합에서 감소는 DV 수용체의 확인을 지시한다.

[0310] 일부 구체예에서, DV 수용체를 확인하는 방법은 고형 지지체, 예를 들면, 비드, 칼럼 등의 이용을 포함한다. 예로서, DV 단백질과 펩티드 (가령, A-가닥 영역 단백질 및/또는 이의 단편) 및/또는 DV 비리온에 대한 수용체는 DV 항체를 고형 지지체에 부착하고, 그리고 이후, DV 단백질 또는 펩티드가 항체에 결합하는 충분한 시간 동안 항체를 DV 단백질 또는 펩티드와 접촉시킴으로써 확인될 수 있다. 이것은 DV 단백질 또는 펩티드에 수용체의 결합을 허용하는데 충분한 시간 동안 및 조건 하에 고형 지지체 상에서 항체:리간드 복합체와 접촉될 수 있는 추정 DV 수용체에 대한 DV 단백질 리간드를 제공한다. 단백질은 라이브러리로부터 발현되거나 또는 자연 또는 재조합 세포로부터 세포 추출물 또는 정제된 단백질 제조물로서 제공될 수 있다. 일단 DV 단백질 펩티드 사이에 특이적 결합 복합체가 형성되면, 결합되지 않은 DV 단백질 또는 펩티드, 예를 들면, DV 단백질 또는 펩티드에 특이적으로 결합하지 않은 라이브러리 단백질 또는 펩티드는 예로서, 표준 세척 단계에 의해 제거된다. 결합된 단백질은 이후, 예로서 겔 전기영동에 의해 용리되고 확인된다.

[0311] *키트*

[0312] 본 발명은 본 발명에 따른 방법을 편의하게 및/또는 효과적으로 수행하기 위한 다양한 키트를 제공한다. 키트는 본 발명에 따른 하나 또는 그 이상의 DV 항체 작용제를 전형적으로 포함한다. 일부 구체예에서, 키트는 상이한 목적 (가령, 진단학, 치료, 및/또는 예방)을 위해 이용되는 상이한 DV 항체 작용제의 수집을 포함한다. 전형적

으로, 키트는 사용자가 개체(들)에 복수의 투여를 수행하고 및/또는 복수의 실험을 수행하도록 허용하는 충분한 양의 DV 항체 작용제를 포함할 것이다. 일부 구체예에서, 키트는 구매자에 의해 특정된 하나 또는 그 이상의 DV 항체 작용제가 공급되거나 또는 이를 포함한다.

[0313] 일정한 구체예에서, 본 발명에 따른 용도를 위한 키트는 하나 또는 그 이상의 참고 시료; 사용설명서 (가령, 시료를 처리하기 위한, 검사를 수행하기 위한, 결과를 해석하기 위한, DV 항체 작용제를 용해시키기 위한, DV 항체 작용제의 보관을 위한, 기타 등등); 완충액; 및/또는 검사를 수행하는데 필요한 다른 시약을 포함할 수 있다. 일정한 구체예에서, 키트는 항체의 패널을 포함할 수 있다. 키트의 다른 성분은 세포, 세포 배양 배지, 조직, 및/또는 조직 배양 배지를 포함할 수 있다 .

[0314] 키트는 사용설명서를 포함할 수 있다. 예로서, 사용설명서는 사용자에게 DV 항체 작용제를 포함하는 제약학적 조성물을 제조하는 적절한 절차 및/또는 제약학적 조성물을 개체에 투여하기 위한 적절한 절차를 통지할 수 있다.

[0315] 일부 구체예에서, 키트는 DV 항체 작용제를 포함하는 제약학적 조성물의 다수의 단위 용량을 포함한다. 기억 보조는 예로서, 숫자, 문자, 및/또는 다른 표지의 형태로 및/또는 용량이 투여될 수 있는 치료 일정에서 일/시간을 지정하는 일정표 삽입물로 제공될 수 있다. 위약 용량, 및/또는 칼슘 식이 보조제는 제약학적 조성물의 용량과 유사한 또는 상이한 형태에서, 용량이 매일 채취되는 키트를 제공하기 위해 포함될 수 있다.

[0316] 키트는 일정한 개별 성분 또는 시약이 개별적으로 수용될 수 있도록 하나 또는 그 이상의 맥관 또는 용기를 포함할 수 있다. 키트는 상업적인 판매를 위해 상대적으로 근접한 밀폐에서 개별 용기를 동봉하기 위한 수단, 예를 들면, 사용설명서, 포장 물질, 예를 들면, 스티로폼 등이 동봉될 수 있는 플라스틱 상자를 포함할 수 있다.

[0317] 일부 구체예에서, 키트는 DV로 고통받는 및/또는 DV에 감수성인 개체의 치료, 진단, 및/또는 예방에서 이용된다. 일부 구체예에서, 이런 키트는 (i) 최소한 하나의 DV 항체 작용제; (ii) 개체에 최소한 하나의 DV 항체 작용제의 투여를 위한 주사기, 바늘, 살포기 등; 그리고 (iii) 사용설명서를 포함한다.

[0318] 일부 구체예에서, 키트는 DV로 고통받는 및/또는 DV에 감수성인 개체의 치료, 진단, 및/또는 예방에서 이용된다. 일부 구체예에서, 이런 키트는 (i) 냉동건조된 분말로서 제공된 최소한 하나의 DV 항체 작용제; 그리고 (ii) 냉동건조된 분말을 재구성하기 위한 희석제를 포함한다. 이런 키트는 개체에 최소한 하나의 DV 항체 작용제의 투여를 위한 주사기, 바늘, 살포기 등; 및/또는 사용설명서를 임의선택적으로 포함할 수 있다.

[0319] 본 발명은 최소한 하나의 DV 항체 작용제를 포함하는 백신의 산출을 위한 시약을 내포하는 키트를 제공한다. 일부 구체예에서, 이런 키트는 DV 항체, 이들의 특징적인 부분, 및/또는 이들의 생물학적으로 활성 부분을 발현하는 세포; (ii) 이들 세포를 성장시키기 위한 배지; 그리고 (iii) 칼럼, 수지, 완충액, 튜브, 그리고 항체 정제에 유용한 다른 도구를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 이런 키트는 (i) DV 항체, 이들의 특징적인 부분, 및/또는 이들의 생물학적으로 활성 부분을 인코딩하는 뉴클레오티드를 내포하는 플라스미드; (ii) 이들 플라스미드로 형질전환될 수 있는 세포, 예를 들면, Vero와 MDCK 세포주가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 포유류 세포주; (iii) 이들 세포를 성장시키기 위한 배지; (iv) 음성 대조로서, DV 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드를 내포하지 않는 발현 플라스미드; (v) 칼럼, 수지, 완충액, 튜브, 그리고 항체 정제에 유용한 다른 도구; 그리고 (vi) 사용설명서를 포함할 수 있다.

[0320] 일부 구체예에서, 키트는 하나 또는 그 이상의 시료에서 DV의 존재를 검출하는데 이용된다. 이런 시료는 혈액, 혈청/혈장, 말초혈 단핵 세포/말초혈 림프구 (PBMC/PBL), 담, 소변, 대변, 인후 면봉, 진피 병변 면봉, 뇌척수액, 자궁경부 도말, 고름 시료, 식품 매트릭스, 그리고 신체의 다양한 부분, 예를 들면, 뇌, 비장과 간으로부터 조직이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 병리학적 시료일 수 있다. 이런 시료는 토양, 물, 그리고 균총이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 환경 시료일 수 있다. 열거되지 않은 다른 시료 역시 적용가능하다. 일부 구체예에서, 이런 키트는 (i) 최소한 하나의 DV 항체; (ii) 양성 대조로서, DV를 내포하는 것으로 알려진 시료; 그리고 (iii) 음성 대조로서, DV를 내포하지 않는 것으로 알려진 시료; 그리고 (iv) 사용설명서를 포함한다.

[0321] 일부 구체예에서, 키트는 하나 또는 그 이상의 시료에서 DV를 중화시키는데 이용된다. 이런 키트는 DV-내포 시료를 최소한 하나의 DV 항체 작용제로 처리하고, 그리고 처리되지 않은 시료에 비하여 배양된 세포를 감염시키는 처리된 시료의 능력을 검사하는데 필요한 물질을 제공할 수 있다. 이런 키트는 (i) 최소한 하나의 DV 항체 작용제; (ii) DV로 배양되고 감염될 수 있는 세포; (iii) 음성 대조로서, DV에 결합하고 이를 중화할 수 없는 항체; (iv) 양성 대조로서, DV에 결합하고 이를 중화할 수 있는 항체; (v) 음성 대조로서, DV를 내포하지 않는 것으로 알려진 시료; (vi) 양성 대조로서, DV를 내포하는 것으로 알려진 시료; 그리고 (vii) 사용설명서를 포함

할 수 있다.

[0322] **실시예**

[0323] 본 발명은 하기 실시예와 관련하여 더욱 충실하게 이해될 것이다. 하지만, 이들 실시예는 단지 예시를 목적으로 하고 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의미되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 개시된 구체예에 대한 다양한 변화와 변경은 당업자에게 명백할 것이고, 그리고 제한 없이, 본 발명의 제제 및/또는 방법에 관련된 것들을 비롯한 이런 변화와 변경은 첨부된 청구항의 발명의 사상과 범위를 벗어나지 않으면서 만들어질 수 있다.

[0324] **실시예 1: 상호작용의 물리화학적 특질을 분석함으로써 단백질-단백질 복합체 구조의 예측**

[0325] 본 실시예에서 연구는 단백질-단백질 (가령, 항원-항체) 상호작용을 모형화하기 위한 핵심 물리화학적 특질의 개발과 이용을 예증한다. 본 실시예에서 분석은 부정확한 구조로부터 항원-항체 상호작용에 대한 정확한 선천적-유사 구조를 식별하는데 보조하고, 따라서 계산적 도킹 모델을 이용한 단백질-단백질 상호작용의 모형화에서 수행된 바와 같이, 단지 에너지 함수만을 이용하여 포즈를 순위매기는 한계를 극복하는데 도움을 준다. 게다가, 본 실시예에서 분석된 9가지 검사 사례의 선천적 포즈를 확인하는데 실패는 현재 검색 알고리즘의 한계 및 항원-항체 복합체에 대한 친화성 증강 돌연변이를 설계하는 것과 연관된 과제를 강조한다.

[0326] 분자 인식의 기초를 형성하는 가능한 많은 기하학적 성질과 화학적 성질을 포획하기 위해, 13가지 원자 수준 특질: 7가지 화학적 특질 및 6가지 물리적 특질 (표 1)이 항원-항체 경계면을 설명하는데 이용되었다. 게다가, 항원-항체 복합체의 77개 비-잉여 3D 구조를 포함하는 데이터 세트가 조립되고 (방법 섹션 참조) 2가지 부분, 40개 구조로 구성되는 훈련 세트 및 나머지 37개 구조로 구성되는 검사 세트로 분할되었다. 각 구조에 상응하게, 100개 미끼 모델이 계산적 도킹을 이용하여 작제되고 (방법 섹션 참조), 총 7,777개 구조 (7,700개 미끼 + 77개 x-선)를 산출하였다. 훈련 기에서, 다변량 로지스틱 회귀분석 (MLR)이 각 특질 (설명적 변수) 및 미끼 포즈와 대비하여 x-선을 성공적으로 식별할 수 있는 정도 (결과 변수) 사이에 관계를 결정하는데 이용되었다. 이러한 분석은 결과 변수의 값을 예측하기 위해 합동될 수 있었던 모든 설명적 변수의 부분집합을 달성하는데 보조하였다. 각 PDB 파일로부터 산출된 입력 특질 (및 이의 미끼)은 비-균일한 학습을 예방하기 위해 표준화된 Z-점수로서 표시되었는데, 이것은 유의성의 과다 (또는 과소) 추정을 야기할 수 있다. 예측 기의 경우에, 미리 연산된 유의미한 특질은 검사 데이터 세트에서 구조가 선천적-유사일 확률을 예측하는데 이용되었다.

[0327] MLR 분석으로부터 결과는 선천적 대 미끼 구조를 정확하게 식별하는 확률에 영향을 주는 개별 특질의 상대적 우세가 ZEPII > 주요 사슬-주요 사슬 H-결합 > H-결합의 밀도 > 하전된 기의 백분율 > 양이온-파이 상호작용의 밀도 > 매몰된 표면적 > 중성 극성 기의 백분율 > 이온성 결합의 밀도의 순서라는 것을 암시하였다. 상기 특질 각각은 0.05의 알파 수준에서 유의미한 것으로 밝혀졌다. 로지스틱 회귀 계수에 기초하여, H-결합과 이온성 결합 밀도, 주요 사슬-주요 사슬 H-결합 및 매몰된 표면적은 도킹된 모델에서 과대 추정된 것으로 보인다. 이것은 기대되는데, 그 이유는 상기 특질의 값을 증가시키는 것이 채점 함수를 최대화하는 경향이 있기 때문이다. 이에 반하여, ZEPII, 양이온-파이 상호작용, 하전된 기와 중성 극성 기의 백분율은 도킹된 모델에서 불충분하게 대표되는 것으로 보인다. 양이온-파이 상호작용, 하전된 기와 중성 극성 기의 백분율은 에너지 채점 함수에 유의미하게 기여하지 않는다; 따라서 이들 특질은 도킹된 경계면에서 최적화되지 않았다. 게다가, 도킹된 모델의 사정은 도킹 절차가 분리할 수 있는 항원-항체 복합체에 공통적인 쌍별 상호작용을 충실히 개괄하지 못한다는 것을 보여준다; 따라서 모의 경계면은 낮은 ZEPII 값을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0328] 그 다음, MLR이 미리 연산된 유의미한 특질을 이용하여 검사 데이터 세트에서 37개 항원-항체 상호작용의 x-선 구조를 예측하는데 이용되었고, 그리고 이후, MLR-기초된 예측의 감수성이 도킹된 모델에서 이용된, ZRANK 에너지 함수의 것들과 비교되었다 (방법 섹션 참조). 전반적으로, MLR은 ZRANK 에너지 함수보다 x-선 구조를 예측하는데 더욱 우수한 것으로 나타났는데 (도면 1), 이것은 MLR 접근법이 선천적-유사 결합 포즈를 예측하는데 있어서 ZRANK보다 향상을 산출한다는 것을 암시하였다. 미끼 모델의 더욱 면밀한 검사, 이들의 ZRANK 점수 및 MLR-기초된 예측 확률은 흥미로운 통찰력을 드러냈다 (도면 2). ZDOCK는 37개 구조 중에서 29개에 대한 선천적-유사 구조를 확인하였는데, 이것은 상기 계산적 검색 알고리즘이 매우 정확하다는 것을 지시하였다. 하지만, (1) ZRANK 점수는 심지어 구조적으로 유사한 포즈 사이에서도 유의미하게 변하였다 (도면 2A); (2) 매우 상이한 구조가 대략 동일한 점수를 받을 수 있었는데, 이것은 부정확한 해답으로부터 정확한 해답을 식별하는 것을 어렵게 만들었다 (도면 2A); (3) 더욱 나쁜, 부정확한 해답이 종종 선천적-유사 구조보다 더욱 우수한 점수를 받았

다 (도면 2A); (4) MLR-기초된 예측 확률 또한 구조적으로 유사한 포즈 사이에서 변하긴 했지만, 비-선천적 포즈는 높은 예측 확률을 드물게 받았는데, 이것은 가양성 구조 예측의 가능성이 포즈가 예측 확률에 따라 순위매겨질 때 더욱 낮다는 것을 지시하였다. 따라서, 예측 확률은 ZRANK 점수와 비교할 때, RMSD와 더욱 우수하게 상관하는 것으로 관찰되었다 (도면 2B & 2C).

[0329]

[0330] **실시예 2: 친화성-증강 돌연변이의 예측을 위한 물리화학적 특질 이용**

[0331] 본 실시예에서 연구는 단백질-단백질 (가령, 항원-항체) 상호작용에 대한 친화성 증강 돌연변이를 설계하기 위한 채점표의 개발을 보여준다.

[0332] 구체적으로, 본 실시예는 쌍별 아미노산 상호작용의 성향을 정량하기 위해 개발된 수학적 모델을 설명한다 (방법 섹션 참조). 이들 통계학적 성향은 아미노산의 각 가능한 쌍에 가중치를 배정하는 상호작용 매트릭스로서 공식화되었다. 아미노산 경계면 적합도 (AIF)로 불리는, CDR 위치에서 잔기의 적합도는 상기 잔기를 수반하는 모든 단백질간 쌍별 접촉 (서로의 일정한 거리 내에 2개 아미노산으로 규정됨)의 합동된 성향이었다. 임의의 구조적 결과 없이 AIF 값에서 향상을 야기하는 치환은 친화성 증강을 위한 후보로서 고려되었다. 이들 성향은 공지된 단백질 구조의 데이터베이스에서 아미노산 접촉에 관한 통계를 이용하여 결정되었다 (방법 섹션 참조). 복수의 거리 컷오프와 에너지 최소화 단계를 회피하는 것은 원자 좌표에 대한 심한 의존을 제거하였다.

[0333] 이전 연구에 의해 만들어진 관찰 결과와 일치하게, 상기 성향 데이터는 파라토프 내에서 다른 잔기에 비하여 티로신, 트립토판, 세린과 페닐알라닌의 우세를 보여주었다 (표 2). AIF 미터단위는 이후, 공개된 데이터가 이들 예측을 검증한 3가지 상이한 시스템을 교차하여 항체의 친화성 증강 돌연변이를 예측하는데 이용되었다. 검사 사례 중에서 한 가지는 항-EGFR 항체 약물 세툭시맙 (Erbitux)이었는데, 여기서 52 pM까지 10-배 친화성 향상이 경쇄 상에서 3개 돌연변이에 의해 영리하게 실행되었다. 이들 예측된 돌연변이 중에서 2 가지, S26D와 T31E는 결합 친화성을 향상시키는 것으로 나타났는데, 그 이유는 세툭시맙에서 단일 돌연변이 및 세 번째 돌연변이 (N93A)의 더욱 면밀한 검사가 Ala가 전반적으로 약한 접촉 성향을 갖는 잔기의 세트 사이에 있다는 것을 드러냈기 때문이다. 다른 검사 사례는 항-라이소자임 모델 항체 D44.1이었는데, 여기서 18개 돌연변이가 친화성 증강에 적합한 것으로 예측되었다. 중쇄 상에서 예측된 돌연변이 중에서 4가지, T28D, T58D, E35S, G99D는 D44.1의 공개된 높은-친화성 변이체의 일부이었다. 다른 검사 사례는 암-연관된 세린 단백분해효소 MT-SP1을 표적으로 하는 항체 E2이었다. AIF 미터단위는 T98R을 포함하는 8개 돌연변이를 예측하였는데, 이것은 항체 친화성을 340 pM까지 14-배 향상시키기 위한 단일 돌연변이 T98R을 확인한 이전 인실리코 친화성 증강 연구를 확증하였다.

[0334] **실시예 3: 뎅기 항체에서 친화성 증강 돌연변이의 설계**

[0335] 본 실시예에서 분석은 DV의 단지 일정한 혈청형에만 결합하는 항-DV 항체가 DV의 4가지 모든 혈청형의 활성을 강력하게 중화시키는 변이체가 산출되도록 하는 가공을 통해 변형될 수 있다는 것을 예증한다. 구체적으로, 본 실시예에서 연구는 뎅기 mAb 4E11에서 합리적으로 설계된 돌연변이가 DV 혈청형 4 (DV4)에 대한 친화성을 증대하고, 그리고 DV 혈청형 1-3 (DV1-3)에 결합에 대한 유의미하게 유해한 영향을 주지 않는다는 것을 보여준다.

[0336] mAb 4E11의 결합과 중화 활성 프로필은 DV1-3에 높은 친화성과 저해 효능, 하지만 DV4에 낮은 친화성과 중화 활성을 보여준다 (도면 3). 4가지 모든 혈청형에 유력한 중화 활성을 위한 4E11을 영리하게 설계하기 위해, 설계 접근법 (도면 4)은 3가지 중요한 인자에 의존하였다: (1) 4E11-EDIII 상호작용의 정확한 모델을 산출, (2) 혈청형-특이적 구조적 원소를 이해하고 친화성과 특이성의 결정인자를 재포획, 그리고 (3) 우호적인 상호작용, 따라서 DV4와의 향상된 친화성을 부여하는 치환의 설계.

[0337] 항체 결정 구조의 부재에서, Fv 영역의 구조적 모델이 만들어졌고, 모형화된 Fv가 ZDOCK 소프트웨어를 이용하여 DV1의 EDIII와 마주 하여 도킹되고, 그리고 에피토프와 CDR H3 파라토프에 관한 이전에 공개된 기능적 데이터 (Watanabe et al., 2012 Trends in Microbiology 20:11-20)가 포함되었는데, 그 이유는 도킹된 포즈를 담보하기 위한 결합 경계면에서 특정한 잔기가 선천적 복합체로부터 유의미하게 일탈하지 않았기 때문이다 (방법 섹션 참조). ZDOCK는 입력 경계면 잔기의 상이한 조합으로 5회 실행되었고, 그리고 각 실행으로부터 최선의 순위매기기 모델 (도면 5)은 MLR 확률을 이용하여 재-순위매겨졌다 (표 3). MLR 접근법에 의해 예측된 상위 모델은 ZRANK 방법의 예측과 정합하지 않았다.

[0338] MLR 접근법에 의해 예측된 상위 모델은 웹 서버 ANCHOR [Dosztanyi et al., 2009 Microbiology 25:2745-

2746]에 의해 계산적으로 예측된 파라토프 핫스팟 및 간접적인 ED-III (DV1) ELISA에 의한 결합 사정으로 4E11의 모든 CDR 루프에서 각 위치의 Ala-스캐닝에 의해 실험적으로 결정된 핫스팟 사이에 수행된 비교에 의해 검증되었다. 선별된 모델의 핫스팟 예측은 실험적으로 결정된 핫스팟의 61%를 정확하게 확인한 반면, 나머지 포즈는 <45% (범위 28-44%)의 핫스팟 예측 정확도를 가지고, 따라서 선별된 포즈가 진정한 4E11/ED-III 결합 형상을 반영할 가능성이 있다는 것을 지시하였다.

[0339] 상위 4E11-ED-III (DV1) 모델은 4E11 및 각각의 다른 3가지 혈청형으로부터 대표적인 EDIII 균주 사이에 상호작용의 모형화를 유도하는데 이용되었다 (방법 섹션 참조). 4가지 구조적 모델을 이용하여, 각 혈청형에 결합하는 항체의 방식이 조사되고, 그리고 DV4 혈청형을 향한 불량한 친화성의 분자 기초가 서열과 ED-III 도메인-수준 구조적 분석의 조합을 이용하여 확인되었다. 분석은 DV4와 다른 혈청형 사이에 4E11 결합 경계면 내부와 주변에서 복수의 아미노산 차이를 드러냈다. 특히, 인접한 β-가닥에 대하여 A-가닥 (잔기 305-308)의 방향은 위치 307에서 국부적인 차이 때문에 DV4에서 상이하였다 (도면 6). DV4에 낮은 친화성과 중화 효능과 일치하게, 4E11-EDIII (DV4) 경계면은 더욱 작은 BSA, 더욱 적은 H-결합 및 염 가교 접촉을 소유하였다.

[0340] 그 다음, AIF 지수가 DV4 결합에 친화성을 증강하는 돌연변이를 설계하기 위해 적용되었다. 이것은 23개 CDR 위치에 걸치는 87개 돌연변이의 세트를 유발하였다. 예측된 돌연변이는 모든 유형의 아미노산을 포함하였다. 아미노산 대체의 선택은 항상 직관적이지는 않았다 (가령, 파라토프 CDR 위치를 둘러싸는 에피토프 영역이 음성으로 하전되면, Arg와 Lys가 CDR 위치에서 항상 통계학적으로 선호되는 것은 아니었다). 에너지학을 향상시키는 잔기가 선호되긴 했지만, 친화성 획득은 정전 상보성, 충전 및 소수성 표면적에서 향상을 통해 일어날지도 모른다. DV4 혈청형-특이적 잔기의 근위에 CDR 위치에서 친화성-증강 돌연변이를 설계하는데 있어서 의식적인 노력이 경주되었다 (도면 6). 다른 혈청형에 유해하지 않으면서 DV4 친화성을 향상시키는 잠재력을 갖는 돌연변이는 더욱 높은 선호가 제공되었다. 결합 친화성에 대한 점 돌연변이의 효과에 관해 배우려는 노력에서, 돌연변이체는 성공의 가장 높은 확률을 갖는 잔기에 제한되지 않았다.

[0341] **실시예 4: 가공된 뎅기 항체의 실험적 특성화**

[0342] 본 실시예에서 실험은 항체에서 특정한 조작된 부위-지향된 돌연변이가 DV1-3의 EDIII에 대한 결합 친화성 및/또는 효능에서 감소 없이, 또는 단지 최소 감소에서, DV4의 EDIII에 대한 친화성 및/또는 효능을 증가시킨다는 것을 석명한다. 본 실시예에서 실험은 또한, 가공된 항체의 결합 성질이 역시 정확하게 정량될 수 있다는 것을 증명한다. 게다가, 본 연구에서 실험은 특정한 성공적인 단일-돌연변이를 합동함으로써 설계된 가공된 뎅기 항체가 항체의 친화성에서 최고 증가를 유발한다는 것을 보여준다. 게다가, 본 실시예에서 실험은 본 연구에서 설계된 가공된 항체가 DV의 4가지 모든 혈청형에 강한 저해 활성을 전시할 뿐만 아니라, 또한 생체내에서 유력한 항바이러스 활성을 갖는다는 것을 확증한다.

[0343] 총 87개 돌연변이가 DV1-4의 정제된 재조합 EDIII를 코팅된 항원으로서 이용한 간접적인 ELISA에 의해 실험적 시험을 위해 선별되었다. 돌연변이체는 부위-지향된 돌연변이유발에 의해 산출되고, 서열-확증되고, 그리고 일시적인 형질감염에 의해 293 세포로부터 발현되었다. 10개 돌연변이가 DV1-3의 EDIII에 결합에서 감소 없이 또는 최소 감소에서 증강된 EDIII-DV4 친화성을 갖는 것으로 확인되었다 (표 3). 이들 10개 돌연변이는 5개 CDR 위치, VL에서 4개 (R31, N57, E59, 그리고 S60) 및 VH에서 1개 (A55)에 걸쳤다. 10개 돌연변이 중에서 8개는 VL에 있었고, 7개는 L2에 단독으로 있었다. 성공적인 돌연변이는 성질에서 대부분 하전되거나 또는 극성이고, 그리고 항체-항원 경계면 구역의 주위에서 체류하는 것으로 밝혀졌다 (도면 7). 구조적 분석은 돌연변이체 측쇄가 고도로 보존된 에피토프 잔기와의 접촉을 창출한다는 것을 보여주고, 이들이 DV 1-3 결합에 유해하지 않은 이유를 암시하였다 (도면 6 및 표 5).

[0344] 상기 논의된 이들 10개 단일-돌연변이체의 결합 성질의 더욱 정확한 정량을 위해, 평행에서와 용해 상태에서 친화성을 결정하기 위해 경쟁 ELISA 실험이 수행되었다. 표 6은 5가지 단일 돌연변이체 항체로부터 친화성 결과를 개설하고, DV1-3의 EDIII에 친화성을 유지하면서 최대 EDIII-DV4 친화성 증강을 증명한 돌연변이를 나타낸다. DV4 친화성 증강의 정도는 1.1-배 (VL-R31K) 내지 9.2-배 (VH-A55E) 범위에서 변하였다. 놀랍게도, 2개 돌연변이는 다른 혈청형에 증가된 친화성을 부여하였다; VH-A55E는 ED-III-DV2와 ED-III-DV3에 대해 각각, 16-배와 7-배 친화성 증가를 유발한 반면, VL-N57E는 ED-III-DV2에 대한 3-배 친화성 증가를 증명하였다. 혈청형 1-3에 계량된 15개 친화성 (5개의 단일 돌연변이체 항체로) 중에서 단지 3개만 2-배보다 큰 감소를 보였고, 그리고 단지 1개 항체-EDIII 친화성 (EDIII-DV3에 대한 VL-E59Q)만 친화성에서 3-배보다 큰 감소를 유발하였다.

[0345] 구조적으로, 5개 친화성-증강 위치는 파라토프의 공간적으로 상이한 영역에 위치하고 (도면 7), 추가 증강이 성공적인 단일 돌연변이를 합동함으로써 달성될 수 있다는 것을 암시한다. 복수의 3-, 4-와 5-돌연변이체 조합은 조사되고, 그리고 4E5A로 명명된 5중 돌연변이체 항체는 친화성에서 최대 증가를 보여주었다. 놀랍게도, 4E5A는 단일 돌연변이체로서 EDIII-DV4에 최대 친화성 향상을 부여한 각 위치에서 아미노산 변화를 나타내는 5개 치환으로 구성되었다. 부모 mAb와 비교하여, 4E5A는 DV1과 DV3의 EDIII에 대한 친화성 및 DV2에 대한 15-배 친화성 증가를 유지하면서 EDIII-DV4에 대한 450-배 친화성 향상 (K_D = 91 nM)을 전시하였다 (표 7 및 표 8). 유의미하게, 이들 결과는 항체의 친화성이 마이크로몰에서 거의 나노몰 친화성까지 증가될 수 있다는 것을 예증하였다. 표면 플라스몬 공명 (SPR)이 친화성 계량을 확증할 뿐만 아니라 운동성 결합 파라미터를 획득하는데 이용되었다 (표 9 및 도면 8). SPR로부터 친화성 값은 경쟁 ELISA 결과 (K_D = 41 μM)와 전반적인 합치 관계에 있는 매우 낮은 친화성을 지시하는 EDIII-DV4에 4E11 WT의 특이적 결합이 검출될 수 없었다는 점을 제외하고, 경쟁 ELISA에 의해 획득된 것들과 우수한 정량적 합치 관계에 있었다.

[0346] EDIII-DV4에 4E5A의 증가된 친화성이 증강된 활성으로 번역되는 지를 결정하기 위해, 병변 감소 중화 검사 (FRNT) 검정이 이용되었다. WT 4E11와 비교하여, 4E5A는 DV4를 향한 중화 효능에서 >75배 증가를 보였고, 그리고 이것은 DV1-3에 대한 효능을 유지하였다 (도면 9). 4E5A는 DV1-4에 대해 각각, 0.19, 0.028, 0.77, 그리고 4.0 μg/ml의 $FRNT_{50}$ 값으로, 4가지 모든 혈청형에 강한 저해 활성을 보여주었다. 4E5A 활성을 더욱 석명하기 위해, 상기 항체는 DV2 공격의 AG129 생쥐 모델에서 사정되었는데, 이것은 감염후 3 일자에 피크 바이러스혈증을 보여준다. 1 mg/kg과 5 mg/kg 둘 모두에서, 4E5A는 바이러스혈증에서 유의미한 감소를 증명하였는데, 5 mg/kg 처리는 검출 한계 미만에서 바이러스 역가 수준을 유발하였다 (도면 10). 집합적으로, 이들 결과는 가공된 mAb 4E5A가 DV의 4가지 모든 혈청형에 강한 저해 활성을 전시하고 생체내에서 유력한 항바이러스 활성을 갖는다는 것을 보여주었다.

[0347] 본 연구에 기초하여 설계될 수 있는 가공된 항체 (가령, 4E5A)는 중요한 약물 후보를 나타내고, 그리고 부가적으로, 당분야에 공지된 바와 같이 추가 라운드의 친화성 성숙과 인간화를 위해 채취될 수 있다. 4E11/ED-III 복합체의 결정 구조는 본 특허 출원의 제출에 앞서 공개되었는데, 이것은 본 연구에서 논의된 구조적 모델과 공개된 복합체 구조의 비교를 허용하였고, 그리고 실제로, 1.4 옹스트롬의 C-알파 RMSD 값으로 이들 두 구조 사이에 우수한 상응이 관찰되었고, 본 연구의 유의성을 더욱 확증하였다.

[0348] **토론**

[0349] 치료적 관심의 항체를 발견하기 위한 전통적인 접근법은 실험적 방법, 예를 들면, 파지-전시 기술에 의존한다. 하지만, 이들 접근법은 값비싸고, 기술적으로 도전적이고, 그리고 시간 소모가 많다. 예로서, 클레이드 1 & 2 바이러스를 중화시키는 인플루엔자 FI6 mAb는 104,000개 B 세포를 스크리닝함으로써 확인되었다. 대안적 전략은 합리적인 가공을 통해 현존하는 항체의 성질을 변경하려 할 것이다. 본 연구에서, *ab initio* 모형화와 항체 재설계를 위한 계산적 방법이 제공되었다. 시험 수행에서, x-선 구조 (여러 미끼 모델 중에서)를 취득하는데 있어서 MLR 예측 방법의 감수성은 ZRANK보다 뛰어난 것으로 나타났다. 게다가, AIF 미터단위는 복수의 시스템 전체에서 공지된 친화성 증강 돌연변이를 포획할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 프레임워크는 이후, 항-뎅기 중화 mAb에 더욱 넓은 특이성과 친화성을 영리하게 설계하는데 적용되었다. 본 연구에 의해 획득된 이들 결과는 (1) 단지 소수의 연구만 항체의 교차반응성을 향상시키는 시도를 하였고; (2) 이것이 항체 재설계와 친화성 증강을 향한 실험적 접근법을 이용한 첫 번째 연구이고; 그리고 (3) 친화성 증강 돌연변이가 항체-항원 복합체의 결정 구조 없이 예측 (*aka* 맹인 예측)되었기 때문에 중요하였다. 본 연구는 처음으로, 계산적 접근법의 적용이 항체의 친화성에서 ~400-배보다 큰 향상을 야기한다는 것을 보여주었다 (표 10). 이들 계산적 방법의 단순함을 고려하면, 이들은 항체 공학을 위해 광범위하게 이용될 수 있고, 그리고 물리학-기초된 에너지 접근법과 달리, 이들은 시작 구조의 원자 좌표의 정확한 위치에 의해 영향을 받지 않는다.

[0350] ZRANK로부터 상위 도킹 해법은 선천적-구조로부터 구조적으로 매우 상이한데, 이것은 상위 ZRANK 모델을 추종하는 임의의 친화성 증강 노력이 생산적인 결과를 야기하지 못할 것이라는 것을 지시하였다. 친화성 증강 돌연변이는 또한, 에너지학 접근법에 의한 x-선 구조를 이용하여 예측되었고, 그리고 결과는 안정화와 중성 돌연변이를 식별하는데 있어서 어려움을 강조하였다 (표 11). 더욱 유의미하게, 친화성 증강 돌연변이 N57E, N57S와 E59N은 불안정화로 분류되었다 (표 11). ZRANK가 폭넓게 이용되고 CAPRI 실험에서 상당한 성공을 보였기 때문에, 본 연구에서 제공된 방법은 다른 도킹 알고리즘에 대하여 적층될 때 비교적 효과적으로 수행할 것이다.

ZEPII가 유의미하게 보인다는 사실은 아미노산 조성 및 잔기간 접촉이 식별력을 내포한다는 것을 지시하였다. 흥미롭게도, 일부 기하학적 특질 또한, 선천적 경계면을 미끼로부터 식별하는 예측력을 갖는다. 이것은 항원-항체 경계면이 더욱 평면적이고 유의미하게 정연하거나 또는 충전된다는 이전 연구에 의해 만들어진 관찰 결과와 상관하였다. 5가지 상이한 모델을 산출하는데 이용된 경계면 잔기의 상이한 조합 사이에, 정확한 모델은 모든 공지된 에피토프와 파라토프 경계면 잔기를 이용함으로써 생산되었는데, 그 이유는 추가 배경을 부가하는 것이 검색 공간을 좁히고, 이런 이유로 거의 선천적 복합체 구조의 발견의 기회를 증가시켰기 때문이다.

[0351] 파지 전시 및 지향된 진화 방법은 선택 CDR 루프, 특히 VH-CDR 루프를 무작위화하였는데, 그 이유는 이들이 안정화 접촉의 대부분을 차지했기 때문이다. 4E11에 대한 결과는 다각화 전략이 합리적인 접근법을 이용하고 표적화된 다각화를 위해 VL-루프를 수반해야 한다는 것을 보여주었다. 친화성 증강 돌연변이가 성질에서 주로 극성이고 결합 경계면의 주위에서 존재한다는 관찰 결과는 공지된 데이터와 일치하였다. 이들 돌연변이가 충돌의 효율을 증가시킴으로써 연관률을 증가시킬 확률이 크다. 표적화된 활성을 갖는 돌연변이를 예측하는데 있어서 성공 비율은 12% (10/87)이다. 이들 결과는 설계 문제의 복잡성 (즉, 복수의 항원의 침범)을 고려하고 무작위 돌연변이가 평균적으로 결합 친화성에 대한 유해한 효과를 가질 것이라는 점을 고려하면, 고무적이었다.

[0352] 연구는 뮤린 생식계열이 EDIII 도메인에 높은-친화성 결합에 대한 고유의 능력을 갖는 유전자 조각을 보유한다는 것을 보여주었다 (참고 24, 32). 5개 돌연변이의 유익한 효과에도 불구하고, 이들 돌연변이는 생체내에서 공동-진화하지 않았다. 코돈-수준 분석은 N57E와 S60W에서 아미노산 대체가 최소한 2개의 염기 변화를 필요로 한다는 것을 보여주고 유전체학 수준에서 한계를 강조하였다. 이전 연구는 항-DV 항체에 의해 인식된 에피토프가 3가지 상이한 영역에 속한다는 것을 보여주었다: (1) ED-III 상에서 외측-능선 에피토프 (혈청형-특이적 유력한 중화제); (2) DIII의 A-가닥 (부분복합체-특이적 중화제); 그리고 (3) 다른 DII와 DIII 에피토프 (복합체-특이적 또는 플라비바이러스 교차-반응성 중간 정도로 유력한 중화제). 본 연구에서, 처음으로, A-가닥 에피토프에 대한 항체가 좋은 시험관내 효능으로 4가지 모든 혈청형에 결합하도록 가공될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 집합적으로, 4E5A는 흥미로운 광범위 중화 프로필을 전시하였고 뎅기 질환의 치료를 위한 잠재적인 치료적 개발을 위한 관심되는 항체일 것이다. 인간에서 DV에 대항하는 mAb 치료제는 항체-의존성 증강에 기인한 조절 장애에 직면할 수 있었다. 하지만, 최근 연구는 재조합 항-DV 항체의 Fc 영역의 변경이 생체내에서 ADE를 예방하고, 따라서 이들 더욱 새로운 상보성 접근법에 대한 기회를 제공한다는 것을 보여주었다. mAb 에피토프의 보존의 정도는 중화 스펙트럼 및 생체내 보호를 결정하는데 있어서 유의미한 인자일 수 있다. DV4 바이러스의 계통발생적 분석은 4가지 상이한 유전자형의 실존을 드러냈다: I (동남아시아), II (인도네시아), III과 IV (삼림 또는 말레이시아). 유전자형 II 내에서, 바이러스는 이전에 IIa와 IIb로서 규정된 2가지 상이한 클레이드로 군집한다. 4E11-5A의 에피토프 영역의 서열 분석은 유전자형 IIa, IIb와 4에서 보존의 정도가 높은 반면, 유전자형 I에서 보존이 상대적으로 더욱 낮다는 것을 드러냈고, 이것은 본 발명자들에게 가공된 항체가 대다수의 DV4 바이러스에 대항하여 효과적일 수 있음을 암시하였다.

표 1

[0353] **물리화학적 특질의 설명.**

특질 번호	특질의 설명	특질 하위-분류
화학적		
1	다양한 유형의 상호작용의 숫자	(1) 소수성, (2) 이황화 가교, (3) 수소 결합, (4) 이온성 상호작용, (5) 방향족-방향족, (6) 방향족-황, (7) 양이온-파이
2	각 유형의 상호작용의 밀도 (즉, 각 유형의 얼마나 많은 접촉이 경계면의 100 입방 옹스트롬마다 평균적으로 관찰되는 지의 여부)	(1) 소수성, (2) 이황화 가교, (3) 수소 결합, (4) 이온성 상호작용, (5) 방향족-방향족, (6) 방향족-황, (7) 양이온-파이
3	수소-결합의 분류	(1) 주요 사슬 - 주요 사슬, (2) 주요 사슬 - 측쇄, (3) 측쇄 - 측쇄
4	염 가교 상호작용의 숫자	
5	하전된 잔기를 수반하는 수소 결합의 숫자	
6	화학적 기의 조성	(1) 극성, (2) 중성과 (3) 비극성 화학적 기
7	ZEPII	제공된 표면에 항체 결합의 확률을 지시하는 우호적인 상호작용의 빈도를 사정한다 (방법 섹션 참조)

물리적		
7	매몰된 표면적	
8	평면성	
9	표면 상보성	
10	경계면 원자 충전 밀도	
11	질량의 중심으로부터 항원의 결합 부위 사이에 거리	
12	항원-항체 경계면에 공통적인 우호적인 상호작용의 숫자를 계수함으로써 표면의 항체 결합 잠재력을 정량하는 신규한 미터단위	

표 2

[0354] **20X20 아미노산 성향 매트릭스**. 파라토프 아미노산은 왼쪽에 표시되고 에피토프 아미노산은 위쪽에 표시된다. 이러한 성향 데이터는 77개 비-잉여 항원-항체 복합체를 이용하여 산출되었다.

	ALA	ARG	ASN	ASP	CYS	GLU	GLN	GLY	HIS	ILE	LEU	LYS	MET	PHE	PRO	SER	THR	TRP	TYR	VAL
ALA	0.25	0.59	0.14	0.53	0	0.28	0.6	0.35	1.33	0.68	1.1	0.33	2.3	2.94	0.77	0.25	0.38	1.49	0.59	1
ARG	0.58	0.87	1.11	2.29	0	1.75	0.87	0.67	0.95	1.03	0.99	0.44	0.79	0.75	0.15	0.5	0.66	0.29	2.24	0.57
ASN	0.74	1.32	1.04	0.94	0.72	1.28	1.32	1.08	1.94	1.03	0.33	1.05	1.53	0.54	0.74	0.78	0.58	0.83	0.82	0.41
ASP	0.23	1.68	0.81	0.6	0	0.75	0.54	0.79	1.04	0.4	1.27	2.2	0.62	0.58	0.51	0.84	1.08	0.89	1.05	0.27
CYS	5.29	0	0	5.59	36.02	0	0	2.46	0	0	0	0	0	6.85	2.68	0	0	0	0	4.17
GLU	0.22	1.41	0.6	0.23	0	0.36	0.39	0.2	0.57	0.39	0.14	0.85	0.39	0.56	0.44	0.75	0.55	0.85	0.17	0.34
GLN	0.44	0.2	0.72	0.23	0	0.48	0.26	0.61	0	0.78	0.82	0.38	0	0.57	0.44	0.65	0.44	0	1.02	0
GLY	0.31	1.01	0.57	0.49	1.06	1.37	0.99	0.72	0.68	0.56	0.39	0.9	0.76	0.94	0.89	0.51	0.84	0.61	0.97	0.74
HIS	0.55	0.64	0.76	0.87	0	0.91	1.15	0.51	0.73	0.49	0.52	0.6	1	0	0.84	0.27	0.56	0	0.43	0.65
ILE	0.31	0.57	0.17	0.32	0	0.34	0.73	0.14	1.2	0.55	1.33	0.66	2.22	1.58	0.31	0.45	0.92	3	2.36	1.2
LEU	0.42	0.88	0.7	0.22	0.72	0.7	0.63	0.59	1.12	1.51	1.98	0.83	1.16	1.37	0.86	0.52	0.43	2.09	1.64	1
LYS	0	0.31	0.37	0.71	0	1.86	0.4	0.16	0.89	0	0.42	0.59	0	1.31	0.17	0.67	0.17	1.33	0	0.27
MET	0	0.99	1.17	0	0	1.17	0.64	0.5	1.4	0.95	0	0	3.88	0	0.54	0	0	2.1	1.65	0.84
PHE	1.81	1.36	0.74	0.72	0.77	0.87	1.22	1.16	2.98	0.81	1.41	1.17	0.82	2.05	1.49	0.67	1.03	1.78	0.35	1.6
PRO	0.75	1.04	0.41	0.2	0	0.41	1.12	0.17	1.97	1	1.4	0.49	2.72	1.94	0.38	0.55	0.57	0.74	1.16	0
SER	1.12	1.27	0.62	0.93	1.37	1.64	1.54	0.6	1.16	0.43	1.25	0.97	1.02	1.04	0.73	0.83	0.93	1.42	1.43	0.82
THR	0.84	1.17	0.79	1.14	0	1.06	1.15	0.34	1.42	0.54	0.37	0.83	1.31	0.16	0.79	0.77	1.03	0.24	0.56	0.76
TRP	1.27	1.71	1.16	1.05	3.37	0.47	2.03	0.99	2.61	0.51	1.06	1.78	1.03	0.73	1	1.12	0.86	0.56	1.86	1.56
TYR	1.48	2.21	1.83	1.56	2.04	1.96	1.6	1.73	2.01	1.9	2.38	1.78	1.89	2.69	1.88	1.35	1.21	1.4	1.36	1.46
VAL	0.3	1.1	0.49	0.78	1.01	1.3	0.88	0.28	1.56	0.79	1.11	0.26	0.54	1.15	0.3	0.59	0.45	2.92	0.69	0.47

표 3

[0355] **상위 5개 도킹된 구조적 모델의 물리화학적 성질.** 칼럼 2-9는 도킹된 모델에 대한 미리 연산된 유의미한 특질의 값을 제공한다. p-값과 교차비 (OR)는 칼럼 헤더에서 열거된다. 특질의 MLR 회귀 계수는 표의 최종 열에서 열거된다. 칼럼 10과 11은 각각, MLR-기초된 예측 확률 및 ZRANK 점수를 제공한다.

포즈	ZEPII (OR = 4.948081868; p-값-16)	BSA (OR=0.595234401;p-값 0.000994)	이온성 접촉 밀도 (OR=0.769203281;p-값 0.048709)	양이온-파이 밀도 (OR=1.453682511;p-값 0.000831)	수소 결합 밀도 (OR=0.409261894;p-값 0.000000432)	주요 사슬-주요 사슬 접촉 (OR=0.072352881;p-값 3.06E-11)	하전된 기의 백분율 (OR=4.853984917;p-값 0.000000516)	중성 극성 기의 백분율 (OR=1.412696091;p-값 0.03383)	MLR 예측 확률	ZRANK 점수
1	1.1032203	2269	0.485	0.176	0.661	15	10	0.1071	0.00263	-75.833
2	1.0727273	1941	0.567	0.155	0.824	16	15	0.0982	0.00159	-85.636
3	1.1028767	2340	0.513	0.128	1.026	24	19	0.1389	0.00003	-66.759
4	1.0836066	2436	0.369	0.164	0.698	17	14	0.1186	0.00192	-71.73
5	0.9682895	2481	0.363	0.202	0.846	21	16	0.1587	0.00001	-72.775
회귀 계수	1.599	-0.5188	-0.2624	0.3741	-0.8934	-2.6262	1.5798	0.3455		

표 4

[0356] **본래 EDIII-DV1-3 친화성을 유지하면서, EDIII-DV4 친화성에서 증가를 야기한 돌연변이.**

사슬	CDR	위치	WT 잔기	돌연변이
VH	H2	55	Ala	Glu
VH	H2	55	Ala	Asp
VL	L1	31	Arg	Lys
VL	L2	57	Asn	Glu
VL	L2	57	Asn	Ser
VL	L2	59	Glu	Gln
VL	L2	59	Glu	Asn
VL	L2	60	Ser	Trp
VL	L2	60	Ser	Tyr
VL	L2	60	Ser	Arg

표 5

친화성 증강 돌연변이에 의해 만들어진 접촉.

사슬 & CDR	위치	WT 잔기	돌연변이	예측된 DV4 접촉
VH - H2	55	Ala	Glu	Lys (310), Lys (323)와 H-결합, 이온성 접촉
			Asp	Lys (310), Lys (323)와 H-결합, 이온성 접촉
VL - L1	31	Arg	Lys	Glu (311)와 이온성 접촉
VL - L2	57	Asn	Glu	Lys (305)와 이온성 접촉
			Ser	Lys (310)와 H-결합
VL - L2	59	Glu	Gln	Glu (327)와 H-결합
			Asn	Glu (327)와 H-결합
VL - L2	60	Ser	Trp	Ala (329)와 소수성 접촉
			Tyr	Glu (327)와 H-결합
			Arg	Glu (327)와 이온성, H-결합 및 Gly (328)와 H-결합

[0357]

표 6

4E11 WT 에 비하여 증가된 EDIII-DV4 친화성 및 유사한 EDIII-DV1-3 친화성을 갖는 단일 돌연변이체 항체의 친화성. 포함된 돌연변이는 각 확인된 위치에 대해, EDIII-DV1-3 친화성을 가깝게 유지하면서 최대 EDIII-DV4 친화성을 증명한 것들이다. K_D 값은 최소한 2 개의 독립된 실험의 평균을 나타낸다.

돌연변이	CDR	EDIII-DV1 K_D (nM)	EDIII-DV2 K_D (nM)	EDIII-DV3 K_D (nM)	EDIII-DV4 K_D (nM)
4E11 WT	-	0.328	5.20	21.8	40,793
A55E	H2	0.295	0.323	2.95	4442
R31K	L1	0.378	5.35	21.1	37,292
N57E	L2	0.281	1.75	33.9	8408
E59Q	L2	0.772	10.8	102	11,034
S60W	L2	0.284	6.30	23.1	26,351

WT에 상대적인 친화성

0.1 1 10+

[0358]

표 7

조합 돌연변이체 4E11-5A 의 친화성.

방법	mAb	EDIII-DV1		EDIII-DV2		EDIII-DV3		EDIII-DV4	
		K_D (nM)	배수적 변화	K_D (nM)	배수적 변화	K_D (nM)	배수적 변화	K_D (nM)	배수적 변화
경쟁 ELISA	4E11 WT	0.328	-	5.20	-	21.8	-	40,793	-
	4E11-5A	0.309	1.1	0.246	21.1	16.6	1.3	91.2	447.3
SPR	4E11 WT	0.60	-	6.20	-	7.68	-	NB	-
	4E11-5A	1.78	0.28	0.70	8.9	6.19	1.6	114	-

[0359]

표 8

[0360] 돌연변이를 보이는 4E5A의 에너지 계산은 결합 에너지에 대한 부가 효과를 갖는다.

항체	EDIII-DV4 △G (kcal/mol)[a]	EDIII-DV4 △△G (kcal/mol)[b]
4E11 WT	-5.98	---
VH-A55E	-7.29	-1.31
VL-R31K	-6.03	-0.05
VL-N57E	-6.92	-0.93
VL-E59Q	-6.76	-0.77
VL-S60W	-6.24	-0.26
4E5A	-9.59	-3.61

[0361] [a]25 ℃에서 $\triangle G = RT\ln(K_D)$에 의해 계산된 자유 에너지

[0362] [b]$\triangle\triangle G = \triangle G_{mutant} - \triangle G_{WT}$

표 9

[0363] SPR에 의해 계량된 4E11과 4E5A에 대한 운동성 결합 파라미터.

	EDIII-DV1		EDIII-DV2		EDIII-DV3		EDIII-DV4	
	k_{on}[a]	k_{off}[b]	k_{on}[a]	k_{off}[b]	k_{on}[a]	k_{off}[b]	k_{on}[a]	k_{off}[b]
4E11	1.11	5.51	1.98	123	1.34	102	N.B.[c]	N.B.[c]
4E5A	1.17	20.8	2.01	14.1	2.76	143	0.766	875

[0364] [a]k_{on} 값은 ($x10^6$ $M^{-1}s^{-1}$)로서 표시된다

[0365] [b]k_{off} 값은 ($x10^{-4}$ s^{-1})로서 표시된다

[0366] [c]N.B., 결합 없음

표 10

[0367] 다양한 인실리코 항체 친화성 증강 연구의 결과의 비교.

연구	방법	항체	항원	결정 구조 ?	단일 /멀티 항원	친화성 향상
우리 연구	실험적 정보학	4E11	뎅기 gpE	아니오	멀티	~450
Lippow SM et. al., Nature Biotech (2007)	에너지학	D44.1	라이소자임	예	단일	140
Marvin J.S. et. al., Biochemistry (2003)	에너지학	Y0101	VEGF	예	단일	~6
Clark LA et.al., Protein Science (2006)	에너지학	AQC2	VLA1	예	단일	~10

Farady et al. (2009) Bioorg. Med. Chem. Lett.	에너지학	E2	단백분해효소 MT-SP1	예	단일	14

표 11

[0368] **에너지학 접근법을 이용하여 예측된 항체 돌연변이.** 4E11의 친화성을 증가시킨 돌연변이는 음영된다.

ALA55에서 돌연변이	돌연변이에너지	돌연변이의 효과	ARG31에서 돌연변이	돌연변이에너지	돌연변이의 효과	ASN57에서 돌연변이	돌연변이에너지	돌연변이의 효과	GLU59에서 돌연변이	돌연변이에너지	돌연변이의 효과	SER60에서 돌연변이	돌연변이에너지	돌연변이의 효과
VH:ALA55			VL:ARG31			VL:ASN57			VL:GLU59			VL:SER60		
GLU	-1	안정화	LYS	-1.01	안정화	LEU	-1.79	안정화	PHE	-1.02	안정화	SER	-2.21	안정화
THR	-0.44	중성	HIS	-0.13	중성	PHE	-1.69	안정화	TYR	-1	안정화	PHE	-2.17	안정화
TRP	-0.4	중성	MET	-0.04	중성	TYR	-1.44	안정화	GLN	-0.86	안정화	ARG	-1.69	안정화
ASP	-0.37	중성	PRO	-0.04	중성	ARG	-0.88	안정화	ARG	-0.5	중성	LYS	-1.69	안정화
GLN	-0.33	중성	ARG	0	중성	TRP	-0.64	안정화	LYS	-0.35	중성	GLN	-1.65	안정화
LEU	-0.33	중성	ILE	0.16	중성	GLN	-0.62	안정화	ASP	-0.29	중성	LEU	-1.44	안정화
TYR	-0.29	중성	THR	0.22	중성	MET	-0.57	안정화	MET	-0.24	중성	TRP	-1.31	안정화
ARG	-0.23	중성	VAL	0.22	중성	HIS	-0.51	안정화	HIS	-0.23	중성	MET	-1.26	안정화
PRO	-0.23	중성	ASN	0.24	중성	LYS	-0.04	중성	LEU	-0.1	중성	HIS	-0.8	안정화
ILE	-0.17	중성	ALA	0.3	중성	ASN	0	중성	ILE	-0.01	중성	ASN	-0.79	안정화
MET	-0.17	중성	CYS	0.32	중성	ILE	0.53	불안정화	GLU	0	중성	CYS	-0.64	안정화
VAL	-0.14	중성	SER	0.34	중성	ASP	0.58	불안정화	PRO	0.05	중성	THR	-0.57	안정화
PHE	-0.09	중성	GLY	0.41	중성	PRO	0.68	불안정화	VAL	0.06	neutral	ALA	-0.56	안정화
CYS	-0.04	중성	TYR	0.46	중성	THR	0.93	불안정화	THR	0.17	중성	ASP	-0.45	중성
ALA	0	중성	PHE	0.47	중성	CYS	1.14	불안정화	SER	0.34	중성	GLU	-0.42	중성
HIS	0.06	중성	GLN	0.48	중성	GLU	1.17	불안정화	CYS	0.39	중성	GLY	-0.05	중성
GLY	0.07	중성	LEU	0.48	중성	ALA	1.32	불안정화	ALA	0.51	불안정화	TYR	0	중성
ASN	0.13	중성	TRP	0.68	불안정화	SER	1.53	불안정화	GLY	0.52	불안정화	ILE	0.43	중성
SER	0.17	중성	ASP	1.14	불안정화	VAL	1.88	불안정화	ASN	0.68	불안정화	VAL	0.61	불안정화

LYS	1.06	불안정화	GLU	1.26	불안정화	GLY	1.95	불안정화	TRP	2.53	불안정화	PRO	3.31	불안정화

[0369] **방법**

[0370] *항원-항체 경계면에서 아미노산의 접촉 성향을 추정하기 위한 수학적 모델*

[0371] 간단히 말하면, 항원-항체 경계면에서, 한 쌍의 잔기는 그들이 상호작용의 우호적인 에너지학을 가지면 또는 기회 발생에 의해 아마도 상호작용한다. 아미노산 상호작용의 성향은 우연히 예상된 상호작용의 숫자, 다시 말하면, 예상된 빈도를 연산하고, 그리고 관찰된 빈도를 이러한 숫자로 나눔으로써 계산되었다.

[0372] 항원-항체 경계면의 각 측면으로부터 하나씩 2개의 아미노산이 서로로부터 4.5 Å내에 있으면 (즉, 가장 짧은 비-H 원자 거리가 4.5 Å보다 작으면), 이들은 *쌍 잔기*로서 규정되었다. 경계면에서 잔기 x (항원)와 y (항체) 사이에 쌍별 상호작용의 총수가 $N(x,y)$이면, 이후 그들의 동시발생 빈도, $F(x,y)$는 하기와 같이 규정되었다:

[0373] $$F(x,y) = \frac{N(x,y)}{\sum_{l=1}^{20}\sum_{m=1}^{20} N(l,m)}$$

[0374] 상기 방정식의 분모는 경계면에서 모든 잔기 쌍의 쌍별 상호작용의 합계를 지시한다.

[0375] 파라토프와 에피토프에서 모든 아미노산의 발생의 빈도가 계산되어야 한다. 에피토프에서 특정 아미노산 x의 빈도, $F^{\text{에피토프}}(x)$는 하기와 같이 규정되었다:

[0376] $$F^{\text{에피토프}}(x) = \frac{N(x)}{\sum_{l=1}^{20} N(l)}$$

[0377] 상기 방정식에서, $N(x)$는 에피토프에서 아미노산 x의 계수를 표시한다. 분모는 에피토프에서 모든 아미노산의 총수를 나타낸다.

[0378] 유사하게, 파라토프에서 아미노산 y의 발생 빈도, $F^{\text{파라토프}}(y)$는 하기와 같이 규정되었다:

[0379] $$F^{\text{파라토프}}(y) = \frac{N(y)}{\sum_{l=1}^{20} N(l)}$$

[0380] 상기 방정식에서, $N(y)$는 파라토프에서 아미노산 y의 숫자를 표시한다. 분모는 파라토프에서 모든 아미노산의 총수를 지시한다.

[0381]

[0382] 파라미터 $F(x,y)$, $F^{\text{에피토프}}(x)$ 및 $F^{\text{파라토프}}(y)$는 데이터 세트에서 77개 벤치마크 항원-항체 구조 모두를 이용하여 결정되었다. 이전 연구에 의해 만들어진 관찰 결과와 일치하게, 티로신, 세린, 글리신과 아스파라긴은 가장 풍부한 파라토프 잔기인 반면, 리신, 아르기닌, 류신과 글리신은 가장 풍부한 에피토프 잔기이었다 (도면 11). 아미노산 x와 y의 발생이 독립되면, 하기 방정식에서 규정된 $EF^{\text{에피토프-파라토프}}(x,y)$는 아미노산 x와 y가 동시에 나타나는 예상된 빈도 비율이었다.

[0383] $$EF(x,y) = F^{\text{에피토프}}(x)F^{\text{파라토프}}(y)$$

[0384] 항원에 대한 경계면에서 아미노산 x와 y의 동시발생률이 예상된 비율보다 높으면, 다음 비율 $RA_a(x,y)$는 1보다

커진다.

[0385] $$RA\quad(x,y) = \frac{F\quad(x,y)}{EF(x,y)}$$

[0386] $RA_s(x,y)$는 20X20 매트릭스이었다. $RA_s(x,y)$의 예시적인 적용은 하기에 제안된다.

[0387] $RA\ (x,y)$를 이용하여 CDR 잔기의 AIF를 결정한다. 경계면에서 CDR 잔기의 AIF는 $RA\ (x,y)$와 이의 이웃의 합계로서 규정되었다. 이웃은 거리 기준 (4.5 Å)에 의해 규정되었다.

[0388] 경계면 위치에서 아미노산의 최적 선택을 결정한다 (파라토프 재공학). 항원-항체 복합체가 제공되면, CDR 위치에서 아미노산 선호는 접촉 잠재력 점수를 이용하여 계산되었다. 구체적으로, 소정의 CDR 위치에서, 야생형 (WT) 잔기는 글리신과 프롤린을 제외한 (중추 입체형태 변성을 방지하기 위해) 나머지 아미노산에 의해 조직적으로 치환되고, 그리고 대체의 확률은 AIF 미터단위를 이용하여 각 경우에서 평가되었다. 야생형 잔기보다 더욱 높은 대체 잠재력을 갖는 단일 돌연변이는 (a) 극성 기를 매몰시키지 않고, 그리고 (b) 입체 장해를 유발하지 않는 돌연변이를 찾기 위해 계산적으로 재평가되었다.

[0389] $RA\ (x,y)$를 이용하여 항원-항체 경계면의 상호작용의 강도 (에피토프-파라토프 경계면 지수)를 정량한다. 항원과 항체 사이에 상호작용은 무수한 비-공유 결합의 형성으로부터 발생한다. 이런 이유로, 상호작용 친화성은 인력과 척력 (반 데르 발스 상호작용, 수소결합, 염 가교 및 소수성 힘)의 합계에 직접적으로 관련된다. 본원에서, 항체-항원 경계면의 상호작용의 강도는 아미노산 쌍의 모든 조합에 대한 RA의 선형 조합에 의해 정량적으로 조사되었다. 항원-항체 경계면 'i'의 강도를 표시하는 지수 (에피토프-파라토프 경계면 지수 ($EPII$)로 불린다)는 하기에 의해 규정되었다:

[0390] $$EPII_i = \frac{\sum_{x=1}^{20}\sum_{y=1}^{20} F^i\ (x,y)RA\quad(x,y)}{\sum_{x=1}^{20}\sum_{y=1}^{20} F^i\ (x,y)}$$

[0391] 상기 방정식에서, $F^i(x,y)$는 경계면 i에서 아미노산 x (x는 이차성 구조적 군에 속한다)와 y의 동시발생 빈도를 표시한다.

[0392] $EPII$를 이용하여 진정한 항원 항체 상호작용을 도킹 미끼로부터 식별한다. 계산적 도킹에 의해 산출된 다른 미끼 경계면으로부터 가장 높은 잠재력을 갖는 경계면을 식별하기 위해, $EPII$ 값은 단백질에서 모든 경계면에 의해 정규화되어야 한다. Z-채점된 $EPII$가 이런 목적으로 이용되었다. M 경계면이 단백질에서 발견되면, 경계면 i에 대한 Z-채점된 $EPII$는 하기와 같이 계산되었다:

[0393] $$Z_{EPII_i} = \frac{EPII_i - \mu}{\sigma}$$, 여기서

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^{M} EPII_i}{M}$$

[0394] $$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{M}(EPII_i - \mu) * (EPII_i - \mu)}{M}}$$

[0395] Z_{EPIIi} 점수는 소정의 경계면에 결합하는 항체의 확률의 지표이었다. 단백질에서 가장 높은 Z_{EPIIi} 점수 (또는 항원 항체 상호작용에 대해 확립된 공통 값 (상기 논의됨)을 초과하는 Z_{EPIIi})를 갖는 경계면은 항체 결합을 위한 가장 개연적인 부위이었다.

[0396] *비-잉여 항원-항체 구조적 복합체의 데이터 세트 및 미끼 모델을 산출하기 위한 계산적 도킹*

[0397] 단백질 데이터 은행으로부터 총 568 항원-항체 복합체가 분석되었다. 기하학적 경계면 특질 (평면성, 매몰된 표면적 등)의 적절한 열거를 담보하기 위해, 항원 길이가 20개 아미노산보다 적은 구조는 배제되었다. 부가적으로, 많은 구조는 동일한 또는 유사한 항원을 내포하는데, 이들은 연구를 치우치게 하여, 중복-대표된

단백질 항원으로부터 유래된 인자에 대한 더욱 높은 가중치를 제공할 수 있다. 데이터 세트로부터 잉여 구조를 제거하기 위해, 상동 항원 (BLAST_ENREF_40 P-값 10e27에 의해 규정됨)을 갖고 50% 에피토프 잔기를 공유하는 구조는 동일한 군 하에 분류되고, 그리고 가장 높은 해답을 갖는 구조는 대표로서 선별되었다. 이것은 77개 비-잉여 항원-항체 복합체 구조를 야기하였다.

[0398] ZDOCK는 항원 항체 상호작용의 미끼 계산적 모델을 산출하는데 이용되었다. 미끼 모델을 산출하기 위한 프로토콜은 77개 구조적 복합체 모두에 대해 동일하였다. 항체의 가변 도메인만 도킹에 이용되었다. 이들 두 분자 중에서 더욱 큰 것은 수용체인 것으로 고려되는 반면, 더욱 작은 분자는 리간드인 것으로 고려되었다. 리간드 방향은 다양한 입체형태를 샘플링하기 위해 각 단계에서 6도 회전되었다. 초기 도킹 절차가 상대적 큰 구역을 탐사하기 때문에, 산출된 모델이 선천적 포즈로부터 유의미하게 이동하지 않도록 담보하기 위해, 에피토프와 파라토프 상에서 추정 핫스팟 잔기 사이에 거리 제약이 설정되었다. 구조 예측과 직면된 과제가 4E11 시나리오에 동등하도록 담보하기 위해, 어느 한쪽에서 2개의 핫스팟 잔기가 선별되었다. 모든 미끼 모델에서, 추정 에피토프와 파라토프 핫스팟은 서로로부터 10 옹스트롬 이내에 있었다. 핫스팟은 웹 서버, ANCHOR를 이용하여 확인되었다. 초기 도킹 절차는 2,000개 포즈를 산출하였고, 이들은 이후, 이전에 설명된 모두-대-모두 RMSD 매트릭스에 기초하여 군집되었다. 2개의 도킹된 포즈 사이에 RMSD는 결합 경계면의 7 옹스트롬 이내에 리간드 잔기에 기초하여 계산되었다. 클러스터 중심을 나타내는 도킹된 단백질 포즈는 미끼 모델로서 고려되었다. ZDOCK는 도킹된 포즈를 순위매기기 위해, 탈용매화와 정전기 에너지 조건 ('ZRANK')과 함께 모양 상보성을 이용한다. 이들 미끼 각각은 CHARMm 최소화를 이용하여 더욱 정밀화되었다.

[0399] 이들 x-선 구조는 예측 방법의 감수성을 평가하기 위한 미끼 모델과 합동되었다.

[0400] *4E11 Fv의 상동성 모형화*

[0401] 4E11 Fv의 구조적 모델은 SIWW-MODEL 상동성 모형화 서버를 이용하여 만들어졌다. 연구는 초가변 CDR을 모형화하는 전반적인 정확도가 (1) 표적과 원형 사이에 서열 유사성의 정도가 높고, (2) CDR 루프 L1, L2, L3, H1, H2의 주요-사슬 입체형태가 "정준 구조"를 추종하고, 그리고 (3) 중쇄 CDR3 (H3)이 별로 길지 않을 때 적절하다는 것을 지시하였다.

[0402] *4E11-EDIII (DV 1-4) 포즈를 산출하기 위한 계산적 도킹*

[0403] 모형화된 Fv는 ZDOCK를 이용하여 선별 DV1 균주의 EDIII와 마주 하여 도킹되었다. DV1 항원이 이용되었는데, 그 이유는 mAb 4E11가 DV1 바이러스로 감염된 생쥐로부터 최초 단리되었기 때문이다. DV1 항원의 구조는 DV1 EDIII (PDB: 3IRC)의 해답된 결정 구조를 원형으로서 유지하는 SWISS MODEL 상동성 모형화 서버를 이용하여 모형화되었다. ZDOCK는 도킹된 포즈를 순위매기기 위해, 탈용매화와 정전기 에너지 조건 ('ZRANK')과 함께 모양 상보성을 이용한다. 도킹된 포즈가 선천적 복합체로부터 유의미하게 일탈하지 않도록 담보하기 위해, 문헌에서 발견된 위치 확인된 에피토프와 파라토프 잔기가 결합 경계면 내에 포함되도록 강제되었다. 경계면 내에 포함된 잔기는 307K, 389L과 391W (에피토프; 3IRC에서처럼 DV1 넘버링) 및 101W, 102E (파라토프; 서열 위치에 기초된 넘버링)이었다.

[0404] DV 2, 3, 4 (EDIII)와 복합으로 4E11의 구조는 4E11-DV1 EDIII 구조적 모델을 원형으로서 이용하여 모형화되었다.

[0405] **등가물과 범위**

[0406] 당업자는 일과적인 실험을 이용하여, 본원에서 설명된 발명의 특정한 구체예에 대한 많은 등가물을 인정하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기 설명에 국한되는 것으로 의도되지 않고, 오히려 첨부된 청구항에서 진술된 바와 같다

[0407] 청구항에서, 관사 (가령, "a," "an,"과 "the")는 반대로 지시되거나 또는 문맥으로부터 달리 명백하지 않으면 하나 또는 하나 이상을 의미할 수 있다. 군의 하나 또는 그 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구항 또는 설명은 반대로 지시되거나 또는 문맥으로부터 달리 명백하지 않으면, 군 구성원 중에서 하나, 하나 이상, 또는 전부가 소정의 산물 또는 과정에서 존재하거나, 이용되거나, 또는 만약 그렇지 않으면 유관하면 충족된 것으

로 고려된다. 본 발명은 군의 정확하게 한 구성원이 소정의 산물 또는 과정에서 존재하거나, 이용되거나, 또는 만약 그렇지 않으면 유관한 구체예를 포함한다. 본 발명은 군 구성원 중에서 하나 이상, 또는 전부가 소정의 산물 또는 과정에서 존재하거나, 이용되거나, 또는 만약 그렇지 않으면 유관한 구체예를 포함한다. 게다가, 본 발명은 열거된 청구항 중에서 하나 또는 그 이상으로부터 하나 또는 그 이상의 한계, 원소, 조항, 서술적 용어 등이 다른 청구항 내로 도입되는 모든 변이, 조합, 그리고 순열을 포괄하는 것으로 이해된다. 예로서, 다른 청구항에 의존하는 임의의 청구항은 동일한 독립 청구항에 의존하는 임의의 다른 청구항에서 발견된 하나 또는 그 이상의 한계를 포함하도록 변형될 수 있다. 게다가, 특허청구범위가 조성물을 언급하는 경우에, 달리 지시되지 않으면 또는 상충 또는 불일치가 발생한다는 것이 당업자에게 명백하지 않으면, 본원에서 개시된 목적 중에서 한 가지를 위해 조성물을 이용하는 방법이 포함되고, 그리고 본원에서 개시된 제조 방법 또는 당분야에서 공지된 다른 방법 중에서 한 가지에 따라 조성물을 만드는 방법이 포함되는 것으로 이해된다.

[0408] 원소가 목록, 예를 들면, 마쿠쉬 군 형식으로서 제공되는 경우에, 원소의 각 하위군 역시 개시되고, 그리고 임의의 원소(들)가 상기 군으로부터 제거될 수 있는 것으로 이해된다. 일반적으로, 본 발명, 또는 본 발명의 양상이 특정 원소, 특질 등을 포함하는 것으로 지칭되는 경우에, 본 발명의 일정한 구체예 또는 본 발명의 양상은 이런 원소, 특질 등으로 구성되거나, 또는 본질적으로 구성되는 것으로 이해되어야 한다. 단순함을 위해, 이들 구체예는 본원에서 이들 단어에서 구체적으로 진술되지 않았다. 용어 "포함하는"은 개방적인 것으로 의도되고 추가 원소 또는 단계의 포함을 허용하는 것으로 주목된다.

[0409] 범위가 제공되는 경우에, 종점이 포함된다. 게다가, 달리 지시되지 않으면 또는 문맥 및 당업자의 이해로부터 달리 명백하지 않으면, 범위로서 표시된 값은 문맥에서 달리 명시되지 않으면, 임의의 특정한 값 또는 본 발명의 상이한 구체예에서 언급된 범위 내에 상기 범위의 하한선의 단위의 1/10까지 하위범위를 취할 수 있는 것으로 이해된다.

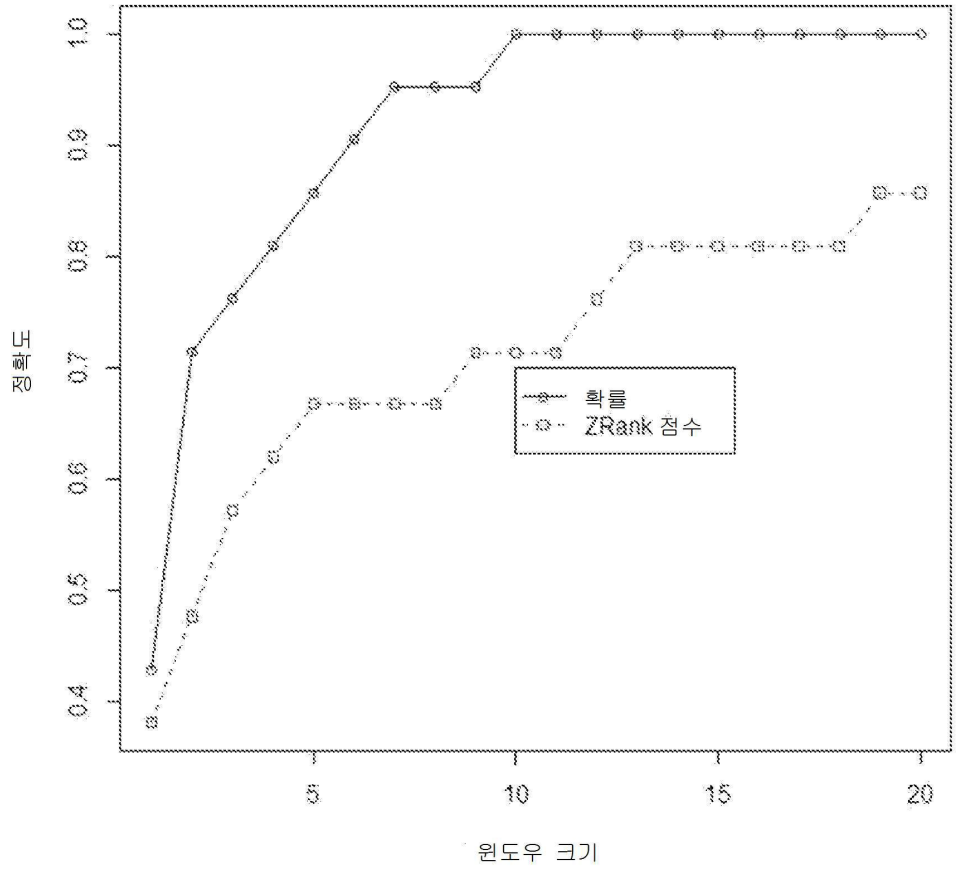
[0410] 이에 더하여, 선행 기술 내에 속하는 본 발명의 임의의 특정 구체예는 특허청구범위 중에서 임의의 한 가지 또는 그 이상으로부터 명백히 배제되는 것으로 이해된다. 이런 구체예가 당업자에게 공지된 것으로 간주되기 때문에, 배제가 본원에서 명백히 진술되지 않은 경우에도 이들은 배제될 수 있다.

[0411] 상기에서 및 명세서 전반에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일에 앞서 그들의 개시 목적으로만 제공된다. 본원에서 어느 것도 본 발명자들이 선행 발명에 의해서 이런 개시보다 선행하는 권리가 없음을 시인하는 것으로 간주되지 않아야 한다.

[0412] 당업자는 일과적인 실험을 이용하여, 본원에서 설명된 발명의 특정한 구체예에 대한 많은 등가물을 인정하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기 설명에 국한되는 것으로 의도되지 않고, 오히려 하기 청구항에서 진술된 바와 같다.

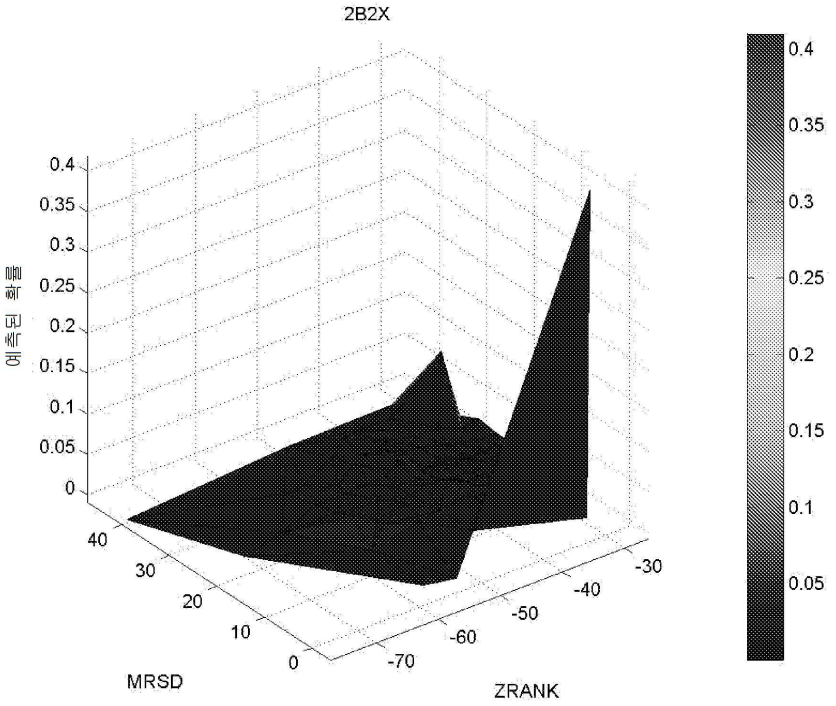
도면

도면1



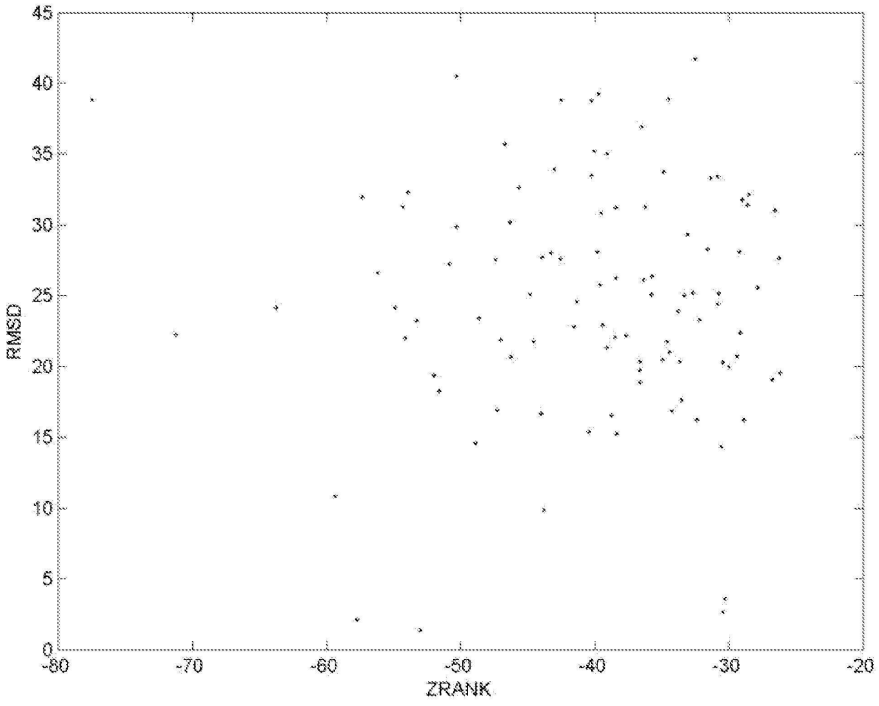
도면2a

(A)


2B2X
예측된 확률
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
40
30
20
10
0
MRSD
-70
-60
-50
-40
-30
ZRANK

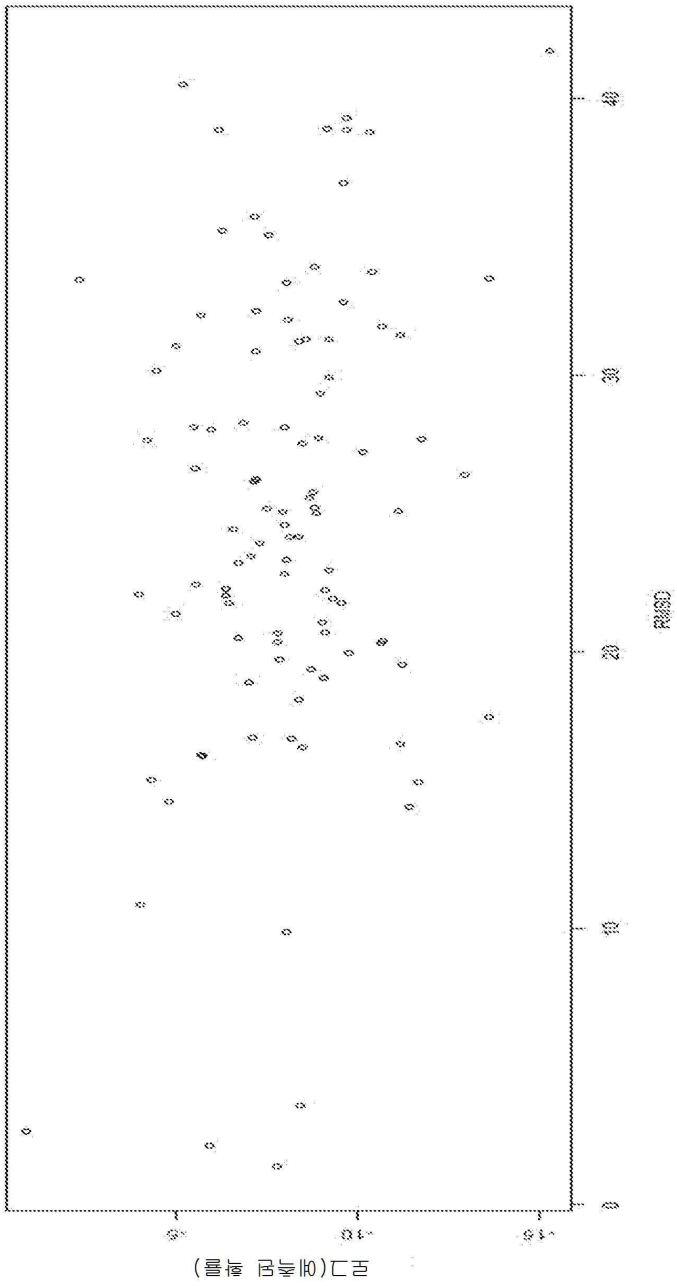
도면2b

(B)

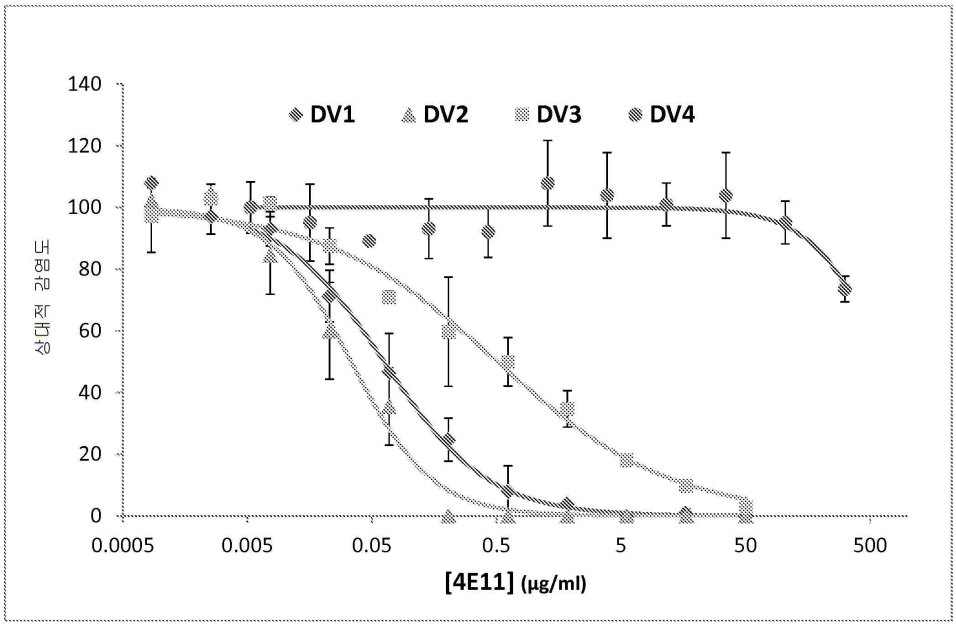

RMSD
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-80
-70
-60
-50
-40
-30
-20
ZRANK

도면2c

(C)

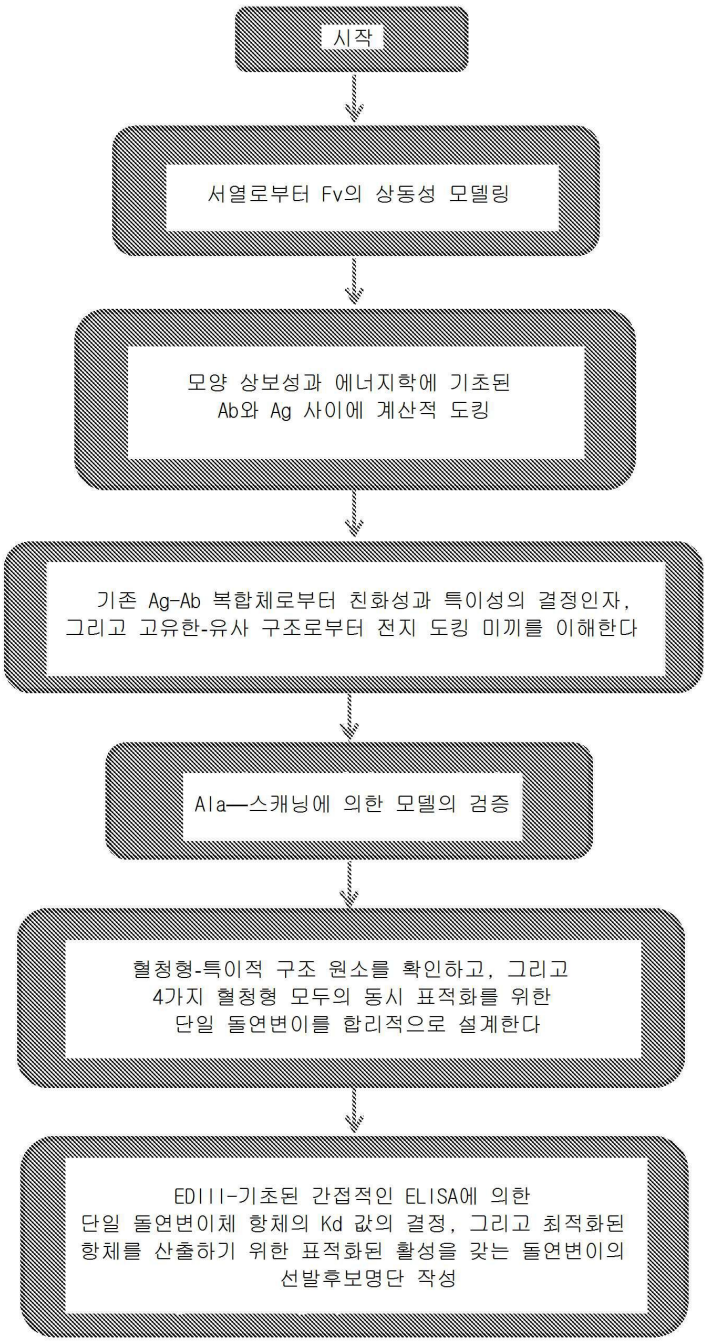


도면3

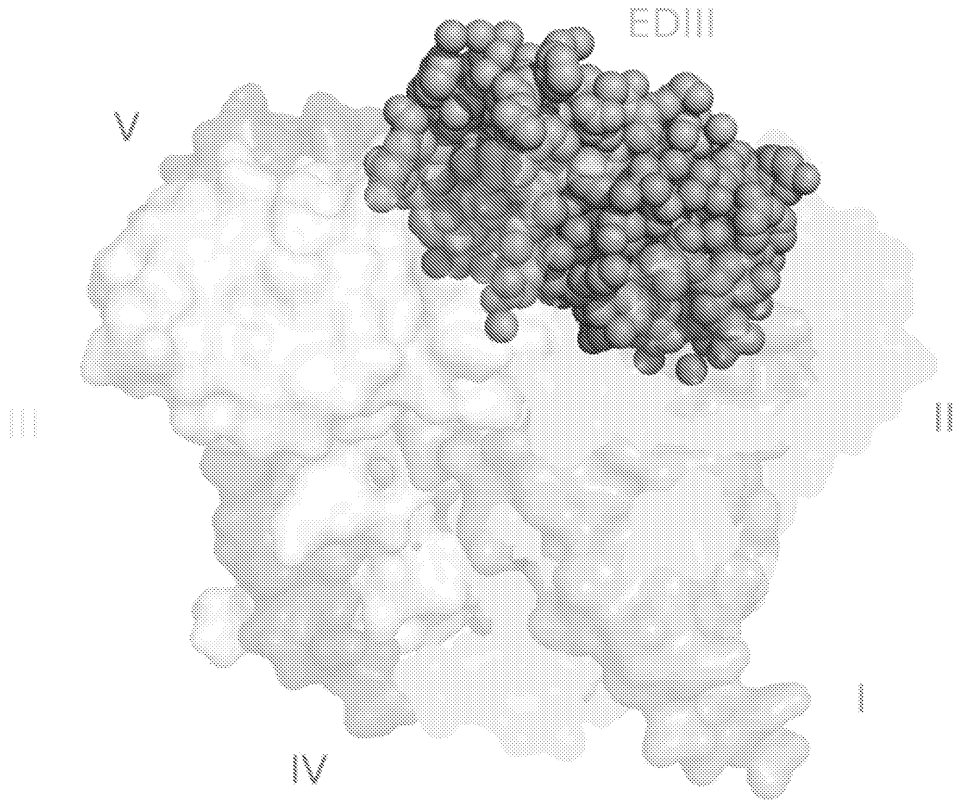


EDIII-DV1 K_D (nM)	EDIII-DV2 K_D (nM)	EDIII-DV3 K_D (nM)	EDIII-DV4 K_D (nM)
0.328	5.20	21.8	40,793

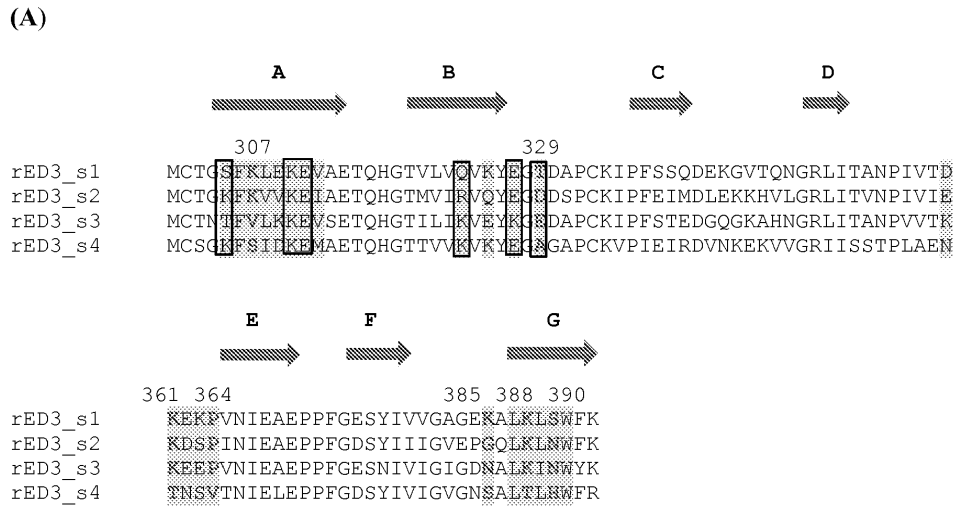
도면4


시작
서열로부터 Fv의 상동성 모델링
모양 상보성과 에너지학에 기초된
Ab와 Ag 사이에 계산적 도킹
기존 Ag-Ab 복합체로부터 친화성과 특이성의 결정인자,
그리고 고유한-유사 구조로부터 전지 도킹 미끼를 이해한다
Ala—스캐닝에 의한 모델의 검증
혈청형-특이적 구조 원소를 확인하고, 그리고
4가지 혈청형 모두의 동시 표적화를 위한
단일 돌연변이를 합리적으로 설계한다
EDIII-기초된 간접적인 ELISA에 의한
단일 돌연변이체 항체의 Kd 값의 결정, 그리고 최적화된
항체를 산출하기 위한 표적화된 활성을 갖는 돌연변이의
선발후보명단 작성

도면5

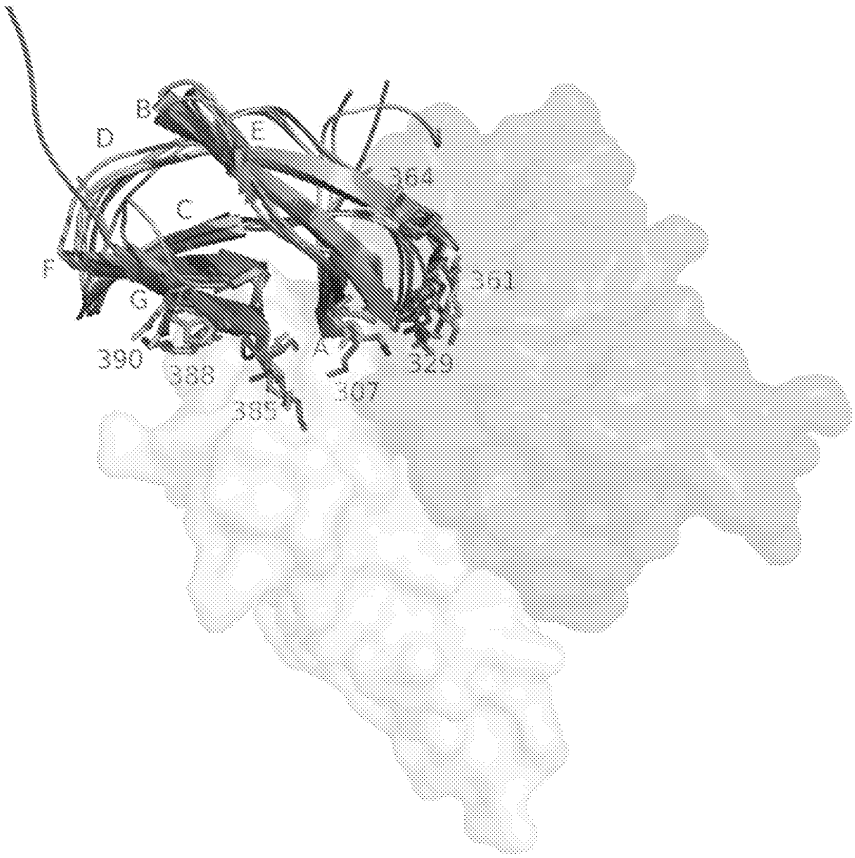

EDIII
V
III
II
I
IV

도면6a

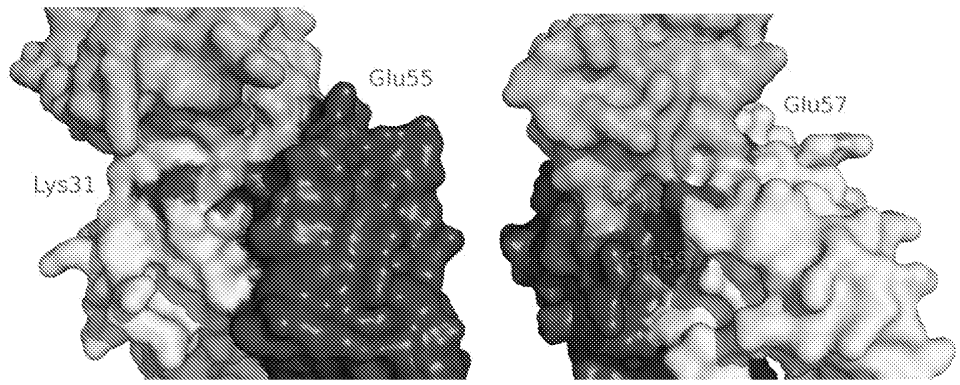

(A)
A
B
C
D
307
329
rED3_s1 MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTQNGRLITANPIVTD
rED3_s2 MCTGKFKVVKEIAETQHGTMVIRVQYEGDSPCKIPFEIMDLEKKHVLGRLITVNPIVIE
rED3_s3 MCTNTFVLKKEVSETQHGTILIKVEYKGSDAPCKIPFSTEDGQGKAHNGRLITANPVVTK
rED3_s4 MCSGHFSIIKEMAETQHGTTVVKVKYEGNGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRIISSTPLAEN
E
F
G
361 364
385 388 390
rED3_s1 KEKPVNIEAEPPFGESYIVVGAGEKALKLSWFK
rED3_s2 KDSPINIEAEPPFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFK
rED3_s3 KEEPVNIEAEPPFGESNIVIGIGDNALKINWYK
rED3_s4 TNSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGNSALTLNWFR

도면6b

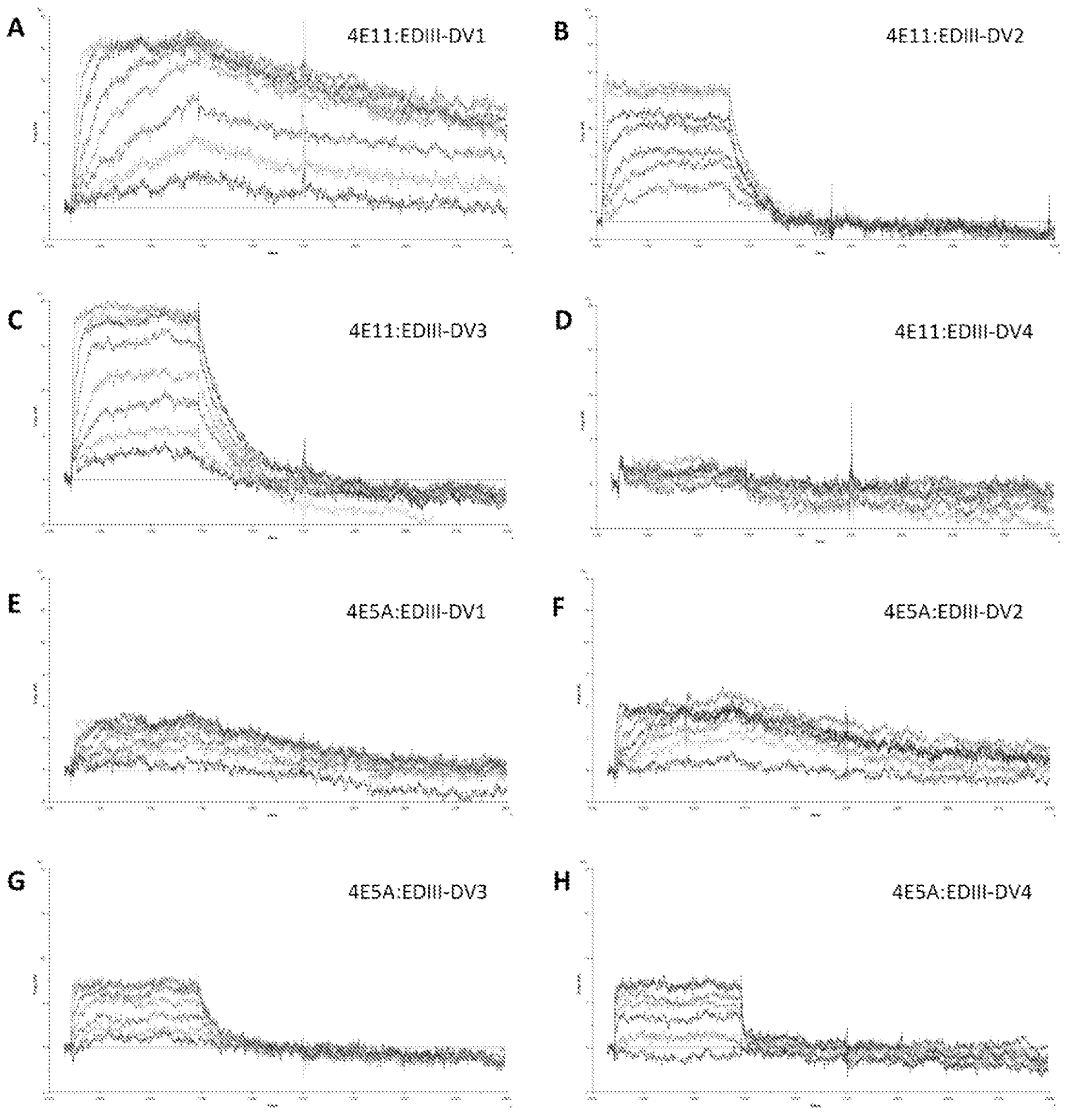
(B)



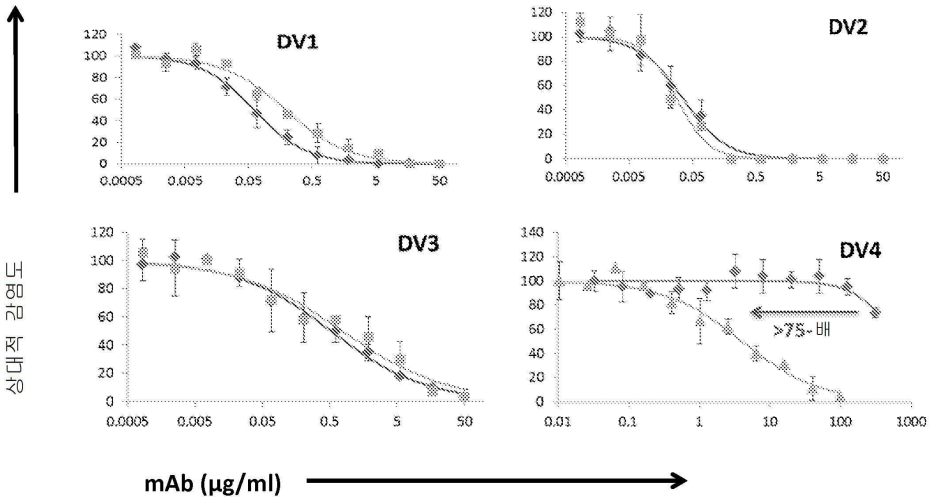
도면7



도면8

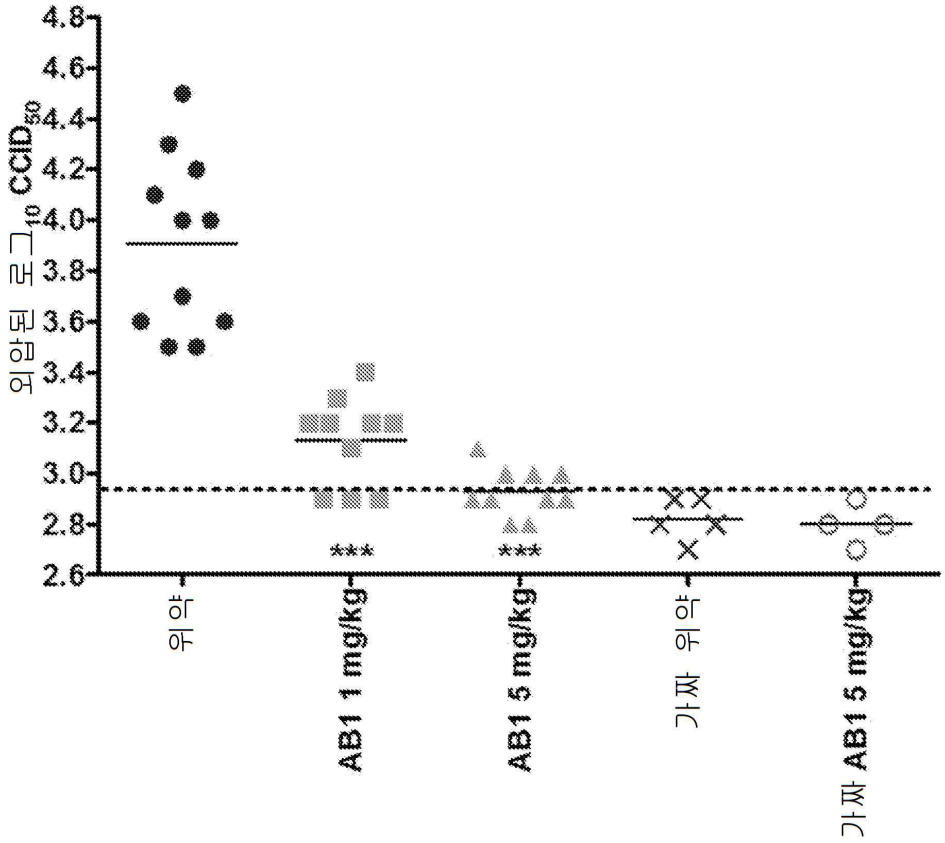

A
4E11:EDIII-DV1
B
4E11:EDIII-DV2
C
4E11:EDIII-DV3
D
4E11:EDIII-DV4
E
4E5A:EDIII-DV1
F
4E5A:EDIII-DV2
G
4E5A:EDIII-DV3
H
4E5A:EDIII-DV4

도면9

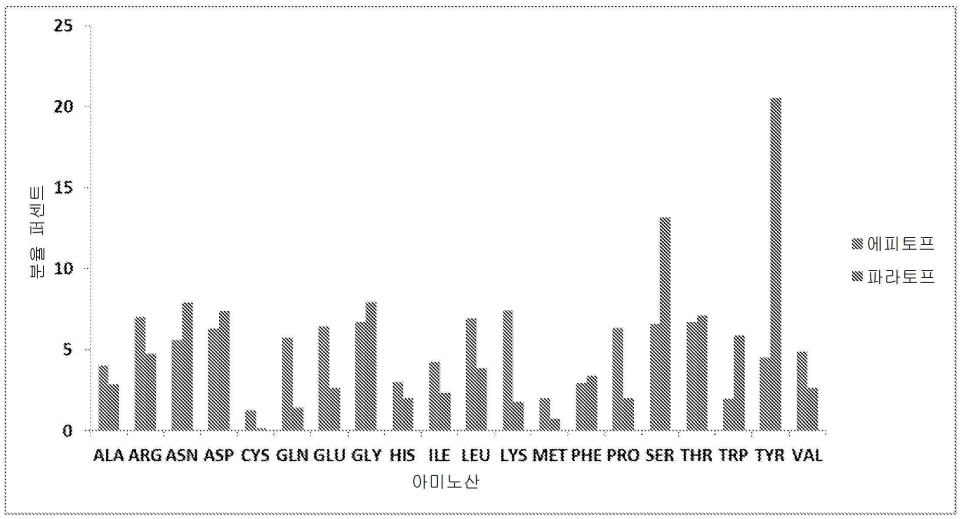


mAb	DV1 EC50 (μg/ml)	DV2 EC50 (μg/ml)	DV3 EC50 (μg/ml)	DV4 EC50 (μg/ml)
4e11 WT	0.062	0.034	0.52	>300
4e11-5A	0.19	0.028	0.77	4.0

도면10



도면11



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

Sasisekharan, Ram

Robinson, Luke N

Tharakaraman, Kannan

<120> ANTI-DENGUE VIRUS ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> 0492612-0952

<150> US 61/780,209

<151> 2013-03-13

<150> US 61/680,385

<151> 2012-08-07

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 HC

<400> 1

Glu Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

20 25 30

Thr Tyr Met Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys

50 55 60

Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ser Arg Gly Trp Glu Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 LC

<400> 2

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Asp Arg Tyr

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Arg Ser Asn

85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 3

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 HC FR1

<400> 3

Glu Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser

20 25

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 HC FR2

<400> 4

Tyr Met Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10 15

Gly Arg Ile

<210> 5

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 HC FR3

<400> 5

Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp

1 5 10 15

Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly

20 25 30

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg

35 40

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 HC FR4

<400> 6

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 HC CDR1

<400> 7

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 HC CDR2

<400> 8

Asp Pro Ala Asn Gly Asp

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 HC CDR3

<400> 9

Gly Trp Glu Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 LC FR1

<400> 10

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
20

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 LC FR2

<400> 11

Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 LC FR3

<400> 12

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 LC FR4

<400> 13

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 LC CDR1

<400> 14

Arg Ala Ser Glu Asn Val Asp Arg Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wt 4E11 LC CDR2

<400> 15

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> wt 4E11 LC CDR3

<400> 16

Gln Arg Ser Asn Glu Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 17

<211> 93

<212> PRT

<213> Dengue virus type 1

<400> 17

Met Cys Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln

1 5 10 15

His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro
20 25 30
Cys Lys Ile Pro Phe Ser Ser Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn
35 40 45

Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro
50 55 60
Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val
65 70 75 80
Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys
85 90

<210> 18
<211> 93
<212> PRT
<213> Dengue virus type 2
<400> 18
Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln

1 5 10 15
His Gly Thr Met Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Asp Ser Pro
20 25 30
Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Lys His Val Leu
35 40 45
Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Ile Glu Lys Asp Ser Pro
50 55 60
Ile Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile

65 70 75 80
Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys
85 90

<210> 19
<211> 93
<212> PRT
<213> Dengue virus type 3
<400> 19

Met Cys Thr Asn Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln
1 5 10 15
His Gly Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro
20 25 30

Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn
35 40 45
Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro
50 55 60
Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile
65 70 75 80
Gly Ile Gly Asp Asn Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Lys
85 90

<210>
20
<211> 93
<212> PRT
<213> Dengue virus type 4
<400> 20
Met Cys Ser Gly Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln
1 5 10 15
His Gly Thr Thr Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro
20 25 30
Cys Lys Val Pro Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val
35 40 45
Gly Arg Ile Ile Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val

50 55 60
Thr Asn Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile
65 70 75 80
Gly Val Gly Asn Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg
85 90

<210> 21
<211> 117
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC of provided antibody agents

<400> 21

Glu Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
20 25 30

Thr Tyr Met Ser Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys
50 55 60

Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ser Arg Gly Trp Glu Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC of provided antibody agents

<400> 22

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Asp Lys Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Glu Leu Gln Trp Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Arg Ser Asn

85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC CDR1 of provided antibody agents

<400> 23

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HC CDR2 of provided antibody agents

<400> 24

Asp Pro Glu Asn Gly Asp

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HC CDR3 of provided antibody agents

<400> 25

Gly Trp Glu Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC CDR1 of provided antibody agents

<400> 26

Arg Ala Ser Glu Asn Val Asp Lys Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC CDR2 of provided antibody agents

<400> 27

Arg Ala Ser Glu Leu Gln Trp

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC CDR3 of provided antibody agents

<400> 28

Gln Arg Ser Asn Glu Val Pro Trp Thr

1 5