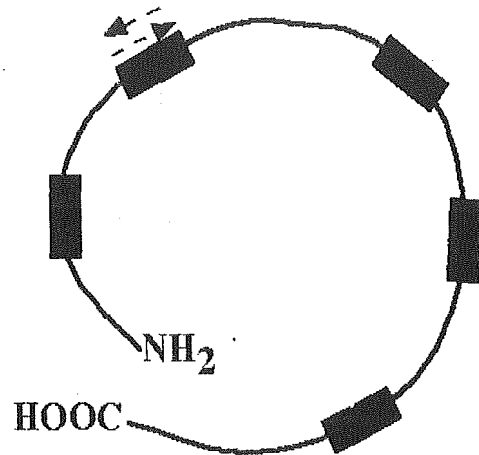


蛋白分子内におけるSense Peptide(SP)と

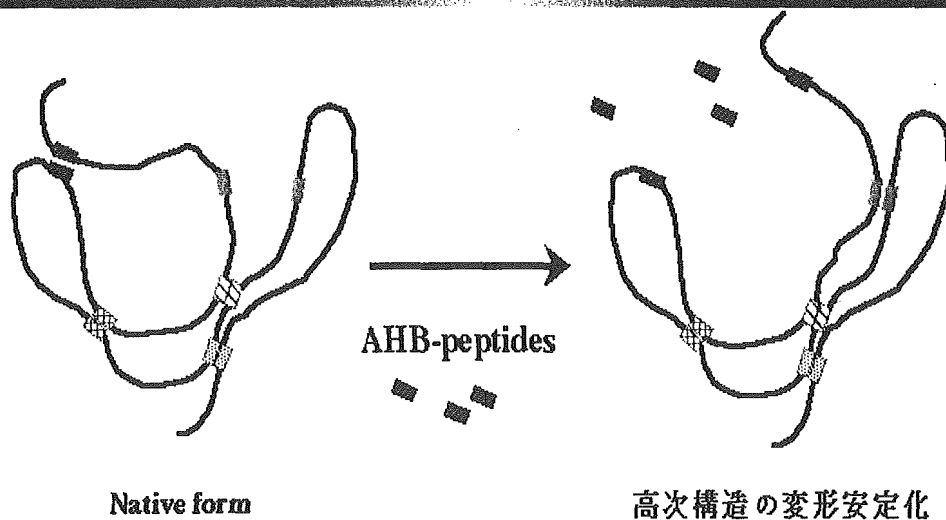
Antisense Peptide(ASP)関係の存在

SPとASPが複数集積している部位をAntisense Homology Box (AHB)と命名
(Nature Med. 1:894,1995)

- AHBの平均長は約15アミノ酸
- AHB間のスペースは約50アミノ酸
- 蛋白質分子の約20%がAHBにかかわる



AHBペプチド添加によるタンパク質分子 高次構造の変化



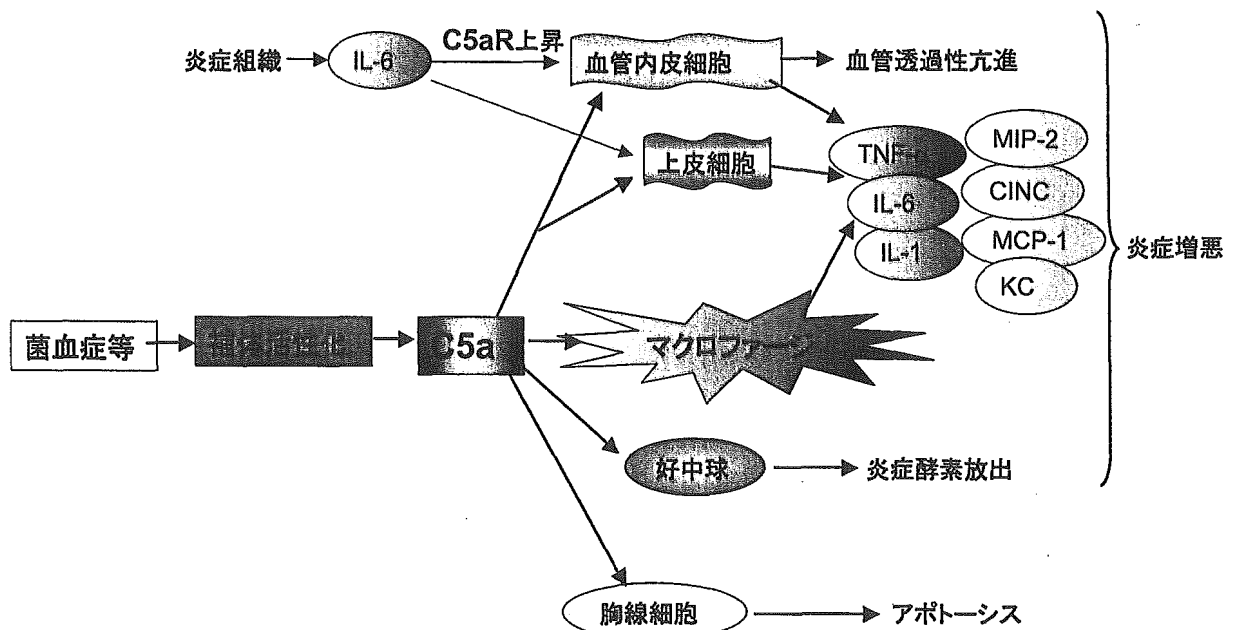
アンチセンスアミノ酸を指標に加えてMIMETICを作成

相補性ペプチドの試作有効率

| 標的分子 | 作用 | 試作数 | 有効数 | 有効率(%) |
|------------------------------|----------------|-----|-----|--------|
| HIV逆転写酵素(RT) | 酵素活性阻害 | 10 | 3 | 30.0 |
| ProCarboxypeptidase R (TAFI) | 活性化阻害 | 10 | 3 | 30.0 |
| Thrombomodulin | Thrombin補助作用阻害 | 3 | 2 | 66.7 |
| C5aアナフィラトキシン | 活性阻害 | 19 | 7 | 36.8 |

MIMETICを用いて相補性ペプチドの設計試作を行った

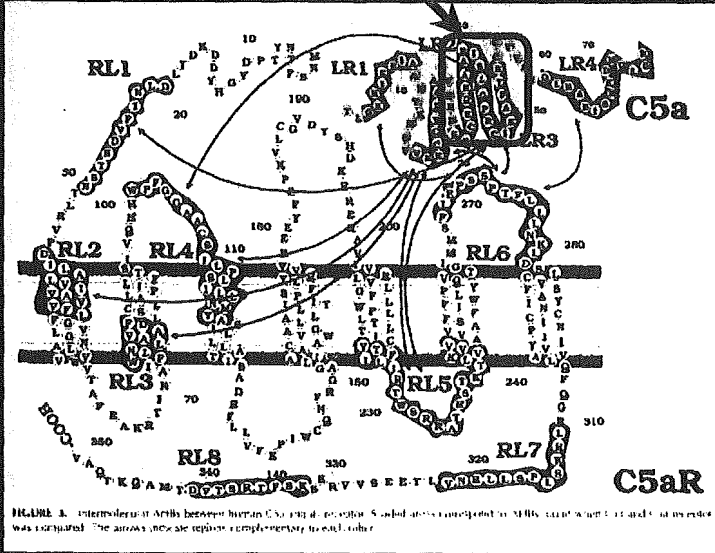
C5aアナフィラトキシンの起炎作用



C5a と C5aR 間のアンチセンスペプチド関係とPepA設計

Target Peptide PL-37 (R¹-E³)

相補性ペプチドの
設計合成



PepA
PepB

PepA 効果あり

Crry抗体投与によるラット致死モデルでのPepAの救命効果

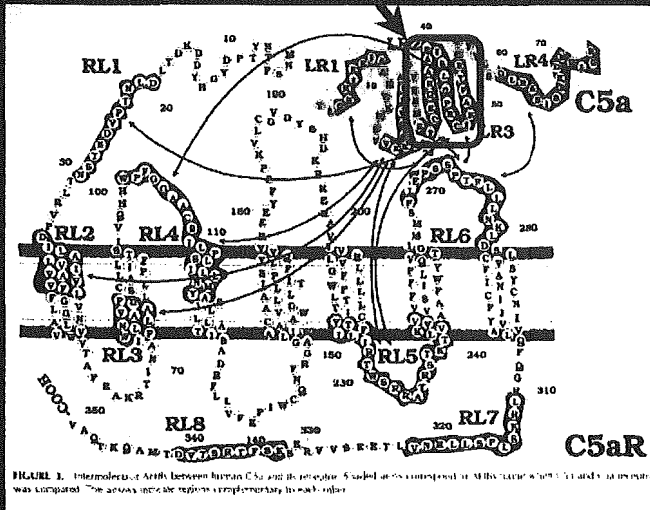
| Pretreatment (in 250µl saline) | Survived / Total rats | Survival Rate (%) |
|-----------------------------------|--------------------------|----------------------|
| saline | 0/8 | 0 |
| PepB 4 mg/kg | 0/4 | 0 |
| PepA 4 mg/kg | 4/4 | 100 |
| 2 mg/kg | 2/3 | 67 |
| 1 mg/kg | 1/3 | 33 |
| 0.5 mg/kg | 3/4 | 75 |

PepAのアセチル化による安定性の改善

相補性ペプチド設計

Target Peptide PL-17 (R³⁷-E⁵¹)

PepA

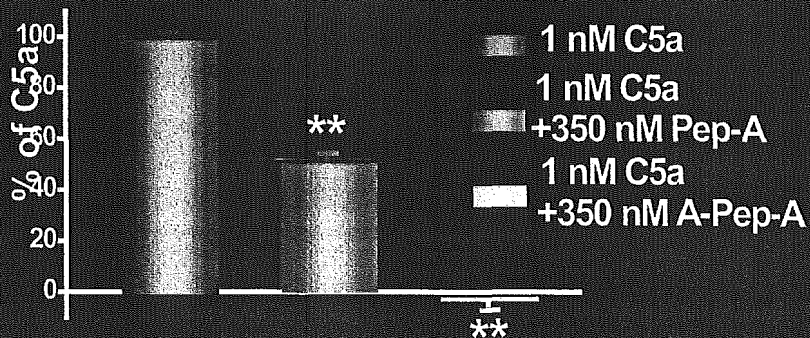
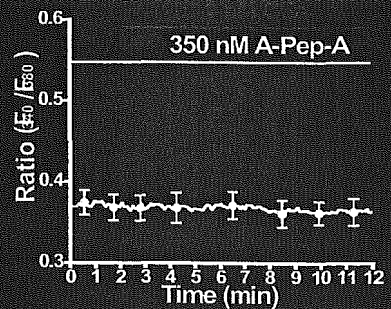
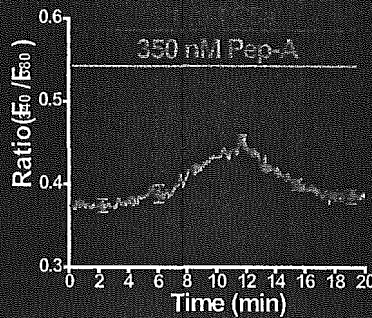
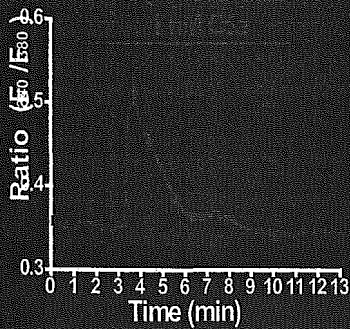


生体内での安定性を高める

AcPepA

N末のアラニンをアセチル化したPepA

PepAおよびAcPepAによるC5a-Ca-influx抑制効果の比較



ラット皮内反応によるペプチドの抑制効果

| 5I2 Ab (μg) | PepA | AcPepA | 30分後の# 青班(Score) | 2時間後の## 青班(mm) |
|--------------------------|------------------|------------------|---------------------|-------------------|
| 2.5 | 40 μg | | ++ | 7 +/- 2 |
| 2.5 | | 40 μg | - | 3 +/- 1 |
| 2.5 | 4 μg | | ++ | 6 +/- 3 |
| 2.5 | | 4 μg | - | 4 +/- 2 |
| 5.0 | 40 μg | | +++ | 10 +/- 3 |
| 5.0 | | 40 μg | - | 4 +/- 1 |
| 5.0 | 4 μg | | ++ | 6 +/- 3 |
| 5.0 | | 4 μg | +++ | 10 +/- 4 |

30分の時点で目視により観察

2時間後に安楽死させ、皮膚をはがして計測(mm)

CAWSによるマウスショック死モデルにおけるペプチドの効果

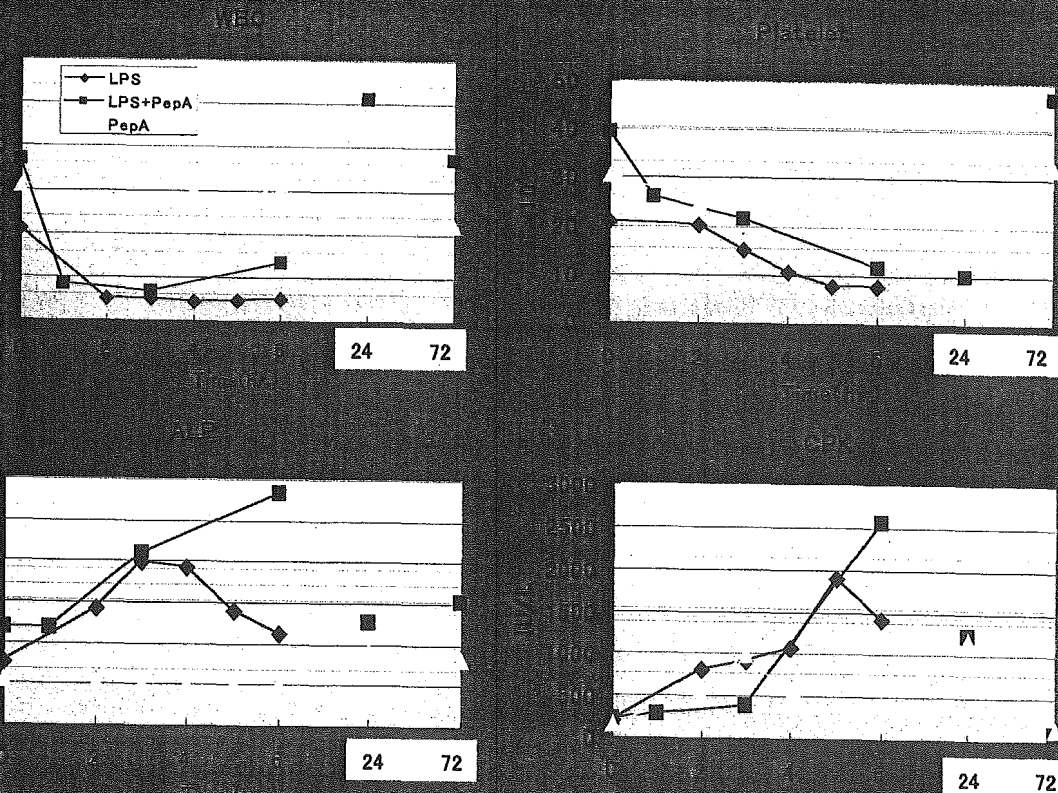
| Pretreatment | dose | route | CAWS | dead / total |
|---------------|-------------------|-------|--------------------------------|--------------|
| <i>saline</i> | 200 μL | i.p. | 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ | 3/3 |
| <i>AcPepA</i> | 4 mg/kg | i.p. | 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ | 3/3 |
| | 4 mg/kg | i.v. | 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ | 3/3 |
| <i>saline</i> | 200 μL | i.p. | 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ | 3/3 |
| <i>AcPepA</i> | 4 mg/kg | i.p. | 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ | 3/3 |
| | 4 mg/kg | i.v. | 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ | 2/4 |

カニクイザルを用いた治療実験

- 1) 2 mg LPS/kg/2 min 投与後 2 mg LPS/kg/60 min
- 2) LPS投与開始30分後に 2 mg AcPepA/kgを投与開始
- 3) 2mg/kg/hr で2~5時間 AcPepAを持続静注した。
(対照には生理食塩水を投与)
- 4) 6時間後に麻酔から覚醒させて観察したところ

投与しない場合、2日以内に全例死亡したので、新しいプロトコールでは6時間で安楽死させて剖検

II LPSショックカニクイザルのAcPepA投与による血液検査の比較



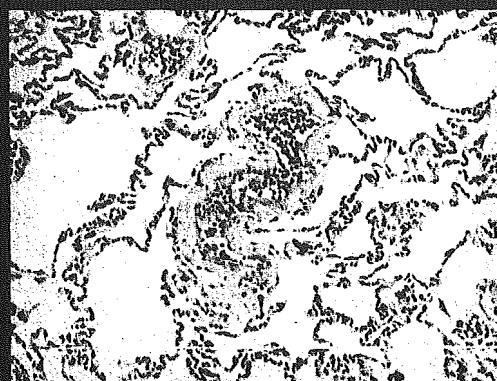
まとめ

LPSショックサルへのAcPepA投与による救命と検査結果の比較

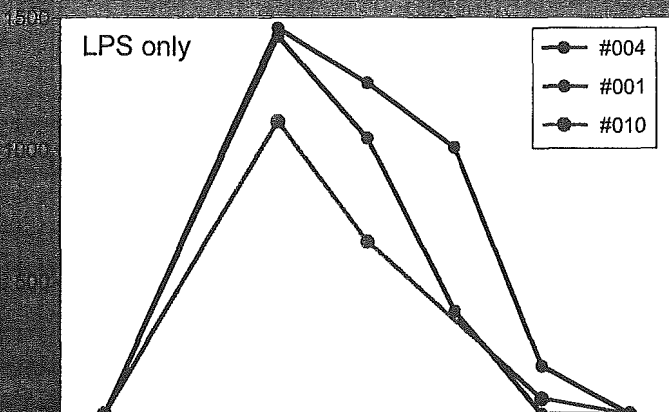
| 指標など | LPS | LPS+AcPepA | AcPepA |
|--------------|--------------|------------|--------|
| 血圧低下 | 4/6 | 3/7 | 0/1 |
| 体温上昇 | 5/6 | 3/7 | 0/1 |
| 白血球数減少 | 6/6 | 7/7 | 0/1 |
| 血清生化学値変動 | 6/6 | 7/7 | 0/1 |
| 死亡率 (安楽死) | 3/3 (3/3) | 0/7 | 0/1 |



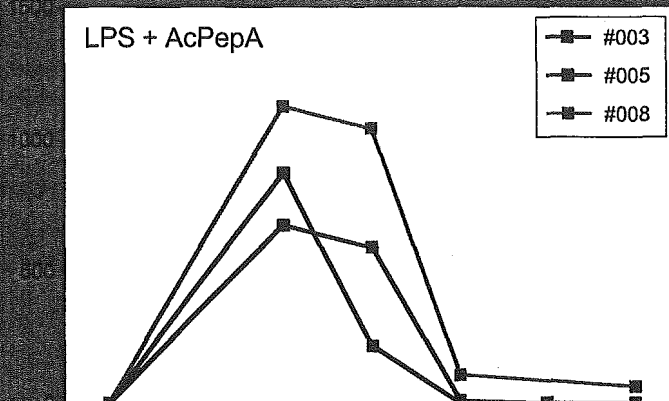
#004 Monkey lung:
LPS injected;
A lot of leukocytes in vessels



#003 Monkey lung:
LPS injected and
treated with AcPepA;
A lot of leukocytes in vessels



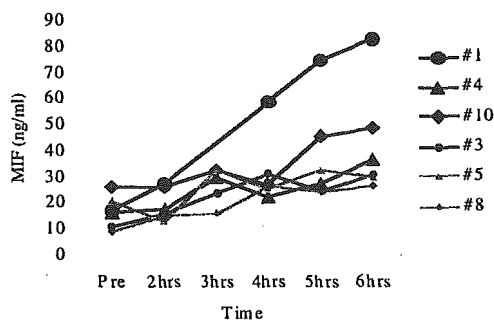
TNF α in Plasma of Monkeys injected with 4mg/kg LPS



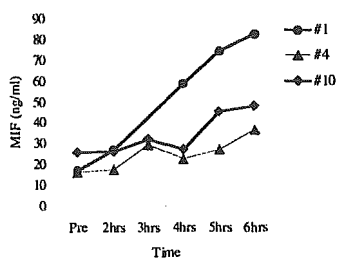
TNF α in Plasma of Monkeys injected with 4mg/kg LPS and treated with AcPepA from 30min to 6h following LPS injection

LPSショックサルへのAcPepA投与は血清MIF量の上昇を阻止する

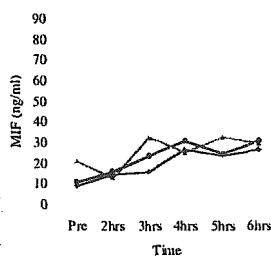
Serum MIF



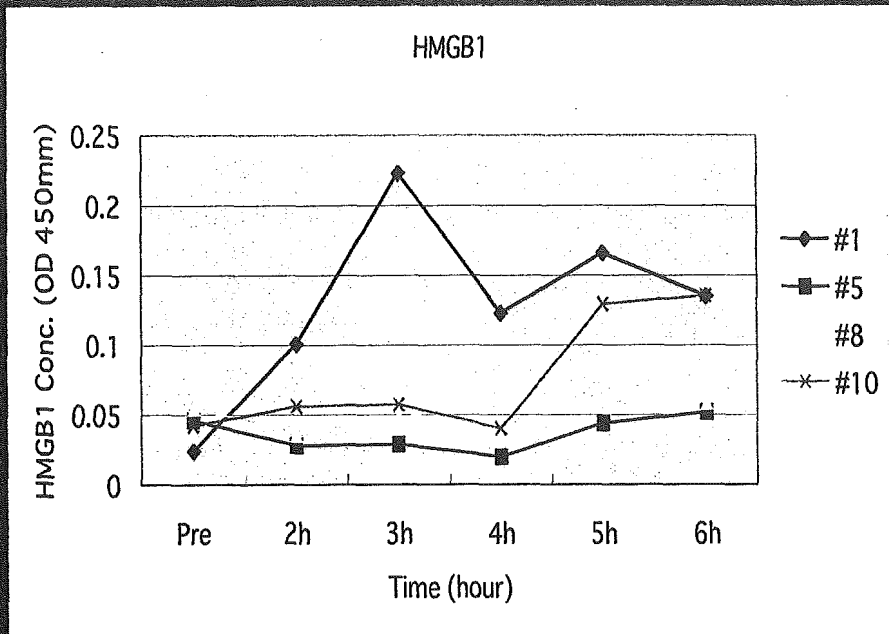
LPS alone



LPS+AcPepA

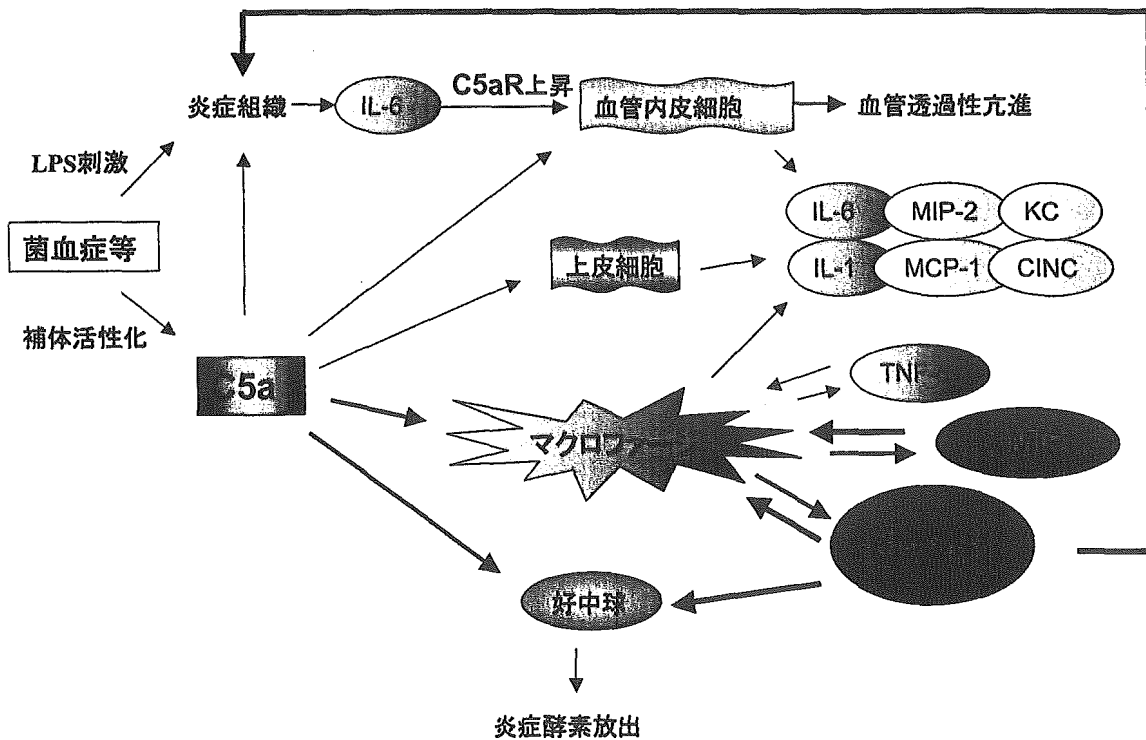


Inhibition of LPS-induced HMGB1 production in plasma by administration of AcPepA in Monkey



LPSショックモデルへのAcPepA投与は血清HMGB1の上昇を阻止する

C5aアナフィラトキシンの起炎作用とLPSショック誘発への関与



C5a阻害ペプチドの治療への応用

- 1) 抗体療法時の炎症性ショック防止薬として活用できる
- 2) 敗血症の治療
米国では年間75万人に発症し22万人が死亡している敗血症患者の救命薬を目指す（数千億円の市場）
- 3) 虚血再還流障害の予防
脳梗塞、心筋梗塞、心臓バイパス手術、臓器移植などでの虚血再還流障害の予防薬として期待（数千億円以上の市場）

分担研究報告書

患者リンパ球初代培養に対する IgM 抗体と補体作用の解析

分担研究者：神戸市環境保健研究所微生物部 飛澤 笑山

研究協力者：名古屋市立大学大学院医学研究科 岡田 則子

研究要旨 HIV 感染細胞に特異的に反応して細胞死を誘導するヒト IgM 抗体が作成されたので、その IgM 抗体の抗 HIV 活性を HIV 感染者末梢血リンパ球を用いて検討した。インフォームドコンセントが得られた患者より末梢血 5-10 ml の分与を受けて使用した。末梢血より CD4 リンパ球を分離して、抗 CD3 と IL2 添加にて細胞培養を行い、抗体添加による、培養上液中 p24 蛋白および HIV-mRNA さらに細胞中の HIV-DNA 量の解析を行った。その結果、ヒト IgM 抗体 9F11 は高い抗 HIV 活性を示す事が確認された。さらに抗 Nef 抗体 CF8, 3B4B にも持続感染株に対して抗 HIV 活性が示されたので、さらなる検討を続け、HIV 感染症に有効な IgM 抗体療法を検討したい。

「目的」

HIV 感染者は多剤併用療法で HIV を強力に押さえるが、潜伏感染細胞は排除できない。多剤併用療法の継続により、患者の苦痛と共に経済的社会的負担も莫大になる。ヒト型 IgM 抗体 9F11 *In vitro* では HIV 感染及び潜伏感染細胞に補体の活性化を誘導して破壊することができる。今回、名古屋医療センターから提供された HIV 感染患者の末梢血から分離された CD4+細胞リンパ球を用いて、*ex vivo* で 9F11 抗体の有効性を検討した。また、われわれは新たに抗 HIV nef ヒト型 IgM 抗体を作成した。この抗体の抗 HIV 活性についても *In vitro* で検討した。

- 3) 10 μ g/ml 9F11 存在下で 10% FHS(ヒト補体)入りの培地で培養する。
- 4) 翌日 wash し、1 μ g/ml UCHT1 存在下で培養する。
- 5) 3 日後 wash し、50U/ml IL2 を加えて培養する。
- 6) 10 日目に培養上清を回収。細胞はさらに 50U/ml IL2 存在下で培養する。
- 7) 20 日目に後培養上清と細胞を別々に回収する。
- 8) 回収した培養上清中のウイルス P24、RNA 及び細胞中の pro-virus を測定する。

「方法」

1. ウイルス P24、RNA 及び pro-virus の定量

- 1) Ficoll-paque で HIV 感染患者の末梢血リンパ球を分離。
- 2) Stem-Sep system で CD4+リンパ球を分離 (1~5 x 10⁵cell)。

2. 抗 nef IgM 抗体の抗 HIV 効果
- 1) MOLT4 及び MOLT4/IIIB は 50:1 の比率で混合して、ヒト補体が存在すると存在しない条件下で抗 nef IgM 抗体 (CF8 と 3B4B) を加

えて培養し、5、7日目に上清中の P24量を測定した。

「結果」

1. 計 71 例 HIV 感染患者からリンパ球を分離して実験を行った。その内分離されたリンパ球が増殖し、ウイルスの解析をできたのは 8 例だった。この 8 例の HIV 感染患者リンパ球においては、ウイルスの P24 及び RNA レベルが 9F11 によって顕著に抑制された。また、ウイルス pro-virus 測定法で行なった実験では、8 例のうち 6 例がウイルス感染細胞数も減少した (表 1)。
2. 非感染細胞と感染細胞の混合培養系において、抗 nef IgM 抗体はヒト補体活性と関係なしでウイルス P24 産生を抑える効果があった。特に CF8 抗体はウイルスの増殖を 85% 以上も抑制した (表 2)。

「考察」

今回 8 例の感染者リンパ球のすべてにおいて HIV-1 ウイルスの産生が 9F11 と補体によって顕著に抑制されたことから、*ex*

vivo で 9F11 の有効性が確認された。ウイルス pro-virus 測定実験系では 8 例のうち 6 例もウイルス感染細胞数が減少したことから、9F11 とヒト補体はウイルス感染細胞を破壊することによってウイルスの産生を抑制したと推測される。

抗 HIV nef ヒト型 IgM 抗体 CF8 と 3B4B は *In vitro* で高い抗 HIV 活性を発揮できることが確認された。今後、更に患者のリンパ球を用いて、抗 HIV nef ヒト型 IgM 抗体の抗 HIV 効果について詳しく検討する必要がある。

論文発表

飛沢笑山 (Wu X)

1) Okada, N., Yin, S., Asai, S., Kimbara, N., Dohi, N., Hosokawa, M., Wu, X., & Okada, H. Human IgM monoclonal antibodies reactive with HIV-1 infected cells generated using a trans-chromosome mouse. *Microbiol. Immunol.* 2005, 49: 447-459

表 1. HIV 感染患者の末梢血リンパ球における 9F11 抗体の抗 HIV 効果

| | | | NC | 9F11 |
|--------------------------|--------------------------|--------|--------|------|
| patient 79 CD4 : 68 | 10 day | P24 | 812 | 0 |
| | | RNA | 31440 | 6940 |
| | 20day | P24 | 960 | 0 |
| | | RNA | 3220 | 630 |
| | 20day | DNA | 142 | 113 |
| | patient 130 CD4 : 510 | 10 day | P24 | 10 |
| RNA | | | 2270 | 542 |
| 20day | | P24 | 0 | 0 |
| | | RNA | 25 | 47 |
| 20day | | DNA | 352 | 52 |
| patient 132 CD4 : 859 | | 10 day | P24 | 17 |
| | RNA | | 958 | 270 |
| | 20day | P24 | 0 | 0 |
| | | RNA | 152 | 36 |
| | 20day | DNA | 50 | 20 |
| | patient 133 CD4 : 200 | 10 day | P24 | 9 |
| RNA | | | 436 | 92 |
| 20day | | P24 | 0 | 0 |
| | | RNA | 178 | 0 |
| 20day | | DNA | 7 | 0 |
| patient 86 CD4 : 285 | | 10 day | P24 | 15 |
| | RNA | | 52 | 2 |
| | 20day | P24 | 0 | 0 |
| | | RNA | 5 | 0 |
| | 20day | DNA | 6 | 7 |
| | patient 88 CD4 : 314 | 10 day | P24 | 109 |
| RNA | | | 0 | 0 |
| 20day | | P24 | 8 | 0 |
| | | RNA | 250 | 0 |
| 20day | | DNA | 21 | 21 |
| patient 89 CD4 : 212 | | 10 day | P24 | 112 |
| | RNA | | 303 | 0 |
| | 20day | P24 | 722 | 0 |
| | | RNA | 205440 | 58 |
| | 20day | DNA | 60183 | 9 |

| | | | | |
|------------|--------|-----|------|-----|
| patient 93 | 10 day | P24 | 16 | 9 |
| CD4 : 311 | | RNA | 3042 | 728 |
| | 20day | P24 | 0 | 0 |
| | | RNA | 930 | 461 |
| | 20day | DNA | 65 | 29 |

注1. P24 = pg/ml, RNA = copies/ml, DNA = copies/100000

表2. 抗 nef IgM 抗体の特HIV効果

| | NC(FHS) | CF8(FHS) | 3B4B(FHS) | NC(HHS) | CF8(HHS) | 3B4B(HHS) |
|-------|---------|----------|-----------|---------|----------|-----------|
| 5 day | 143.8 | 60.5 | 79.6 | 171.1 | 67.5 | 72 |
| 7 day | 729.7 | 147.2 | 166.4 | 1240.7 | 178.7 | 308.6 |

注1. MOLT4 及び MOLT4/IIIB は 50 : 1 の比率で混合して、FHS(ヒト補体存在下)、HHS(ヒト補体非存在下)及び各抗体の存在かで培養します。5, 7 日目に上清中の P24 量を測定した (pg/ml)。NC=negative control。

ヒトIgMモノクローナル抗体9F11の抗HIV効果

神戸環境保健研究所微生物部
飛澤笑山
名古屋市立大学大学院医学研究科
岡田則子、金原紀章、土肥名月
国立名古屋医療センター
金田次弘
福祉村病院長寿医学研究所
岡田秀親

患者リンパ球9F11,AZT

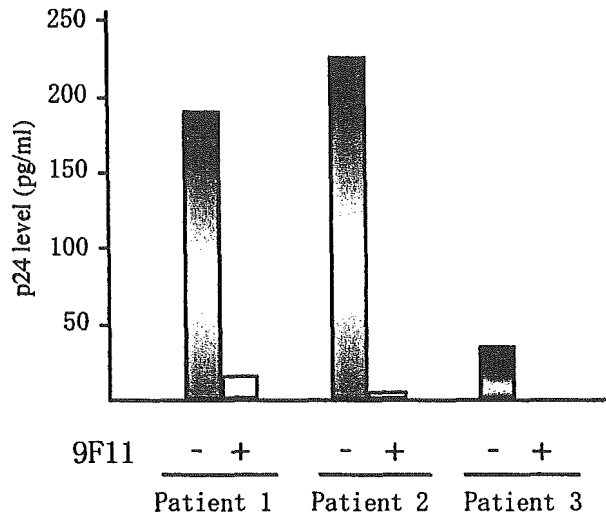
Effect of 9F11 against HIV propagation of Patients PBMCs ex vivo

| Patient No. | Cultivation Time | p24 level (pg/ml) | | |
|-------------|------------------|---------------------|-------|-------|
| | | Control | 9F11 | AZT |
| Patient 1 | 10 day | 181.4 | 22.3 | ND* |
| | 20 day | 208.1 | 194.6 | 14.2 |
| Patient 2 | 10 day | 220.8 | 3.5 | 208.2 |
| | 20 day | 236.8 | 236.4 | 228.8 |
| Patient 3 | 10 day | 5.7 | ND | ND |
| | 20 day | 38.4 | ND | ND |

Patients PBMC were treated with 10%FHS with or without 9F11 for 24 hrs, and washed. Then these were cultivated with anti-CD3 and IL2. The supernatants were analysed at 10 and 20 days. 1 μ M AZT treatment were performed through out during 10 and 20 days cultivation.

*ND; not detected

9F11 suppresses HIV-1 propagation in Patients PBMCs ex vivo



Patients PBMCs were treated with 10%FSH with or without 9F11 for 1 day and washed out with medium. Then patient 1 and 2 were cultivated for 10 days and patient 3 was for 20 days.

9F11, AZTの生データ

| | | NC | AZT | 9F11 |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| patient 3 | 10 day | 750.8 | 0 | 22.3 |
| | 20 day | 4082.4 | 14.2 | 3427.8 |
| patient 8 | 10 day | 4301.2 | 2130.1 | 3.5 |
| | 20 day | 4687.8 | 4500.8 | 4171.6 |
| patient 9 | 10 day | 5.7 | 0 | 0 |
| | 20 day | 38.4 | 0 | 0 |
| patient 17 (NO. 2682362) | 10 day | 0 | 0 | 0 |
| | 20 day | 5.1 | 0 | 0 |
| patient 19 (NO. 2832704) | 10 day | 445.9 | 0 | 0 |
| | 20 day | 4409.5 | 0 | 0 |
| patient 24 (NO. 2309360) | 10 day | 2582.5 | 0 | 0 |
| | 20 day | 4350.0 | 0 | 0 |

●p24値の単位は pg/mlです。

Summary

Effect of 9F11 on HIV-1 propagation in CD4 lymphocytes ex vivo

| Patient No | Cultivation day | Amount of p24 (pg/ml) | | |
|------------|-----------------|-----------------------|--------------|-------------|
| | | 10%FHS alone | 10%FHS +9F11 | %inhibition |
| 1 | 10 | 2582.5 | 0 | 100 |
| 2 | 10 | 445.9 | 0 | 100 |
| 3 | 20 | 38.4 | 0 | 100 |
| 4 | 20 | 5.1 | 0 | 100 |
| 5 | 10 | 4301.2 | 3.5 | 99.92 |
| 6 | 10 | 750.8 | 22.3 | 97.02 |

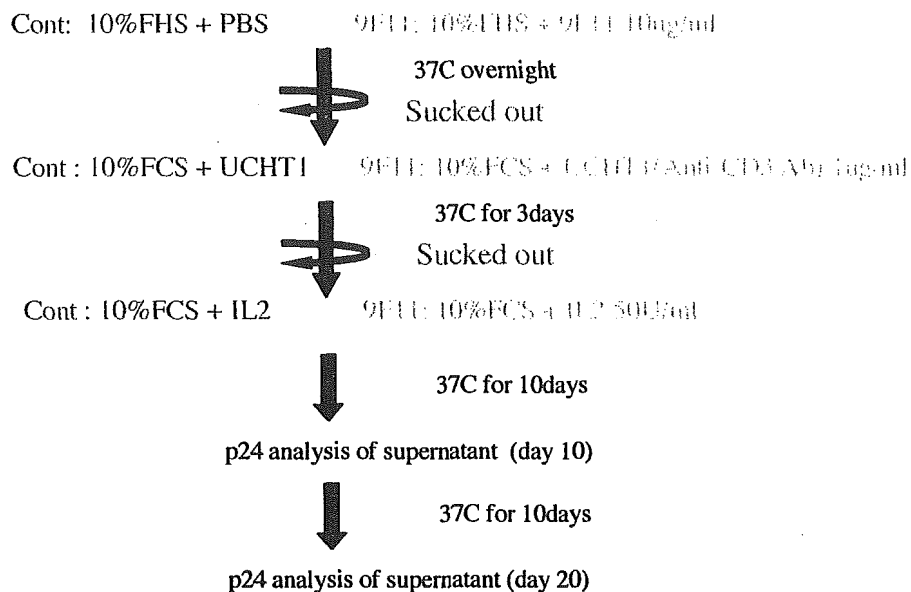
NO. 2682362

9F11 suppresses HIV-1 propagation completely from patient CD4 lymphocytes ex vivo

| Patient ID | CD4 count (cells/ul) | VL (copies/ml) | Cultivation (days) | 9F11 | p24 (pg/ml) |
|-------------|----------------------|-----------------|--------------------|------|-------------|
| NO. 2682362 | 482 | < 50 | 20 | - | 5.1 |
| | | | 20 | + | 0 |
| NO. 2832704 | 353 | 9700 | 10 | - | 445.9 |
| | | | 10 | + | 0 |
| | | | 20 | - | 4409.5 |
| | | | 20 | + | 0 |
| NO. 2309360 | 103 | 4100 | 10 | - | 2582.5 |
| | | | 10 | + | 0 |
| | | | 20 | - | 4350.0 |
| | | | 20 | + | 0 |

Experimental Protocol for detection of anti-HIV effect of 9F11

(CD4 cells from patients blood were prepared using StemSep system)



患者ID-DNA

Effect of 9F11 against HIV-1 -DNA in CD4 lymphocytes from patients ex vivo

| Patient ID | CD4 count (cells/ul) | VL (copies/ml) | Cultivation (days) | 9F11 | DNA/100000 |
|-------------|----------------------|----------------|--------------------|------|------------|
| NO. 2682362 | 482 | < 50 | 30 | - | NT |
| | | | 30 | + | NT |
| NO. 2832704 | 353 | 9700 | 30 | - | 54740 |
| | | | 30 | + | <dL |
| NO. 2309360 | 103 | 4100 | 30 | - | 329 |
| | | | 30 | + | <dL |

生データ (1)

| 9F11 | p24 (pg/ml) | | HIV-1 RNA (copies/ml) | | | |
|---------|-------------|-------|-----------------------|-------|--------|-------|
| | 4 day | | 4 day | | 11 day | |
| | - | + | - | + | - | + |
| 2369923 | 0 | 0 | 88 | 0 | 25 | 43 |
| 2601974 | 0 | 0 | 1221 | 5897 | 6559 | 22470 |
| 2778122 | 0 | 0 | 1893 | 906 | 2734 | 1966 |
| 2785234 | 0 | 0 | 42 | 132 | - | - |
| 2954206 | 0 | 0 | 76 | 0 | - | - |
| 2970126 | 15.95 | 11.02 | 53700 | 20850 | - | - |
| 2970191 | 1.69 | 1.42 | 841 | 910 | - | - |

Experimental method

1. Ficoll-Paqueによる末梢血リンパ球分離
2. Stem Sep systemによるCD4+ T cell分離。(1~5×10⁵cell回収)
3. 10 µg/ml 9F11 (controlはPBS) 添加10% FHSRPMI1640 500 µlにて培養。
4. 1日後wash out、1 µg/ml 抗CD3抗体(UCHL1)添加RPMI1640 500 µlにて培養。
5. 3日後wash out、50 U/ml IL-2添加RPMI1640 1 mlにて培養。
6. 4日後培養上清を回収(4 day)。細胞を50 U/ml IL-2添加RPMI1640にて培養。
7. 7日後培養上清を回収(11day)。

データ1 (サンプル2)

| No | Patient | plasma RNA | CD4 | RNA | RNA-9F11 |
|----|---------|------------|-----|-----|----------|
| 1 | 2707063 | 360000 | 379 | 620 | 1087 |
| 2 | 2809664 | < 50 | 509 | 9 | 12 |
| 3 | 2369923 | < 50 | 644 | 3 | nd |
| 4 | 4006151 | 120000 | 168 | 623 | 469 |
| 5 | 2228947 | < 50 | 349 | 6 | nd |
| 6 | 2947994 | < 50 | 513 | 9 | nd |
| 7 | 2970120 | 98000 | 207 | 263 | 54 |

データ2 (サンプル2)

| Patient No | plasma RNA | CD4 | RNA | RNA-9F11 |
|------------|------------|-----|-----|----------|
| 2970120 | 98000 | 207 | 263 | 54 |
| 4006151 | 120000 | 168 | 623 | 469 |
| 2707063 | 360000 | 379 | 620 | 1087 |
| 2947994 | < 50 | 513 | 9 | nd |
| 2228947 | < 50 | 349 | 6 | nd |
| 2369923 | < 50 | 644 | 3 | nd |
| 2809664 | < 50 | 509 | 9 | 12 |

HIV感染者末梢血リンパ球Ex vivo培養による9F11抗体の抗HIV効果

9F11(10 ug/ml)を補体存在下にリンパ球と一晩反応後、細胞洗浄にて抗体を除去し、抗CD3抗体添加刺激によるHIVウィルスの叩き出し培養をおこなった。

| Patient No | Cultivation day | P24 (pg/ml) | | %inhibition |
|------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|
| | | 10%FHS alone | 10%FHS +9F11 | |
| 1 | 10 | 2582.5 | 0 | 100 |
| 2 | 10 | 445.9 | 0 | 100 |
| 3 | 20 | 38.4 | 0 | 100 |
| 4* | 20 | 5.1 | 0 | 100 |
| 5 | 10 | 4301.2 | 3.5 | 99.92 |
| 6 | 10 | 750.8 | 22.3 | 97.02 |

* HAART成功例患者(RNA コピー数<50)である。P24測定の信頼限界は~7 pg/mlである。