

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup>    | 識別記号 | F I            | テ-マコード* ( 参考 ) |
|-------------------------------|------|----------------|----------------|
| A 6 1 K 39/395                |      | A 6 1 K 39/395 | Y 4 B 0 2 4    |
| 39/02                         |      | 39/02          | 4 B 0 6 4      |
| 39/12                         |      | 39/12          | 4 B 0 6 5      |
| A 6 1 P 29/00                 |      | A 6 1 P 29/00  | 4 C 0 8 5      |
| 31/12                         |      | 31/12          |                |
| 審査請求 未請求 予備審査請求（全 49数） 最終頁に続く |      |                |                |

|             |                                 |         |                                        |
|-------------|---------------------------------|---------|----------------------------------------|
| (21)出願番号    | 特願2001 - 537971(P2001 - 537971) | (71)出願人 | モニケイド・コーポレイション<br>MONICAID CORPORATION |
| (86)(22)出願日 | 平成12年11月14日(2000.11.14)         |         | アメリカ合衆国22911バージニア州シャーロ                 |
| (85)翻訳文提出日  | 平成14年5月14日(2002.5.14)           |         | ッツビル、キーウエスト・ドライブ348番                   |
| (86)国際出願番号  | PCT/US00/31051                  | (72)発明者 | ピーター・アイ・ロボ                             |
| (87)国際公開番号  | W001/035980                     |         | アメリカ合衆国22911バージニア州シャーロ                 |
| (87)国際公開日   | 平成13年5月25日(2001.5.25)           |         | ッツビル、キーウエスト・ドライブ348番                   |
| (31)優先権主張番号 | 09/439,690                      | (74)代理人 | 弁理士 青山 葆 （外2名）                         |
| (32)優先日     | 平成11年11月15日(1999.11.15)         |         |                                        |
| (33)優先権主張国  | 米国(US)                          |         |                                        |
| (31)優先権主張番号 | 09/684,813                      |         |                                        |
| (32)優先日     | 平成12年10月10日(2000.10.10)         |         |                                        |
| (33)優先権主張国  | 米国(US)                          |         |                                        |
|             |                                 | 最終頁に続く  |                                        |

(54)【発明の名称】 ケモカイン受容体に対するヒト I g M抗体

(57)【要約】

正常（すなわち、非 H I V 感染）な個体からのヒト血清はケモカインおよび他のリンパ球表面受容体に反応性のある或る種の I g M 自己抗体を含有している。そのような受容体、特に C X C R 4 および C C R 5 受容体と結合するこれらの I g M 自己抗体のサブセットは感染細胞からの H I V - 1 を阻害できる。無症候性 H I V - 1 感染状態から A I D S への進行は、感染細胞からの H I V - 1 を阻害する I g M 自己免疫のレベルによって部分的に決定される。これら低結合活性結合 I g M 自己抗体レベルとウイルス負荷の間には微妙なバランスが存在する。個体のウイルス負荷を増加しやすくする、またはこれらの自己抗体を産生する B 細胞のサブセットを阻害する因子はウイルスの細胞への侵入をもたらし、ウイルス介在疾患の進行を促進する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 ウイルス介在疾患に感染した個体にリンパ球に存在する細胞外受容体に特異性を有するIgM抗体を投与することを特徴とする該疾患に感染した個体の当該疾患の進行を抑制する方法。

【請求項2】 受容体がケモカイン受容体である請求項1記載の方法。

【請求項3】 ケモカイン受容体が、CCR5、CXCR4およびCCR2bからなる群から選択される請求項2記載の方法。

【請求項4】 受容体がリンパ球表面受容体である請求項1記載の方法。

【請求項5】 リンパ球に存在する細胞外受容体に特異性を有するIgM抗体がヒトIgM抗体および動物IgMからなる群から選択される請求項1記載の方法。

【請求項6】 疾患が、リンパ球に存在する細胞外受容体を使用して細胞内に入るものである請求項1記載の方法。

【請求項7】 疾患が、HIV-1およびケモカイン受容体を介してウイルスが細胞に侵入する他のウイルス性疾患からなる群から選択される請求項1記載の方法。

【請求項8】 IgM抗体を個体に静脈内または筋肉内投与する請求項1記載の方法。

【請求項9】 リンパ球に存在する細胞外受容体にIgM抗体を結合させることを特徴とするウイルスの細胞への侵入防止方法。

【請求項10】 受容体がケモカイン受容体である請求項7記載の方法。

【請求項11】 ケモカイン受容体が、CCR5、CXCR4およびCCR2bからなる群から選択される請求項10記載の方法。

【請求項12】 受容体がリンパ球表面受容体である請求項7記載の方法。

【請求項13】 IgM抗体を静脈内または筋肉内投与する請求項10記載の方法。

【請求項14】 IgM抗体特異性遺伝子を抗体産生細胞に導入し、in vitroまたはin vivoでIgM抗リンパ球抗体を産生させることを特徴とするヒトウイルス介在疾患治療用のIgM抗体産生方法。

【請求項15】 I g M抗体がヒト中で産生される請求項14記載の方法。

【請求項16】 請求項14記載の方法により産生されたI g M抗体を個体に投与することを特徴とする個体におけるヒトウイルス介在疾患の治療方法。

【請求項17】 リンパ球に存在する細胞外受容体を該受容体に特異性を有するI g M抗体検出用の抗原として使用することを特徴とする該I g M抗体の検出および定量用の診断アッセイ法。

【請求項18】 受容体がケモカイン受容体である請求項17記載のアッセイ方法。

【請求項19】 受容体がリンパ球表面受容体である請求項17記載のアッセイ方法。

【請求項20】 リンパ球に存在する細胞外受容体に対して特異性を有するI g M抗体を検出し、定量することを特徴とするウイルス感染症または他のウイルス介在疾患罹病性のスクリーニング方法。

【請求項21】 受容体がケモカイン受容体である請求項20記載の方法。

【請求項22】 受容体がリンパ球表面受容体である請求項20記載の方法。  
。

【請求項23】 ウイルス感染症がH I V - 1およびリンパ球表面受容体またはケモカイン受容体を利用して細胞に侵入する他のウイルス疾患からなる群から選択される請求項20記載の方法。

【請求項24】 I g M抗リンパ球抗体に特異的な遺伝子を抗体産生細胞に導入し、該抗体産生細胞を感染ヒトまたは他の免疫欠損動物に導入し、抗体産生細胞にI g M抗リンパ球抗体を産生させることを特徴とするI g M抗リンパ球抗体の産生方法。

【請求項25】 I g M抗リンパ球抗体に対して特異的なヒト抗体産生細胞を単離し、該抗体産生細胞によるin vitroでのI g M抗リンパ球抗体の産生を促進させることを特徴とするI g M抗リンパ球抗体の産生方法。

【請求項26】 抗体産生細胞によるI g M抗リンパ球抗体の産生をハイブリドーマ技術または細胞培養技術を用いて促進させる請求項25記載の方法。

【請求項27】 抗体産生細胞によるI g M抗リンパ球抗体の産生をウイル

ス、細菌または抗原を用いて促進させる請求項25記載の方法。

【請求項28】 ヒトIgMを生成することのできる動物からヒト抗体産生細胞を単離し、該ヒト抗体産生細胞によるin vitroでのIgM抗リンパ球抗体の産生を促進させることを特徴とするIgM抗リンパ球抗体の産生方法。

【請求項29】 抗体産生細胞によるIgM抗リンパ球抗体の産生をハイブリドーマ技術または細胞培養技術を用いて促進させる請求項28記載の方法。

【請求項30】 抗体産生細胞によるIgM抗リンパ球抗体の産生をウイルス、細菌または抗原を用いて促進させる請求項28記載の方法。

【請求項31】 1つ以上の個体に、ウイルス、不活性細菌、抗原およびマイトジェンから選択される1種以上を注射することを特徴とするIgM抗リンパ球抗体をin vivoで産生する方法であって、該IgM抗リンパ球抗体をウイルス感染症またはケモカイン介在疾患の処置に使用する方法。

【請求項32】 個体に、白血球に存在するケモカイン受容体に対して特異性を有するIgM抗リンパ球抗体を投与することを特徴とするウイルス介在疾患、自己免疫疾患または炎症を抑制する方法。

【請求項33】 IgM抗リンパ球抗体を個体に静脈内または筋肉内投与する請求項32記載の方法。

【請求項34】 IgM抗リンパ球抗体に特異的なヒト抗体産生細胞を単離し、該抗体産生細胞によるin vitroでのIgM自己抗体の産生を促進させる請求項32記載の方法。

【請求項35】 抗体産生細胞によるIgM抗体の産生を、ハイブリドーマ技術または細胞培養技術により促進させる請求項34記載の方法。

【請求項36】 ヒトIgMを生成することのできる動物からヒト抗体産生細胞を単離し、該抗体産生細胞によりIgM抗体の産生を促進させることによりIgM抗リンパ球抗体を産生させる請求項32記載の方法。

【請求項37】 抗体産生細胞によるIgM抗リンパ球抗体産生を、ハイブリドーマ技術または細胞培養技術により促進させる請求項36記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

## 発明の分野

本発明は、総じてI g M自己抗体に関し、さらに詳しくは疾患の進行抑制に関する。

**【0002】**

## 従来技術

ケモカインまたは走化性サイトカインは移動細胞を走化的にひきつけることのできる一群のサイトカイン分子である。ケモカインは炎症を起こす病因、すなわち免疫学的、感染性、虚血性、薬剤誘発等に関係なく細胞を炎症部位にひきつけるために必須である。ケモカインは一般に約8～10kDの範囲の小さい分子量を有している。

**【0003】**

多くのケモカインは、ケモカイン分子において2つのシステイン(Cと称する)を分けているアミノ酸(Xと称する)の数に基づいてCC、CXCおよびCXXCの3つの主要なファミリーに分類することができる。CCおよびCXCファミリーの中で、ケモカインはそれらの間のアミノ酸配列の類似性に基づいてさらに関連するサブファミリーに分けられる。CCケモカインサブファミリーは単球走化性誘引物質(chemoattractant)蛋白質(MCP)サブファミリーを含み、このサブファミリーはマクロファージ阻害蛋白質-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ )、マクロファージ阻害蛋白質-1 $\beta$ (MIP-1 $\beta$ )および発現正常T細胞活性化調節物(regulated on activation normal T cell expressed: RANTES)を含む。CXCケモカインサブファミリーはIP-10およびMigサブファミリー;インターロイキン-8(IL-8)サブファミリー;およびPF4サブファミリーを含む。ケモカイン間質細胞誘導因子1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )および間質細胞誘導因子1 $\beta$ (SDF-1 $\beta$ )はCCおよびCXCケモカインファミリーと同様なアミノ酸配列によってほぼ同等に関係したケモカインファミリーを形成する。40近い異なるケモカインが記載され、クローンされており、各々卓越した機能効果を発揮する。例えば、RANTESは炎症部位にTリンパ球をひきつけ、

I L - 8 は典型的に好中球を炎症部位にひきつける。

【0004】

ケモカインはケモカイン受容体に結合することによりそれらの効果を発揮する。C C ケモカインは典型的にはC C R クラス構成メンバーの受容体に結合し、C X C ケモカインは一般にC X C R クラス構成メンバーの受容体に結合する。これらの受容体は炎症の程度および性質を調節するのに重要であり、ある種の受容体はある種の組織および細胞に局在する傾向にある。

【0005】

ケモカイン受容体は、たとえば走化性やウイルス蛋白との相互作用のようなある種の機能と関係している。H I V - 1 ウイルスは細胞表面のある種の蛋白質、すなわちリンパ球のC D 4 抗原に結合することが知られている。しかしながら、このような細胞に入り込んで複製するためには、H I V - 1 ウイルスはもう一つの受容体、すなわち主としてC X C R 4 およびC C R 5 ケモカイン受容体に結合しなければならない。異なるH I V - 1 ウイルスの系統は特殊なケモカイン受容体を使用する。すなわちX 4 ウイルスはC X C R 4 受容体を使用し、一方R 5 ウイルスはC C R 5 受容体を使用する。

ケモカイン受容体を通じてのウイルスの進入は、ウイルスの複製への影響およびH I V - 1 感染後の疾患の進行上極めて重要である。たとえば、ケモカイン受容体の遺伝子欠損を持つ固体はH I V - 1 感染後の潜伏期間が長く、すなわちH I V - 1 のA I D S への進行と関連している。

【0006】

研究者や製薬企業はH I V - 1 ウイルスの複製を抑制するために特殊なケモカイン受容体をブロックもしくは不活性化する戦略を研究し始めたが、これは特に新鮮なヒト血清およびそれらの抗体（免疫グロブリンG（" I g G "）抗H I V - 1 を含む）は直接H I V - 1 ウイルスの細胞を溶解したり中和する活性を持たないからである。これらの戦略の幾つかは、ケモカイン受容体に特異的に結合するペプチドおよびI g G モノクローナル抗体の使用を含んでいる。しかしながら、そのような戦略にはまだ効果が見られていない。

【0007】

正常な（すなわち、非感染の）個体は、血中に循環している低濃度の免疫グロブリンM（"IgM"）抗体を持っていて、この抗体は37℃で細胞溶解を引き起こすことなく、たとえばBおよびTリンパ球のような彼ら自身の白血球に結合する。それゆえ、そのようなIgM抗体は一般的には"抗リンパ球自己抗体"と呼ばれている。これらの抗体はまた、リンパ球に加え貪食細胞および好中球に結合し、さらに自己の白血球に加え同種異系間の白血球にも結合するので、ここでは"IgM抗白血球抗体"または"IgM抗白血球自己抗体"とも呼ばれる。白血球もしくはリンパ球抗原またはIgM自己抗体に結合する受容体については殆ど知られていない。このような抗白血球自己抗体のレベルは、自己免疫疾患および、例えば全身性エリテマトーデス("SLE")、多臓器肉芽腫性疾患、HIV-1、マラリア、Epstein-Barrウイルス("EBV")ならびにサイトメガロウイルス("CMV")のような感染症（すなわち、ウイルス介在疾患）を含む炎症状態において増加する。それゆえ、無症候性のHIV-1に罹っている個体は高レベルのIgM抗白血球自己抗体を持っている。しかしながら本発明者の研究から、ケモカイン受容体はこれらのIgM自己抗体に結合する細胞膜受容体の一つであり、この機構を通して、そのようなIgM自己抗体がHIV-1の細胞感染を抑制することが判る。本発明者の研究からまた、ケモカイン受容体に結合するIgM自己抗体は不均一(heterogeneous)であり、これらの抗体のうちある種のもののみがHIV-1の細胞感染を抑制する能力を持つことが判る。HIV-1の細胞感染を抑制するIgM抗体のレベルは、AIDS患者では非常に低いか、または検出することができない。したがって、無症候性のHIV-1に感染している個体ではHIV-1感染力を抑制するIgM自己抗体のレベルが増加しているのに対し、疾患がAIDSに進行するにつれこれらのレベルは著しく減少する。しかしながら、全体の血清IgMは疾患がAIDSに進行するにつれ減少することはない。

#### 【0008】

リンパ球に結合するIgM自己抗体の生理学的、病理学的機能は、一つにはこれらのIgM自己抗体が認識し、結合する膜受容体について殆どわかっていないために、まだ判っていない。それゆえ、ウイルス感染後のこれらのIgM自己抗

体産生の増大は、単にEBVおよび/またはgp120糖タンパクによるB細胞前駆細胞の直接のポリクローナル活性化に起因する非特異的応答であるのか、または特別の目的すなわち防御抗体として機能するためであるのか、解明されていない。通常のB細胞の中で高い割合(約3~10%)のB細胞がIgM自己抗体を産生するということは、このような増加したIgM自己抗体の産生は特別の目的のためであるという理論を支持している。

#### 【0009】

##### 本発明の概要

非溶菌性のIgM抗リンパ球自己抗体はそれらの受容体へのケモカインの結合を特異的に阻害し、走化性を高めもしくは抑制し、そしてHIV-1の細胞感染を抑制することを見出した。さらに、HIV-1の細胞感染を抑制するIgM自己抗体はAIDS患者で減少するが、無症候性HIV-1に感染した個体または通常の個体においては減少しない。

したがって、本発明の目的の一つはウイルス介在疾患の進行を抑制する方法を提供することである。

本発明の他の目的は、ケモカイン受容体へのケモカインの結合を阻害する方法を提供することである。

本発明の上記および他の目的、利点および特徴は、図面や添付請求の範囲と合わせ、後記する好ましい実施態様の詳細な説明から明らかになるであろう。

#### 【0010】

##### 発明の実施の態様

ここで具体的、概括的に述べたように本発明の目的に従って、前記およびその他の目的を達成すべく、本発明はウイルス感染およびそれによって生じる疾患に対処するためのIgM受容体結合性抗体の発現、刺激および投与に関する。

正常な個体の血中におけるIgM自己抗体は、リンパ球に存在する様々な細胞外受容体に結合することが判っている。そのような受容体としては、これに限られるわけではないが、ケモカイン受容体およびその他のリンパ球表面受容体などがある。代表的なケモカイン受容体は、たとえばCXCR4、CCR5、CCR3、およびCCR2bである。代表的なリンパ球表面受容体は、たとえば糖脂質

受容体が挙げられる。

#### 【0011】

本発明に従えば、正常血清中に存在するIgM抗リンパ球自己抗体はケモカインおよび他のリンパ球表面受容体に結合し、そしてこの機構を通してHIV-1の細胞感染を阻害する。このようなIgM自己抗体は、リンパ球がHIV-1に感染するのを防止する。

正常の、感染していない個体由来のヒト血清は、ケモカインおよび他の白血球表面受容体と反応する低レベルのIgM抗白血球自己抗体を含んでいる。これらの抗白血球抗体は、HIV-1感染後増加し、ウイルスがリンパ球、貪食細胞その他の細胞に侵入するのを制限することによってHIV-1疾患の進行を遅らせる働きをする。IgM抗ケモカイン受容体抗体は37℃では細胞溶解性ではないので、“防御”抗体として機能する。

#### 【0012】

特別の理論にかかわりなく、正常な個体は生まれながらにケモカインおよび他のリンパ球表面受容体に対するIgM自己抗体を生成する能力を持っていると考えられている。これらのIgM自己抗体は、体温（37℃）で補体を活性化することができないのでケモカイン受容体を持つ細胞を損傷しない。また、これらのIgM自己抗体は、不均一で、通常受容体の発現を調整する働きをし、防御的である（すなわち、細胞へのウイルスの侵入を防止する）と考えられている。IgM抗ケモカイン受容体自己抗体の一部はHIV-1の細胞感染を阻害する。さらに、HIV-1感染後のこれらの抗体の増加は、個体が一年以内にAIDSを発症するのを防止すると考えられている。IgMの消耗は、AIDS患者ではHIV-1の細胞感染を阻害するが、無症候性HIV-1に感染した個体では阻害しないが、そのようなIgM自己抗体はウイルス感染またはウイルス介在疾患では疾患の進行を遅らせるのに重要であるということを示している。

#### 【0013】

実験研究

方法 / 操作

株細胞

Sup T-1および Jurkat細胞はC X C R 4 ケモカイン受容体を発現するリンパ腫 T 株細胞である。これらの株細胞はN I HのAIDS Reagent Programから入手した。

HOS-CD4、HOS-CD4-CXCR4およびHOS-CD4-CCR5細胞を作成するために、HOS骨肉腫株細胞はCD4およびCXCR4もしくはCCR5遺伝子を同時形質移入した。ゴースト(g host)CCR5およびゴーストCXCR5は、hGFP作成を推進するHIV-2LTRおよびCCR5もしくはCXCR4遺伝子を同時形質移入したHOS-CD4細胞である。株細胞および形質移入体はN I HのAIDS Reagent Programから入手した。

グリア芽細胞腫株細胞U373-MAGIは、それぞれU373-MAGI-CXCR4およびU373-MAGI-CCR5を作成するためにCD4およびCXCR4もしくはCCR5で同時形質移入した。また株細胞および形質移入体はN I HのAIDS Reagent Programから入手した。

全ての形質移入した株細胞は、これらの受容体の高い発現をもつU373-MAGI細胞で安定してCCR5またはCXCR4を発現する。

#### 【0014】

ヒト末梢血リンパ球("P B L")はI L - 2で活性化されC C R 5の発現を高める。P B L(10%ウシ胎児血清を含むRPMI培地1ml中 $2 \times 10^6$ の細胞)は、まずI L - 2(40unit/ml)および植物性血球凝集素(phytohemagglutinin)("P H A - p", 5mcg/ml)でP B Lを分離したficoll/hypaqueを前処理し、次いで約5%CO<sub>2</sub>中で24ないし48時間37℃で細胞を培養した後P B Lを洗浄することによって活性化される。このようにしてP H A前処理した細胞は、ケモカイン結合アッセイに用いる前に20%ウシ胎児血清およびI L - 2(40unit/ml)を追加して、さらに約6日間成長させる。

#### 【0015】

##### H I V - 1 ウイルス

ゴーストC C R 5を感染するのに用いたR 5 H I V - 1 ウイルスはJohns Hopkins UniversityのDr. Homayoon Garadeganから入手した。ゴーストC X C R 4を感染するのに用いたX 4 ウイルスIIIBおよびR FはN I HのAIDS Reagent Programから入手した。

#### 【0016】

### I g Mの調製および血清

ヒト I g Mは次ぎのところから得た：正常な健康個体の血清由来のアフィニティ精製してプールした I g M ("アフィニティ精製したAccurate I g M" という) はAccurate Chemicals (Westbury, New York) (カタログ番号AI-M02)から入手した；正常な健康個体のプールして加熱(56℃)不活性化した血清をsize exclusion chromatographyで精製した I g M ("正常 I g M" という)、同様にH I V - 1に感染した無症候性患者由来のもの("H I V I g M" という)、A I D Sと診断された患者由来のもの("A I D S I g M" という)；およびE B V形質転換ヒトB細胞クローンの培地上清。size exclusion chromatography (Sephacryl S-300 HR)は低分子量物質(ケモカイン、抗ウイルス薬など)および実験に影響する恐れのある I g G抗H I V - 1抗体を除去するために用いた。

H I V I g Mは7名の抗ウイルス薬を服用していない無症候性H I V - 1感染患者からプールした。H I V - 1感染患者は全員1ml当たり500以上のC D 4陽性細胞および2000以下のDNAウイルス負荷を持っていた。A I D S I g Mは9名の日和見感染症のA I D S患者からプールしたが、1ml当たり150以下のC D 4陽性細胞および抗ウイルス剤投与にもかかわらず10,000以上のウイルス負荷を有していた。6名の正常な健康体由来の正常 I g Mは個別にまたはプールして使用した。図に示したデータは特に記載がなければプールした I g M由来のものである。

### 【0017】

E B V形質転換ヒトB細胞クローンの培地上清は、サイズで蛋白質を分離するSephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフィーによって分離する。ヒトB細胞クローンはS L E患者の血液から分離したBリンパ球から誘導する。B細胞クローンはB細胞をE B Vウイルスで感染させることによって発生させるが、これによりB細胞を不死にし、特殊な抗体すなわち I g Mを分泌させることができるようになる。特に、非T細胞は羊赤血球ロゼット形成技術を用いてT細胞を除いた後P B Lから単離する。約10%ウシ胎児血清を含むR P M I 1640細胞培養培地約0.1ml中の約 $2 \times 10^3$ の非T細胞を96穴(well)プレートの各穴に添加する。次いで各穴には約50ラムダ( $\lambda$ )のE B Vを含んだB95-8株細胞

胞上清を添加する。インキュベーション前に、 $0.05\text{ ml}$ 中の約 $10^4$ のアロジェニック照射した(allogenic irradiated) ( $3,000\text{ rads}$ ) PBLを支持細胞として添加する。プレートは約5%の $\text{CO}_2$ 中37℃でインキュベートする。培地は約4から5日ごとに取り替える。約3から4週間後、B株細胞は穴中で"凝集塊"となった。支持細胞はこの間に死んでしまう。"凝集塊"が現れると、これらの凝集した細胞は24穴プレートに移す。すなわち、1穴の細胞は一つのより大きな穴に移す。培地は、黄色くなった時、通常約3から5日で交換する。約2週間後、上清はIgM抗体をチェックする。好ましい抗体特異性を持つ株を含んだ穴は、さらに96穴プレートで限界希釈でサブクロニングする。約 $10^5$ の支持細胞をこれらの株を含んだ各穴に添加する。上清は望ましい抗体特異性を持ったクローンを単離するために再チェックする。上清は冷蔵するが、IgMが晶出できるように冷凍してはいけない。HIV-1感染を阻害するのに有用なIgM抗体を分泌するクローンは凍結保存する。そのようなクローンからの上清は通常約 $0.5$ から約 $0.7\text{ }\mu\text{g/ml}$ の抗体を含んでいる。特に重要なクローンはK6H6/B5プラズマ細胞腫株細胞と融合し、ハイブリドーマを生成する。クローンは形質移入細胞に存在するCCR5およびCXCR4ケモカイン受容体と反応するクローンを同定し、得るためにスクリーニングを行う。そのようなクローンは、HOS-CD4コントロールに比べ、フローサイトメトリーによってHOS-CD4形質移入体(すなわち、HOS-CD4-CXCR4およびHOS-CD4-CCR5)に結合するIgMが増加している。何らかの混入しているIgGは、蛋白G-Agarose (Sigmaより入手) およびヒツジ抗ヒトIgG (Fc特異的)-Agarose (Sigmaより入手) の両者にさらすことによって血清および培地上清から単離したIgM調製液から取り除かれる。

#### 【0018】

IgMはまたSephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフィーを用いてWaldenstromマクログロブリン血症(B細胞リンパ腫の形態)と診断された患者の血清から得られ、このものは血清蛋白電気泳動でIgMに対して単一のピークを持っている(モノクローナル)。この後者のIgM調製液は、以下"Waldenstrom IgM"という。

## 【0019】

ケモカイン

以下の研究においては4種類のケモカインを使用した。RANTES、SDF-1 $\alpha$ およびビオチンラベルしたSDF-1 $\alpha$ はBecton Dickinson (La Jolla, California)より入手した。放射線ラベルをしたRANTES(以下、“ $^{125}$ I RANTES”または“ $^{125}$ I ”という)は、NEN Life Science (Boston, Massachusetts)より入手した。RANTESはCCR5に結合するが、SDF-1 $\alpha$ はCXCR4に結合する。

## 【0020】

IgG抗体

2種のマウスのIgGモノクローナル抗体、それぞれCXCR4およびCCR5に特異的である12G5および2D7を用いた。12G5はBecton Dickinsonより、2D7はAIDS Reagent Programより入手した。

## 【0021】

細胞に結合するIgMの定量

細胞に結合するIgMの定量にはフローサイトメトリーを用いる。フローサイトメトリーに先だって、まず約 $1 \times 10^5$ の細胞を各々約150 nMの正常IgM、HIV IgMおよびAIDS IgMとともに約4 でインキュベートする。細胞は次いで洗浄し、fluorescein-isothiocyanate("FITC")山羊抗ヒトIgM (Fc特異的)で染色する。ヒト抹消血Tリンパ球へのIgMの結合は2色のフローサイトメトリー、すなわちphycoerytherin("PE")ラベル抗CD3およびFITCラベル山羊抗ヒトIgM (Fc特異的)を用いて定量する。

## 【0022】

細胞膜蛋白に結合するIgM

IgM自己抗体が細胞膜蛋白に結合する場合はウエスタンブロットアッセイを行った。4種のコントロールは、約50  $\mu$ gのU373-MAGIから得た粗膜蛋白を4つの異なるEBV変性B細胞クローンからの上清約100  $\mu$ lと混ぜ合わせて作成する。もう2つのコントロールを、約50  $\mu$ gのU373-MAGIから得た粗膜蛋白を各々約100  $\mu$ lのHIV-1血清およびAIDS血清と混ぜ合わせて作成する。これらのコントロールは、同じ株細胞であって、CXCR4か

またはCCR5を形質移入し、発現していて、同じ方法で調製したものから得た細胞膜蛋白と比較する。

### 【0023】

#### CCR5に結合するI<sup>125</sup> RANTESのIgM阻害

IgMがケモカイン受容体へのケモカインの結合を阻害するかどうかを測定するために様々な研究がなされている。本研究においては、抗CCR5活性を持つIgMが、I<sup>125</sup> RANTESのCCR5への結合を阻害することができるかどうか焦点である。本研究は、アフィニティ精製のIgMおよびEBV変性B細胞クローン、特にCK15からの上清を用いて行う。コントロールはIgMリウマチ因子および精製ヒトIgGを含む上清である。

### 【0024】

第一段階はアフィニティ精製Accurate IgMおよび/またはCK15 IgMがU373-MAGI-CCR5から得た変性していない粗膜蛋白へのI<sup>125</sup>

RANTESの結合を阻害するかどうかを確認することである。ここで、各々アフィニティ精製Accurate IgMおよびCK15 IgMまたは約 $10^{-6}$ から約 $10^{-10}$ の範囲でモル濃度を変化させ、ラベルしたRANTESに比べ500倍のラベルしていないRANTESは約5  $\mu$ gの未変性U373-MAGI-CCR5膜蛋白と約1時間室温でCa<sup>+2</sup>とMg<sup>+2</sup>およびプロテアーゼ阻害剤の存在下インキュベートする。インキュベーションの終りに、約0.25 nMのNEN Life Scienceから入手できるI<sup>125</sup> RANTESを各混合液に添加し、さらに各混合液は室温でもう2時間インキュベートする。次いで、各混合液はガラスフィルター上で濾過し、未結合のI<sup>125</sup>を除去するために3度洗浄する。I<sup>125</sup> RANTESの特異的な結合は、500倍のモル過剰のラベルをしていないRANTESと共に使用したときはI<sup>125</sup> RANTESの1分当りの放射活性のカウント量("c.p.m.")をI<sup>125</sup> RANTESで得られたデータから差し引いて計算する。

### 【0025】

第二番目の段階は、CCR5に結合するI<sup>125</sup> RANTESのIgM阻害をウエスタンブロット法(Western blotting)で検出する。ここで、約250  $\mu$ g

の非変性U373-MAGI-CCR5膜蛋白は、非還元(non-reducing)条件下で、各々約0.1nM正常IgM、350nM IgG、0.4mM非ラベルRANTESおよびコントロール培地と共に室温で約1時間、NEN Life Scienceから入手できるI<sup>125</sup> RANTES約1.0nMを各混合液に添加する前にインキュベートする。約2時間のインキュベーション後、約5nMの架橋剤(cross-linker)(Pierce(Rockford, Illinois)から入手できるBS-3)を、CCR5に結合したI<sup>125</sup> RANTESのアミン残基を架橋するために各混合液に添加する。また、U373-MAGI-CCR5膜蛋白不存在下にI<sup>125</sup> RANTESを使用する。各混合液は次いで12%ゲルSDS-PAGE上で電気泳動を行い、ゲルのX線像を得る。

#### 【0026】

##### 無処置細胞のCCR5に結合するRANTESのIgM阻害

IgMが無処置細胞、例えばU373-MAGI-CCR5EおよびIL-2活性化ヒトリンパ球などに存在するCCR5受容体へのRANTESの結合を阻害するかどうかを調べる。まず約 $1 \times 10^5$ の細胞は、室温で約45分間約10%ウシ胎児血清を含むRPMI培地、約150nMのアフィニティ精製Accurate IgM、約400nMの精製ヒトIgGまたはCK15 IgM約5nM、約1.25nMもしくは約0.45nMとともに、各混合液に約1μgのRANTESを添加する前にインキュベートする。細胞は次いで約90分間4で再度インキュベートし、4で洗浄する。さらに、山羊抗RANTES抗体(R&D製、Minneapolis, Minnesota)を添加し、細胞は約45分間4でインキュベートして洗浄し、次いでFITCウサギ抗山羊抗体で染色する。これらの細胞のCCR5に結合したFITCラベルRANTESの量は、フローサイトメトリーによって分析する。

#### 【0027】

##### 無処置細胞のCXCR4に結合するSDF-1αのIgM阻害

IgMが、無処置 Sup T-1細胞に存在するケモカイン受容体(CXCR4など)へのSDF-1αの結合を阻害するかを調べる。まず約 $1 \times 10^5$ のSup T-1細胞は、室温で約45分間約10%ウシ胎児血清を含むRPMI培地、または約

150 nMの各正常IgM、HIV IgMおよびAIDS IgM、または約5 nMの各Waldenstrom IgMおよびCK15 IgMとともにインキュベートした後、約25 ngのビオチンラベルしたSDF-1 $\alpha$ を各混合液に添加する。次いで細胞は約90分間、4℃で再インキュベートする。再インキュベート後、FITC アビジンを細胞に添加し、さらに細胞を洗浄する。CXCR4に結合したFITCラベル化SDF-1 $\alpha$ の量は、フローサイトメトリーによって分析する。

#### 【0028】

##### ヒトリンパ球に結合する放射線ラベル化IL-2のIgM阻害

CCR5またはCXCR4に結合するケモカインのIgM阻害は実際にケモカイン特異的であるかどうかについてさらに試験を行う。さらにこの試験は、例えば、ここに参考文献として取りこんでいるTeshigawara, K. et. al., J. Exp. Med., 165:223-238(1987)に記載されているような前記の方法を用いてIgMが、ある非特異的な機構により、植物性血球凝集素活性化PBLに存在するIL-2Rに対する放射線ラベル化IL-2の結合を阻害するかを調べるために用いる。特に、3日間植物性血球凝集素活性化したPBL ( $1 \times 10^6$ )をI<sup>125</sup>ラベル化IL-2 (NEN Life Scienceから入手)とインキュベートし、そしてPBLに結合したI<sup>125</sup>ラベル化IL-2は、オイル上にPBLを置きマイクロチューブを遠心分離してセルペレットから未結合のI<sup>125</sup>ラベル化IL-2を分離して定量する。I<sup>125</sup>の放射活性はセルペレット中で定量する。これらの方法で、I<sup>125</sup>ラベル化IL-2添加前は、PBLはそれぞれ過剰のラベル化していないIL-2 (2.0 mCM)、プールしたヒトIgG (300 nM)、IgMリウマチ因子およびアフィニティ精製Accurate IgM (100 nM)と相互作用している。

#### 【0029】

##### 走化性アッセイ

走化性アッセイは、それぞれ正常IgM、HIV IgM、AIDS IgMおよびWaldenstrom IgMについて約20 nM、約40 nM、約100 nMおよび約200 nM IgMの濃度で5ミクロンのポリカーボネートフィルターのある24穴Costar トランスウエル(transwell)組織培養insertを用いて行った。各ア

ッセイでは、I g Mは約5 %ウシ胎児血清を含む約0.1 ml RPM 1中に約 $2 \times 10^4$  Jurkat細胞を含んだ上方のトランスウエルに載せた。約30分後に、約50 ngのSDF-1 $\alpha$ を、上方の穴と同じ培地約0.6 mlを含む下方の穴に添加する。4時間後、下方の穴に移した細胞はフローサイトメトリーでカウントする。走化性インデックス(“CI”)は、SDF-1 $\alpha$ の存在化に移した細胞の全数をSDF-1 $\alpha$ の不存在化に移した細胞の数で割って計算する。SDF-1 $\alpha$ 単独(すなわち、I g Mなしで)の走化性インデックスのベースラインは約3.1である。

#### 【0030】

##### 細胞質ゾルCa<sup>+2</sup>フラックスの測定

細胞質ゾルCa<sup>+2</sup>フラックス(flux)のアッセイは、例えば、ここに参考文献として取りこんでいるHaverstick, G., MD, Molecular Biol. Of Cell. 4:173-184(1993)に記載されているような公知の方法を用いて行う。一つのアッセイ法では、約45 nMのHIV I g Mを約20秒の時間でJurkat細胞に添加する。約60秒後、約100 ngのSDF-1 $\alpha$ を添加し、SDF-1 $\alpha$ 添加後の細胞質ゾルCa<sup>+2</sup>の変化の大きさを測定する。二番目のアッセイはHIV I g Mの代わりに約45 nMのAIDS I g Mを用いて行う。三番目のアッセイはI g Mを添加せずに、SDF-1 $\alpha$ を約80秒の時間で添加する。

#### 【0031】

##### I g M抗白血球抗体の細胞溶解性効果に対する温度依存性

I g M抗白血球抗体の細胞溶解性効果に対する温度依存性は補体依存microlymphocytotoxicity アッセイ法により測定する。種々の希釈度のI g M抗体を1時間 $2 \times 10^5$ のPBLまたはIL-2活性化PBL(7日)と反応させ、補体源として新鮮なウサギ血清を添加する。約2時間後、細胞は2度洗浄し、trypan blueを添加して、ブルーに染まる死んだ細胞をカウントする。実験は15 および37 で行う。

#### 【0032】

##### 細胞のHIV-1感染のI g M阻害

HIV-1 R5ウイルスは細胞に進入するのにCCR5受容体を利用するが

、H I V - 1 X 4 ウイルスはC X C R 4 受容体を利用することがわかっている。それゆえ、このような観察に照らしてI g MがH I V - 1 感染を阻害するかどうかについて研究を行った。

これらの研究では、ゴーストC C R 5 およびゴーストC X C R 4 形質移入株細胞をH I V - 1 で感染させる。ゴースト細胞はC C R 5 またはC X C R 4 遺伝子を形質移入したH O S 細胞およびh G F P constructを推進するH I V - 2 L T R も一緒に形質移入したH O S 細胞から導いた。h G F P constructはH I V - 1 ウイルスに感染した細胞にグリーンの蛍光を放出させることができるので、感染した細胞の数をフローサイトメトリーを用いて定量することができる。これらの株細胞は、一回の(single-cycle)ウイルス複製が4 8 時間以内に検出できるので特にこれらの研究に適している。

#### 【0033】

それぞれ約 $2 \times 10^4$ のゴーストC C R 5 およびC X C R 4 細胞は、別々に約12時間、12穴プレートで約10%ウシ胎児血清を含むR P M 1 培地約1 m l 中で培養する。次いでR 5 H I V - 1 ウイルスをゴーストC C R 5 にそしてX 4 H I V - 1 ウイルスをゴーストC X C R に添加する約30分前に、正常I g MをそれぞれゴーストC C R 5 およびC X C R 4 細胞に添加する。ウイルスおよび抗体の両者は48時間の培養期間中存在している。細胞へのウイルスの侵入を高めるためにポリブレン(polybrene)は使用しない。同様にして、まず正常I g MをH I V I g Mに代え、次にA I D S I g Mに代えて試験を2度繰返す。

48時間のインキュベーション後、細胞は回収し、ホルマリンで固定した。グリーンの蛍光を発する感染細胞はフローサイトメトリーで数える。

さらに、ウイルスまたはI g M抗体をゴースト細胞のインキュベーション後約4時間で洗浄すると同様のデータが得られた。

#### 【0034】

##### 結果

種々の試験結果はI g M自己抗体がリンパ球や他の細胞に存在するケモカイン受容体に結合することを示している。結果はまた、I g M自己抗体の結合はケモカイン受容体に対して特異的であることを示している。

## 【0035】

細胞および細胞膜蛋白へのIgMの結合

上記研究からのデータは、IgM自己抗体が正常リンパ球および悪性細胞に存在する受容体に結合することを示している。図1Aおよび1Bから判るように、正常IgM、AIDS IgMおよびHIV IgMは、Sup T-1 (図1A) およびゴーストCD4 - CXCR4細胞 (図1B) に結合するIgM抗体を含んでいる。図1Dおよび1Eに見られるように、正常IgMは末梢血から単離したTリンパ球 (図1D) および末梢血から単離した好中球 (図1E) に結合する抗体を含んでいる。各図におけるネガティブコントロールはIgMを加えずに種々の細胞をインキュベートしたことを示している。

図1Fおよび1Gでは、IgM自己抗体は幾つかの細胞膜蛋白に結合することを示している。しかしながら、IgMはさらにCCR5 ( " CCR5 " ) およびCXCR4 ( " CXCR4 " ) のcDNAで形質移入した株細胞に存在する48kD蛋白に結合する。48kDの膜蛋白はCXCR4およびCCR5受容体の分子量に類似しており、それゆえこれはIgMが形質移入された細胞に存在していたケモカイン受容体にも結合することを意味している。IgM抗体は多反応性(polyreactive)であることが、特にWestern blotアッセイにおいて知られているので、IgMはいくつかの膜蛋白質に結合することができる。したがって、他のアッセイ系、すなわち特異的な方法でIgMがケモカインの受容体への結合を阻害し、そしてケモカイン受容体の機能を変えるかどうかを評価するアッセイ法を用いてケモカイン受容体に結合するより詳しいIgMの特異性を調べた。

## 【0036】

受容体に結合するケモカインのIgM阻害

IgM自己抗体はCCR5受容体に対する放射線ラベル化RANTESの結合を阻害するが、IL-2受容体 (すなわち、IL-2R) に対する放射線ラベル化IL-2の結合は阻害しない。このことはIgM介在阻害がケモカインに実際に特異的であるという概念を支持している。さらに、正常IgGは放射線ラベル化RANTESのCCR5受容体への結合を阻害しない。

アフィニティ精製Accurate IgMおよび/またはCK15 IgMがU373

- M A G I - C C R 5 E から得られた非変性の粗膜蛋白に対する  $I^{125}$  R A N T E S の結合を阻害するかどうかを調べるために行った最初の研究から得られた主なデータは図 2 A に示している。この図から判るように、アフィニティ精製 Accurate I g M および C K 1 5 I g M の両方とも C C R 5 への  $I^{125}$  R A N T E S の結合をドーズ(dose)に依存して阻害している。プールした正常 I g G および I g M リウマチ因子は  $10^{-6}$  M で使用しても C C R 5 への  $I^{125}$  R A N T E S の結合を阻害しない。ラベルしていない R A N T E S はドーズ依存的に 0 . 0 9 5 n M の  $K_D$  ( $K_D$  of 0.095nM) と結合する  $I^{125}$  R A N T E S を阻害した。

#### 【 0 0 3 7 】

Western blotting によって検出した C C R 5 に対する  $I^{125}$  R A N T E S の結合の I g M 阻害は図 2 B に示す。図より、アフィニティ精製 Accurate I g M およびラベルしていない R A N T E S は C C R 5 に対する  $I^{125}$  R A N T E S の結合を阻害する。プールしたヒト I g G も R A N T E S 蛋白コントロールもどちらも C C R 5 に対する  $I^{125}$  R A N T E S の結合を阻害しない。この後者の結果は C C R 5 に対する  $I^{125}$  R A N T E S 結合の I g M 阻害は受容体遮断の結果であり、C C R 5 に対する特異性を持つ I g M に特異的なものであることを示している。

I g M が無処置の細胞に存在する受容体への結合からケモカインを阻害するかどうかを調べるために、非活性化リンパ球に比べより多くの C C R 5 受容体を発現する I L - 2 活性化リンパ球を用いてさらなる研究を行った。図 2 C に示したように、約 2 2 . 4 5 % の I L - 2 活性化リンパ球が R A N T E S に結合した。約 5 n M の C K 1 5 I g M の存在下では、結合は減少し、R A N T E S に結合するリンパ球は約 6 . 8 % であった。C K 1 5 I g M が少ない程阻害も少なくなる。図 2 D に示したように、アフィニティ精製 Accurate I g M は無処置の U 3 7 3 - M A G I - C C R 5 E 細胞への R A N T E S の結合を阻害したが、ヒト I g G は阻害しなかった。

#### 【 0 0 3 8 】

図 3 A より、正常 I g M および H I V I g M はビオチン S D F - 1  $\alpha$  の結合

を抑制するが、AIDS IgMは抑制しない。IgMおよびSDF-1 $\alpha$ なしで細胞のバックグラウンドの蛍光を示すためにネガティブコントロールを用いる。"SDF"はIgM不存在下でのSDF-1 $\alpha$ の結合を示している。Sup T-1細胞の一部(15%)がビオチンSDF-1 $\alpha$ へのはるかに強い結合を持っていたことに注意すべきである。図3Bより、Waldenstrom IgMはSup T細胞へのSDF-1 $\alpha$ の結合を阻害したが、CK15 IgMは阻害しなかった。

ケモカインの受容体への結合のIgM阻害が実際にケモカインに特異的であるかどうかを調べる更なる研究結果は、I<sup>125</sup>でラベルしたIL-2がラベルしていないIL-2(>90%)および抗TAC(抗IL-2RマウスIgG抗体)によって阻害されるが、100nMで使用してもプールしたヒト、アフィニティ精製Accurate IgMによっては阻害されないことを示している。結果を下記表1に示す。

【0039】

【表1】

表1

活性化PBLでのI<sup>125</sup>ラベル化IL-2のIL-2Rに対する結合阻害

|              | PBMCへ結合した特異的I <sup>125</sup> IL-2(cpm) |
|--------------|----------------------------------------|
| コントロール培地     | 9,468                                  |
| ヒトIgG        | 8,293                                  |
| ヒトIgM        | 8,809                                  |
| マウス抗TAC      | 1,948                                  |
| ラベルしていないIL-2 | 2,353                                  |

【0040】

上記の結果は、それゆえ、正常IgMおよびHIV-1 IgMによるSDF-1 $\alpha$ のCXCR4に対する結合の阻害は特異的であることを示している。正常IgMおよびHIV-1 IgMを用いた時のビオチンSDF-1 $\alpha$ 結合の阻害を示すデータは、AIDS IgMはSup T-1細胞に同様に結合するが、SDF-1 $\alpha$ の結合を阻害しないので(図1A参照)、立体障害に基いては説明すること

はできない。同様に、図2および図3Bのデータは、明確にモノクローナルIgMによる受容体に対するケモカインの阻害はWaldenstrom IgMが完全にCXCR4に対するSDF-1 $\alpha$ の結合を阻害したように実際に特異的であることを示している。CCR5に対するRANTESの結合を阻害したCK15 IgMはCXCR4に対するSDF-1 $\alpha$ の結合を阻害しなかった。特別の理論に拘らずに可能な説明としては、IgM抗白血球自己抗体が不均一(heterogeneous)であってケモカイン受容体の異なるエピトープを認識することが考えられる。したがって、走化性アッセイで得られたデータから明らかなようにAIDS IgMはケモカイン受容体に結合するけれども、SDF-1 $\alpha$ の結合を阻害するIgM抗体の一部を欠いていると考えられる(以下に詳述する)。

#### 【0041】

##### 走化性および細胞質ゾルCa<sup>+2</sup>に関するIgMの効果

IgMの不均一性の可能性はSDF-1 $\alpha$ に誘発された走化性(図4Aおよび4B)および細胞内Ca<sup>+2</sup>流動(図4C)の機能アッセイで解析する。

図4Aは走化性により下方の穴(bottom well)に遊走(migrate)した細胞を視覚的に示すための他の実験のフローサイトメトリーデータを示したものである。数える細胞は細片のカウントを防止するためゲートを設けている。SDF-1 $\alpha$ の不存在下で全てのIgM調製液は走化性のベースラインに影響を与えなかった。しかしながら、SDF-1 $\alpha$ の存在下では、Jurkat細胞を種々のIgM調製液で前処理すると走化性に影響を与えた。特に、図4Bに見られるように、全てのプールしたIgM調製液は走化性を高め、AIDS IgMでは最も高められた。上方の穴にIgMを添加した後の下方の穴への遊走の高揚は、走化作用に誘発された遊走によって媒介されたものであり、500 ngのSDF-1 $\alpha$ を上方のトランスウェルに添加するとこの遊走の高揚が阻害されたので何らかの非特異的な過程によるものではない。SDF-1 $\alpha$ 存在下におけるコントロールCIは約2.8である。Waldenstrom IgMは走化性を抑制した(CI=約1.1)。CK12 IgMおよびCK15 IgMは走化性を緩やかに高め、CIは約5.3から約7.1の間で変化した。これはSDF-1 $\alpha$ 単独で観測されたもの(CI=3.1)より有意に大きい。

## 【0042】

これらの観測からJurkat細胞に存在するC X C R 4受容体にケモカインが結合する時に生じる細胞質ゾルC a <sup>+</sup>2の変化にI g Mが同様に影響を与えるかについての試験を行った。3種のそのような試験の主要なデータを図4Cに示したが、ここで記号ΔはS D F - 1 α添加後の細胞質ゾルC a <sup>+</sup>2の変化の大きさを示す。トレースAはA I D S I g MについてのJurkat細胞を示す；トレースCはH I V I g MについてのJurkat細胞を示す；そしてトレースBはI g MなしでのJurkat細胞を示す。図4Cより、S D F - 1 αが存在しないと（すなわち、S D F - 1 α添加前）I g M抗体のいずれも細胞内C a <sup>+</sup>2の増加を起こさない。トレースAはA I D S I g MがS D F - 1 αに応じて細胞内C a <sup>+</sup>2の増加を高めることを示している。トレースCはH I V I g Mでは高揚が起こらないことを示している。

これらのC a <sup>+</sup>2フラックスアッセイにおけるC X C R 4とのI g M相互作用の特異性はJurkat細胞に存在する他の受容体、すなわちC D 3受容体についての同様の研究を行うことによって確認できる。細胞質ゾルC a <sup>+</sup>2の高揚はC D 3をO K T 3、マウスI g G抗C D 3抗体で刺激する前にA I D S I g Mを添加しても観測されない。このようなデータは、C X C R 4受容体に結合するI g Mの特異性を支持する更なる証拠を提供する。さらに、これらの発見は、ケモカイン受容体に結合した後走化性とC a <sup>+</sup>2フラックスを著しく高めるI g Mを含んでいるA I D S I g Mについて、I g M抗リンパ球自己抗体の機能的不均一性の概念を明確に支持している。

## 【0043】

I g M抗リンパ球抗体の37 °での非細胞溶解性

アッセイを15 °で行うと約40から60%の細胞溶解が観測された。ケモカイン受容体の発現が増加しているI L - 2活性化リンパ球ではより高いレベルでの細胞溶解が見られた。約1 . 0 μ g以上の量を使用するとアフィニティ精製Accurate I g Mは細胞溶解を起こしたが、C K 1 5は約5 n g以上の濃度で細胞を溶解した。しかしながら、アッセイを37 °で行うと細胞溶解は約10%以下であり、溶解のレベルは体内でインキュベートしたコントロール細胞と同様であ

った。これらの観測は、I g M抗リンパ球自己抗体は低い温度では細胞溶解性であるが、37℃では細胞溶解性でないということを明確に示している幾つかのレポートと一致している。

#### 【0044】

##### 細胞のH I V - 1感染に与えるI g Mの効果

I g M抗ケモカイン受容体自己抗体はH I V - 1感染に対する抵抗に寄与する。図5 A - 5 Cは、ゴースト細胞のH I V - 1感染に関する種々のI g M抗体の影響を示す。最初の図5 Aは、ゴーストC C R 5細胞におけるH I V - 1感染性のI g Mによる阻害%を示すものであるが、正常I g MおよびH I V I g MはH I V - 1感染を阻害することがわかる。A I D S I g Mでは阻害効果は見られないか、最小である。5人の個体の正常血清および1ヒトのH I V血清から単離したI g Mを使用すると同様の観測結果が見られる。

興味深いことにプールした正常血清のI g Mは、R 5ウイルス8442およびX4ウイルスR FによるH I V - 1感染を部分的に阻害し(約40から50%阻害)、このことはウイルスと抗体が結合するエピトープの差が阻害の程度に影響している可能性を示唆している。

I g G抗体2D7、マウス抗C C R 5抗体は、約100 nMで使用すると3種のR 5ウイルスのうち(すなわち、8379と8442は阻害したが8658は阻害しなかった)2種の感染を阻害した(約80%)。

加熱不活性化(56℃)正常ヒト血清を培養液中最終濃度約8から15%(vol/vol)で使用するとH I V - 1感染に対する同様の阻害活性が得られた。約15%のプールしたヒト血清を含む培地は約168 nMのI g Mを持つと計算された。抗ウイルス剤またはI g G抗H I V - 1抗体が存在するとデータは解釈できなくなるのでH I V - 1血清およびA I D S血清は使用していない。H I V - 1感染の阻害は正常ヒトI g Gまたはアルブミンではこのアッセイ系においては検出されていない。これらのデータは、正常I g MおよびH I V I g MがnM量で使用すると高ドーズのウイルスが用いられても、すなわち1サイクルの複製で約8から20%の細胞を感染するのに十分なドーズであっても、ある種のH I V - 1ウイルス株のH I V - 1感染を阻害することを示している。

幾人かの研究者は正常ヒト血清はHIV-1ウイルスに対しては直接の中和活性を持たないことを示している。他の研究者は正常血清に存在するIgM抗TatおよびIgM抗gp120はHIV-1中和活性を持たないことを示している。このことは、IgM介在のHIV-1感染阻害が、ここで観察されたように、ケモカイン受容体およびHIV-1の細胞への侵入に重要でリンパ球に存在しているリンパ球表面受容体に対するIgMの反応性により媒介されているという考えを支持している。

#### 【0045】

上記したように種々の研究の結果は、血清から精製したIgMが細胞のHIV感染を阻害することを示している。精製IgMは、HIV-1の細胞への侵入に重要である受容体に対するIgMの結合を通じてHIV-1感染の阻害を媒介する。そのような受容体としては、これらに限られないが、CXCR4およびCCR5受容体が挙げられる。正常血清由来のIgMは直接の抗ウイルス中和効果を持たないが、HIV-1感染についてのたいていの阻害効果を持っている。AIDS血清由来の精製IgMはHIV-1感染には効果がないか、効果は最小であるが、AIDS IgMはゴースト細胞およびT株細胞に結合し、SDF-1によって誘発された走化性と細胞質ゾル $Ca^{+2}$ を高める。IgM結合とHIV-1感染阻害に関し、正常IgMおよびHIV-1 IgMとの、さらにAIDS IgMとの間で観測された差のもっともらしい説明としては、正常IgMおよびAIDS IgMはIgM抗リンパ球抗体の異なる機能効果を与える異なった結合エピトープを持った不均一な基を含んでいる。

結果は、無処理の細胞でSDF-1 $\alpha$ の結合を阻害するIgM抗体が多分HIV-1感染を阻害するIgM抗体と同じであることを示唆している。AIDS IgMはIgM抗リンパ球抗体の一部を欠くようである。

異なるエピトープに結合するIgM自己抗体の2番目のサブセットは、SDF-1 $\alpha$ に応じて $Ca^{+2}$ フラックスを高め、走化性を高める。この自己抗体の2番目のサブセットは、全ての血清（すなわち、正常、HIV-1およびAIDS）由来のIgMに存在するようであるが、AIDS IgMに最も多い。IgM抗ケモカイン受容体抗体の2番目のサブセットは、走化性を容易にするので炎症

状態の影響により重要である可能性がある。

【0046】

本発明に従えば、I g M抗リンパ球自己抗体はH I V - 1 ウイルスの細胞への侵入を抑制し、そしてこれらの抗体は体温では細胞を溶解することなくケモカインおよび他のリンパ球表面受容体に結合するので潜伏期間を長引かせる。ここで示した結果は、疾患のA I D Sへの進行がI g M抗リンパ球自己抗体、特にH I V - 1の細胞への侵入を阻害する抗体のサブセットの著しい減少と関係していることを示している。

特定の理論にかかわらず、無症候性状態の間ケモカイン受容体に対する良好なレベルのI g M自己抗体が存在するにもかかわらず、H I V - 1 ウイルスが細胞へ侵入することとウイルスの複製が増えることに対して幾つかの説明が可能である。そのような一つの説明として、I g M抗体の結合の低結合活性とウイルス負荷のあいだの微妙なバランスが存在する可能性がある。個体を増加したウイルス負荷に感染しやすくするまたはI g M自己抗体を分泌するB細胞を阻害する因子ウイルスの細胞への侵入および疾患の進行を導く。またC D 4、C X C R 4およびC C R 5受容体を発現する上記B細胞のサブセットはI g M自己抗体を分泌するものと同じサブセットである可能性がある。何年にもわたって、このB細胞サブセットは消耗しまたはH I V - 1に感染し、それにより抗体産生の減少に導くのかかもしれない。さらに、ウイルス負荷を減少させる他の主な因子(例えば、抗ウイルスI g G抗体、ケモカイン、補体および細胞障害性T細胞)の重要性を強調することはできない。これらの宿主防御機構の乱れがウイルス負荷の増加を導くかもしれない。

【0047】

第2番目に、本研究の幾つかで示したように、あるH I V - 1感染個体において、I g M抗リンパ球抗体はある種のH I V - 1ウイルス体の侵入を部分的にのみ防止するかもしれない。この後者の機構はI g M抗ケモカイン受容体自己抗体が存在するにもかかわらず疾患が進行することに対してもう一つの説明を提供するかもしれない。

C C R 5に対する特異性を持つI g M自己抗体がC C R 5に対するR A N T E

Sの結合を阻害し、貪食細胞向性HIV-1ウイルスの複製を阻害することは、これらのIgM抗白血球抗体によって媒介された防御的機能に対する前提を支持する。特にHIV-1ウイルスに保たれている中和エピトープに反応するヒト抗体を単離することは困難であるので、HIV-1感染を減らすために（すなわち、受容体の遮断を通じて）ヒトIgM抗白血球抗体を使用することは受動的免疫化のもう一つのアプローチである。広範な範囲のケモカインおよびリンパ球に存在する他の受容体に対して反応性を持つIgMが関与する受容体の遮断は、HIV-1ウイルスが使用する受容体を、例えばCCR5からCXCR4へのように変えるような状況下では特に有用かもしれない。そのような防御抗体の増加したレベルを維持すると、またHIV-1感染後の潜伏期間を伸ばすことができるかもしれない。

#### 【0048】

IgM抗体の源は異種性、自家性またはアロジェネックかもしれない。ケモカインおよび白血球上の他の受容体に対する特異性を持つIgM抗体はin vivo（すなわち、マウスまたは他の動物で、またはヒトで）で、または細胞培養技術を用いてin vitroで高められるかもしれない。

例えば、IgM抗体はIgM抗リンパ球抗体に特異的な遺伝子を抗体産生細胞に取込む遺伝子技術によってin vivoまたはin vitroで産生できるかもしれない。これらの抗体産生細胞は次いで感染したヒトまたは免疫欠損動物に導入し、そこで細胞にIgM抗体を産生させてもよい。別の方法としては、抗体産生細胞はハイブリドーマまたは他の技術を用いてin vitroで成長させてもよい。

ケモカイン受容体に対して特異性を持つIgM抗体は、またIgM抗体に対して特異的であるヒト抗体産生細胞を単離し、ハイブリドーマまたは動物もしくは人間に細胞を導入することを含む他の技術を用いてそのような細胞による抗体産生を高めることによって製造できるかもしれない。例えば、ヒトのリンパ球を免疫欠損マウスに移殖し、そしてリポポリサッカライド（“LPS”）のようなB細胞を活性化する試薬でリンパ球を刺激してもよい。

IgM抗体を製造するもう一つの方法は、例えばXenoMouse™のような動物からヒトIgMを産生することができるヒト抗体産生細胞を単離することによる。

そのような細胞による I g M 抗体の産生は、ハイブリドーマまたは例えば単離したリンパ球を L P S もしくは細胞を活性化する E B V ウイルスなどの他の試剤で刺激するというような他の技術を用いて in vitro で高められるかもしれない。

I g M 抗体は、個体からリンパ球を取り出し、次いで E B V ウイルスで遺伝子変化を起こさせて培養することにより in vitro で製造できるかもしれない。これらの E B V で遺伝子変化を起こさせた B リンパ球のサブセットは I g M 抗体を分泌し、得られた培養液がこれらの抗体を含んでいる。

さらに、ウイルス、バクテリアおよび他の抗原（例えば、分裂促進因子）は in vivo で B 細胞を刺激して白血球に対する I g M 抗体を産生させるのに用いられるかもしれない。

感染個体の外部で製造された I g M 抗体は、これに限られるわけではないが静脈注射および筋肉内投与を含むいくつかの投与ルートの一つによって個体に導入できる。代表的な実施態様および詳細に関して本発明を十分に記載したので、ここに述べたように本発明の精神および範囲から離れることなくそれに加えて変更および修飾が出来ることは当業者にとって明らかである。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1 A】 図 1 A は S u p T - 1 細胞に対する正常な I g M、H I V I g M および A I D S I g M の結合を示すグラフである。

【図 1 B】 図 1 B はゴースト C X C R 4 細胞に対する正常な I g M、H I V I g M および A I D S I g M の結合を示すグラフである。

【図 1 C】 図 1 C はサイズによって分離された、ヒトの血液から由来するリンパ球および好中球を示すフローサイトメトリー（F A S C A N）ドットプロットである。

【図 1 D】 図 1 D は末梢血球から由来するヒト T リンパ球に対する正常な I g M の結合を示すグラフである。

【図 1 E】 図 1 E は末梢血球から由来するヒト好中球に対する正常な I g M の結合を示すグラフである。

【図 1 F】 図 1 F は U 3 7 3 - M A G I 細胞および C X C R 4 または C C R 5 でトランスフェクトされ、それを発現している同細胞から得られた細胞膜蛋

白質に結合するIgMを示すウェスタンブロットアッセイである。

【図1G】 図1Gは図1Fと同様なウェスタンブロットアッセイである。

【図2A】 図2Aは液体シンチレーションによって定量された変性U373-MAGI-CCR5E膜蛋白質中に存在するCCR5に結合するI<sup>125</sup>R ANTESのアフィニティー精製精密 (Accurate) IgM阻害を示すグラフである。

【図2B】 図2Bは変性U373-MAGI-CCR5E膜蛋白質に存在するCCR5に結合するI<sup>125</sup>R ANTESのアフィニティー精製精密IgM阻害を示すウェスタンブロットアッセイである。

【図2C】 図2CはIL-2-活性化ヒトリンパ球に結合するRANTESのCK15IgM阻害を示すドットプロットFACSCANディスプレイを示す。

【図2D】 図2Dは無傷U373-MAGI-CCR5E細胞に結合するRANTESのアフィニティー精製精密IgM阻害を示すグラフである。

【図3A】 図3Aは無傷SupT-1細胞上のCXCR4に結合するSDF-1 $\alpha$ のAIDSおよびHIV-1 IgM阻害を示すグラフである。

【図3B】 図3Bは無傷SupT-1細胞上のCXCR4に結合するSDF-1 $\alpha$ のIgM阻害を示す別のグラフである。

【図4A】 図4Aはジャーカット細胞の下部ウエルへのSDF-1 $\alpha$ 誘発走化性を定量するドットプロットを例示するFACSCANである。下のパネルは、AIDS IgMを上部トランスウエル (transwell) に添加した場合の下部ウエルへの移動の促進を示す。

【図4B】 図4Bはジャーカット細胞のSDF-1 $\alpha$ 誘発走化性に対するAIDS IgM、HIV IgM、正常IgMおよびワルデンストレームIgMの影響を示すグラフである。

【図4C】 図4Cはジャーカット細胞の細胞質ゾル内Ca<sup>+2</sup>のSDF-1 $\alpha$ 誘発変化に対するIgMの影響を測定したグラフである。トレイスAはAIDS IgMおよびSDF-1 $\alpha$ の影響を示し、トレイスBはSDF-1 $\alpha$ のみの影響を示し、トレイスCはHIV IgMおよびSDF-1 $\alpha$ の影響を示す。

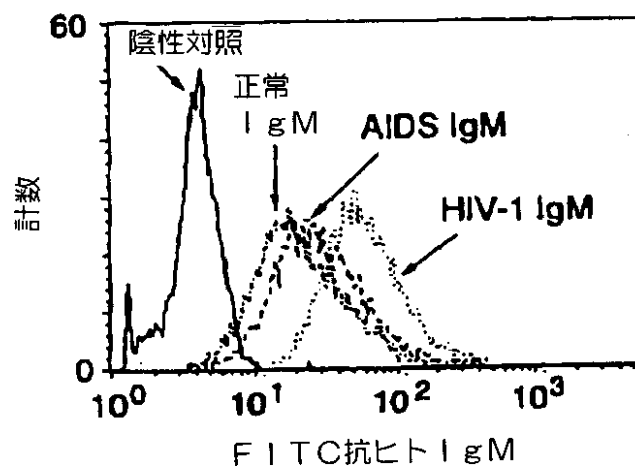
【図5A】 図5AはR5ウイルス8658のゴーストCCR5細胞感染に対する正常、HIVおよびAIDS血清からのIgMの阻害効果を示す。

【図5B】 図5BはX4ウイルスIIIBのゴーストCXCR4細胞感染に対する正常、HIVおよびAIDS血清からのIgMの阻害効果を示す。

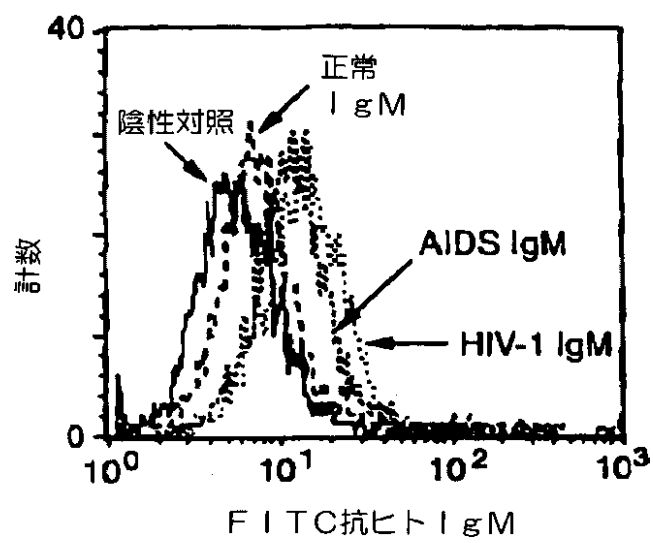
【図5C】 図5CはR5ウイルス8658のゴーストCCR5細胞感染に対する正常IgMの阻害効果を例示するフローサイトメトリードットプロットである。真中のドットプロットは約17.5%のゴーストCCR5細胞が感染し、感染細胞は、それらの細胞が放射する緑色蛍光によって同定した。

【図1A】

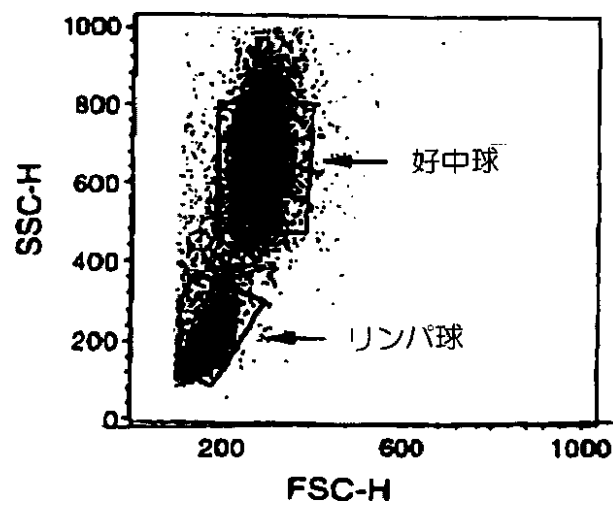
**FIGURE 1A**



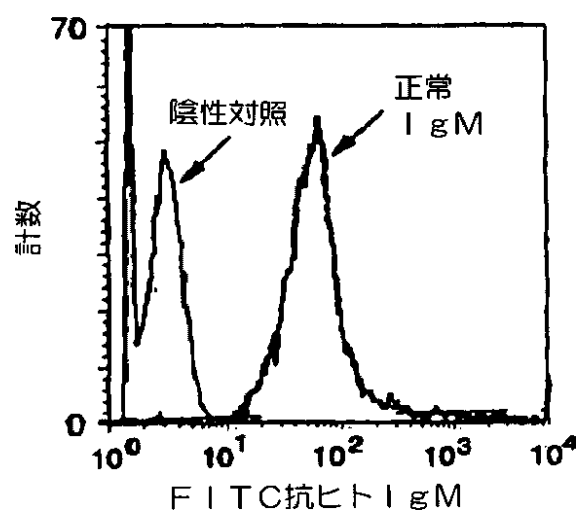
【図1B】

**FIGURE 1B**

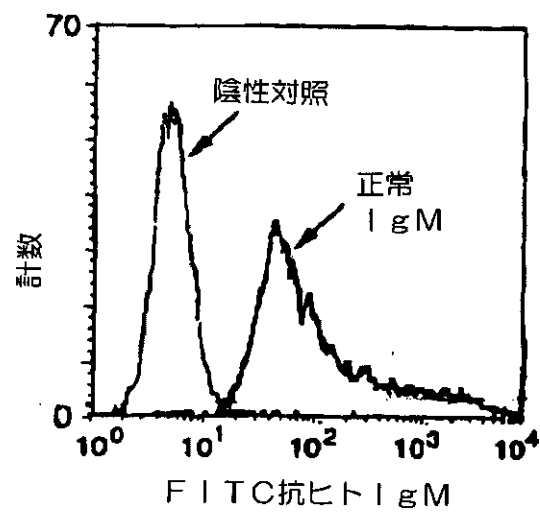
【図1C】

**FIGURE 1C**

【図1D】

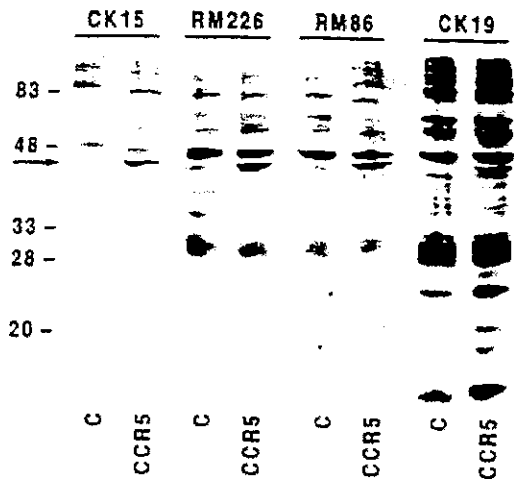
**FIGURE 1D**

【図1E】

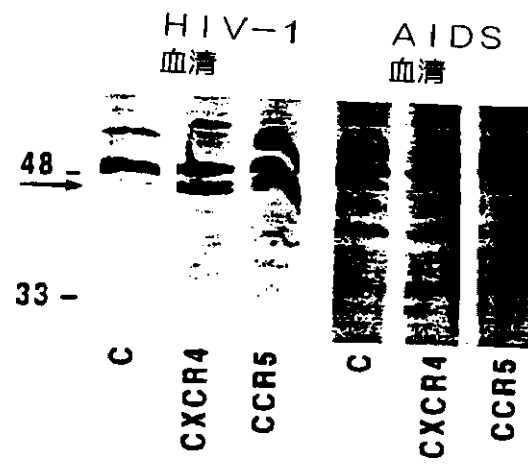
**FIGURE 1E**

【図1F】

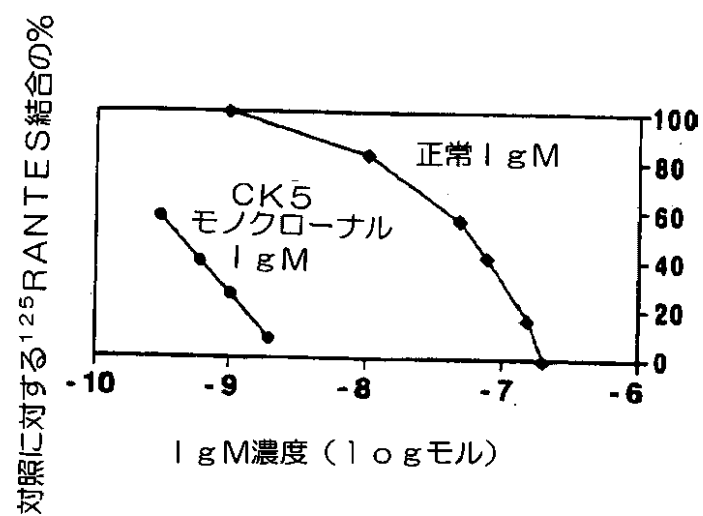
FIGURE 1F



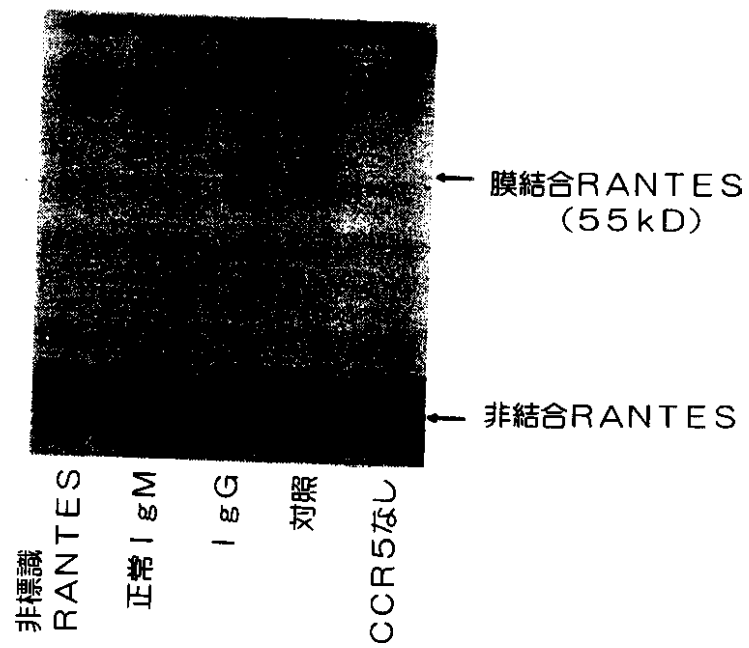
【図1G】

**FIGURE 1G**

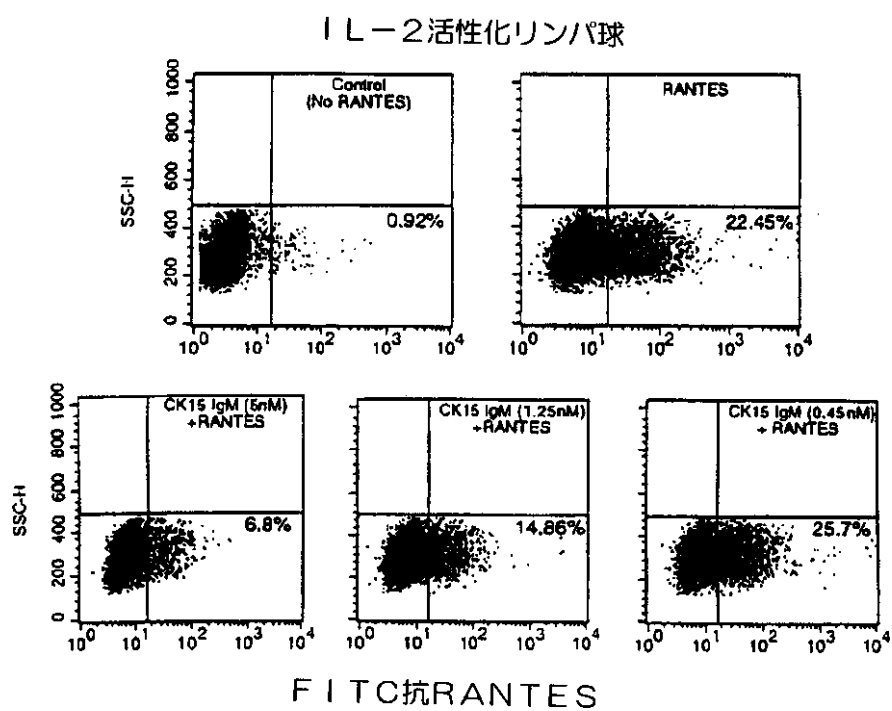
【図2A】

**FIGURE 2A**

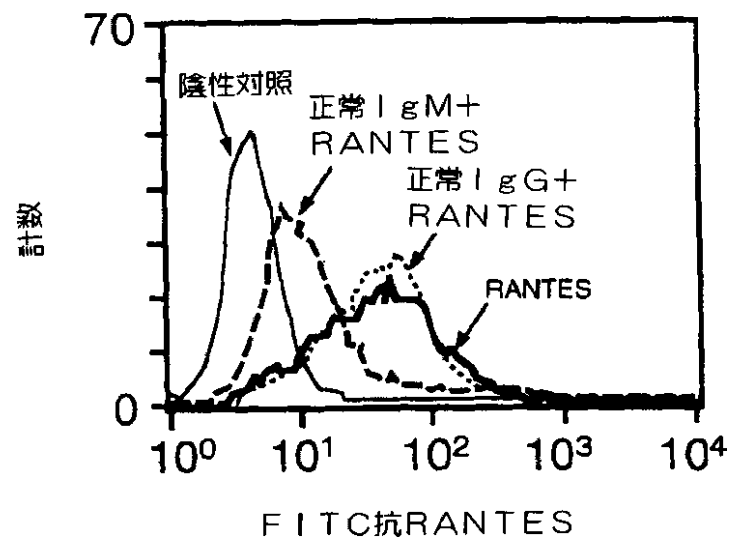
【図2B】

**FIGURE 2B**

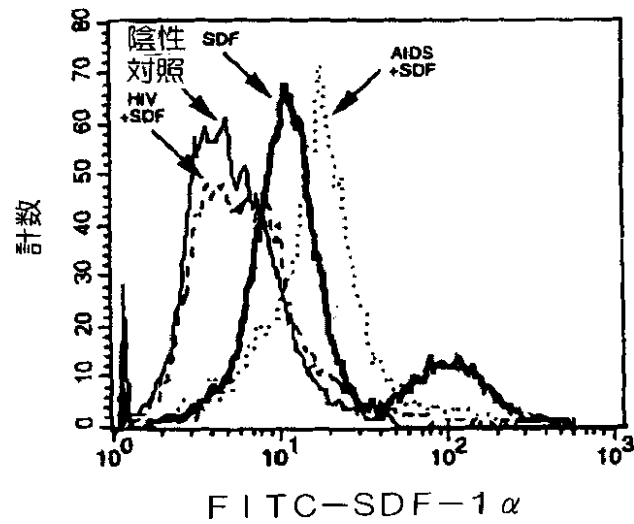
【図2C】

**FIGURE 2C**

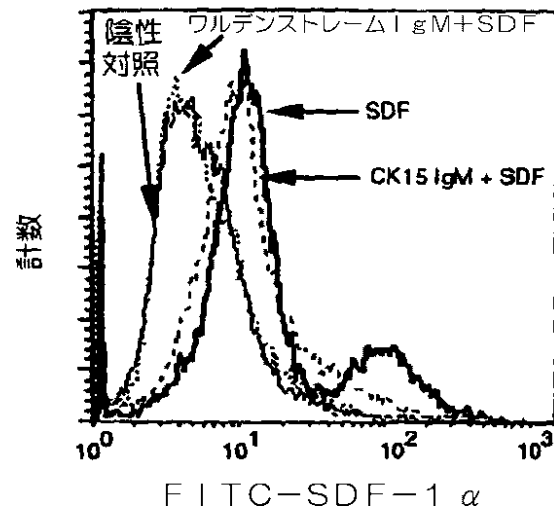
【図2D】

**FIGURE 2D**

【図3A】

**FIGURE 3A**

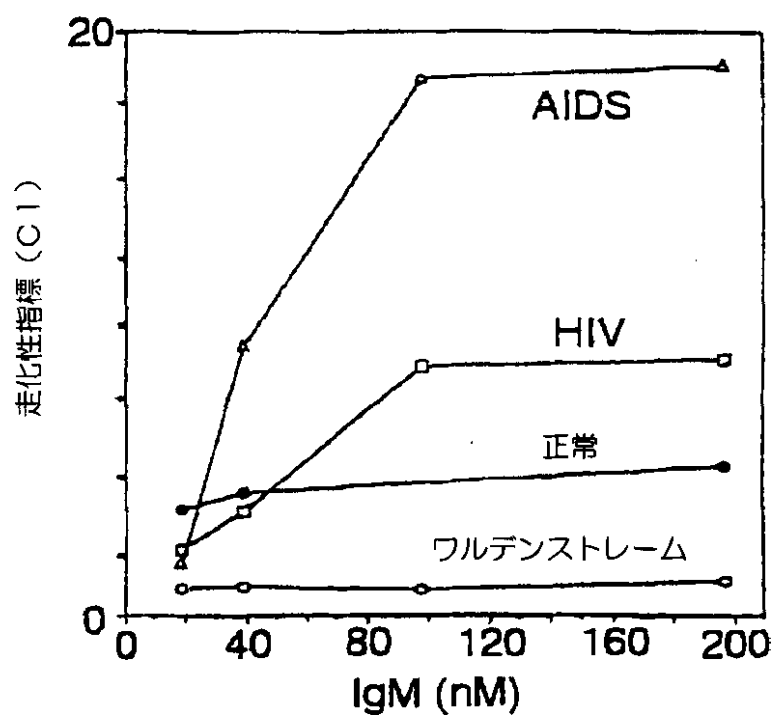
【図3B】

**FIGURE 3B**

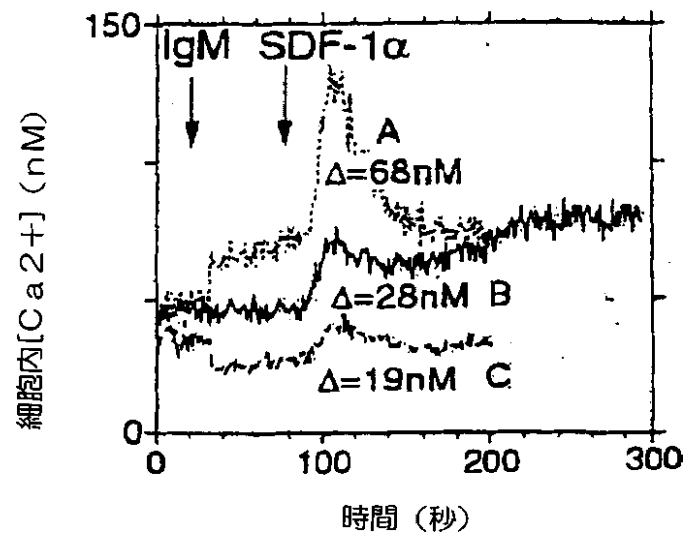
【図4A】

**FIGURE 4A**

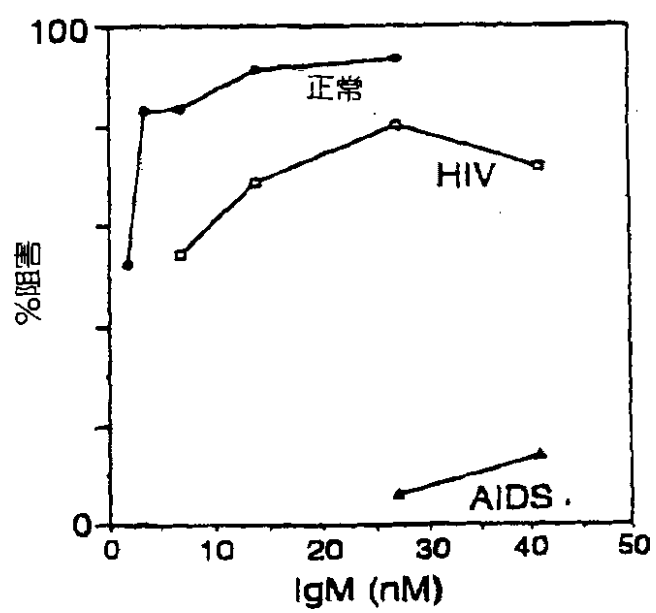
【図4B】

**FIGURE 4B**

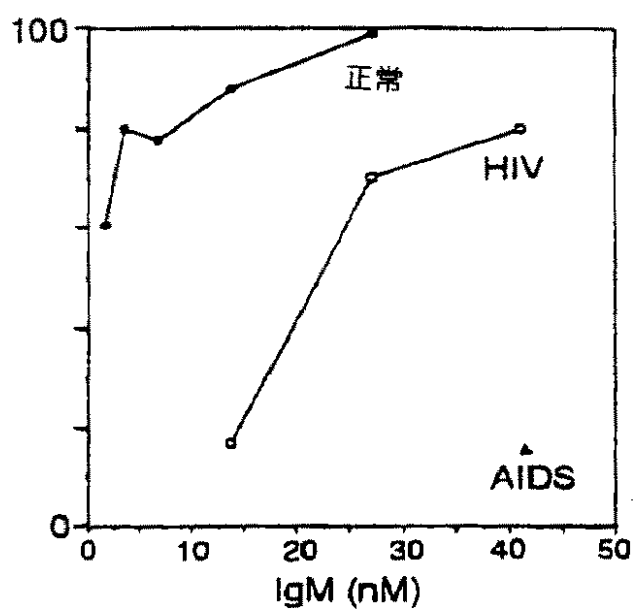
【図4C】

**FIGURE 4C**

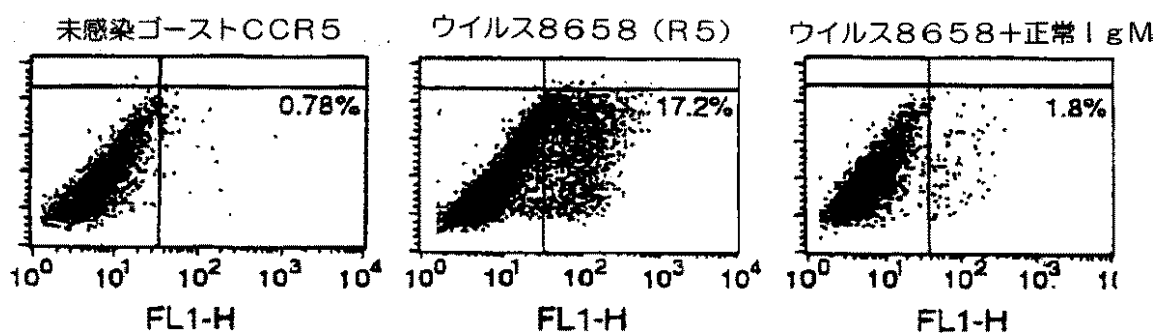
【図5A】

**FIGURE 5A**

【図5B】

**FIGURE 5B**

【図5C】

**FIGURE 5C**

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US00/31051

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(7) : A61K 38/04, 39/395; G01N 33/53, 33/567; C12N 5/12<br>US CL : 424/130.1, 139.1, 143.1, 178.1; 435/7.1, 7.2, 325, 326<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S. : 424/130.1, 139.1, 143.1, 178.1; 435/7.1, 7.2, 325, 326<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>NONE<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>Medline, East, STN<br>Search terms: IgM, anti-lymphocyte antibodies, chemokine receptors, IgM antibody production, quantitation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                     |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                     |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                             | Relevant to claim No.                                               |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | HALE et al. Effects of monoclonal anti-lymphocyte antibodies in vivo in monkeys and humans. Mol. Biol. Med. October 1983, Vol. 1, No. 3, pages 324-34.                                                                         | 1-13, 20-23                                                         |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | LALOR et al. Transfection of genes encoding lymphocyte differentiation antigens: applications in veterinary immunology. Vet. Immunol. Immunopathol. December 1987, Vol. 17, No. 1-4, pages 291-302, especially pages 293-300.  | 24-37                                                               |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | JEEJEEBHOY et al. Mode of recovery from the effects of heterologous anti-lymphocyte serum. II. Recovery of the cells involved in antibody production. Immunology, May 1972, Vol. 22, No. 5, pages 801-812.<br>Entire document. | 14-37                                                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                     |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"G" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                |                                                                     |
| Date of the actual completion of the international search<br>09 JANUARY 2001                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                | Date of mailing of the international search report<br>30 MAR 2001   |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Commissioner of Patents and Trademarks<br>Box PCT<br>Washington, D.C. 20231<br>Facsimile No. (703) 305-3230                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                | Authorized officer<br>SARADA PRASAD<br>Telephone No. (703) 308-0196 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US00/31051

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | COCCHI et al. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection.<br>Nat. Med. November 1996, Vol. 2, No. 11, pages 1244-7.<br>Entire document. | 1-37                  |
| A         | BRODER, C.C., COLLMAN, R.G. Chemokine receptors and HIV.<br>J Leukoc Biol 1997 Jul;62(1):20-9.<br>Entire document                                                                                            | 1-37                  |

-----  
フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I           | テ-マ-コ-ト' (参考) |
|--------------------------|-------|---------------|---------------|
| A 6 1 P 31/18            |       | A 6 1 P 31/18 |               |
| 37/06                    |       | 37/06         |               |
| 43/00                    | 1 1 1 | 43/00         | 1 1 1         |
| C 1 2 N 5/10             |       | C 1 2 P 21/08 |               |
| 15/02                    |       | G 0 1 N 33/53 | N             |
| C 1 2 P 21/08            |       | 33/569        | G             |
| G 0 1 N 33/53            |       | C 1 2 N 15/00 | C             |
| 33/569                   |       | 5/00          | B             |

(81)指定国 E P ( A T , B E , C H , C Y ,  
D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I  
T , L U , M C , N L , P T , S E , T R ) , O A ( B F  
, B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W ,  
M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G  
M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z  
, U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z ,  
M D , R U , T J , T M ) , A E , A G , A L , A M ,  
A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B  
Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K  
, D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E ,  
G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J  
P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R  
, L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K ,  
M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R  
O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J  
, T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N ,  
Y U , Z A , Z W

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA58 GA27  
4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24  
DA03 DA15  
4B065 AA90X AB02 BA25 CA44  
4C085 AA33 GG02 GG03

|                |                                                                                                                                                                                             |         |            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | <无法获取翻译>                                                                                                                                                                                    |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2003516940A5</a>                                                                                                                                                              | 公开(公告)日 | 2007-12-06 |
| 申请号            | JP2001537971                                                                                                                                                                                | 申请日     | 2000-11-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | MONICAID公司                                                                                                                                                                                  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Monikeido公司                                                                                                                                                                                 |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | Monikeido公司                                                                                                                                                                                 |         |            |
| [标]发明人         | ピーターアイロボ                                                                                                                                                                                    |         |            |
| 发明人            | ピーター・アイ・ロボ                                                                                                                                                                                  |         |            |
| IPC分类号         | A61K39/395 A61K39/02 A61K39/12 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P37/06 A61P43/00 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/569 C12N15/02 C12N5/10                                                          |         |            |
| CPC分类号         | C07K2317/21 C07K2316/52 A61K2039/505 G01N33/6854 C07K16/2866 C07K2317/52 A61P29/00                                                                                                          |         |            |
| FI分类号          | A61K39/395.Y A61K39/02 A61K39/12 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P37/06 A61P43/00.111 C12P21/08 G01N33/53.N G01N33/569.G C12N15/00.C C12N5/00.B                                            |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/BA58 4B024/GA27 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA03 4B064/DA15 4B065/AA90X 4B065/AB02 4B065/BA25 4B065/CA44 4C085/AA33 4C085/GG02 4C085/GG03 |         |            |
| 优先权            | 09/439690 1999-11-15 US<br>09/684813 2000-10-10 US                                                                                                                                          |         |            |
| 其他公开文献         | JP2003516940A                                                                                                                                                                               |         |            |

#### 摘要(译)

正常人 ( 即非HIV感染者 ) 的人血清含有某些与趋化因子和其他淋巴细胞表面受体反应的IgM自身抗体。 与这些受体 ( 尤其是CXCR4和CCR5受体 ) 结合的这些IgM自身抗体的一个子集可以抑制感染细胞的HIV-1。 亚临床HIV-1感染状态向AIDS的进展部分取决于抑制感染细胞中HIV-1的IgM自身免疫水平。 这些低亲和力结合的IgM自身抗体水平和病毒载量之间存在微妙的平衡。 趋于增加个体病毒载量或抑制产生这些自身抗体的B细胞亚群的因素导致病毒进入细胞并促进病毒介导的疾病的发展。