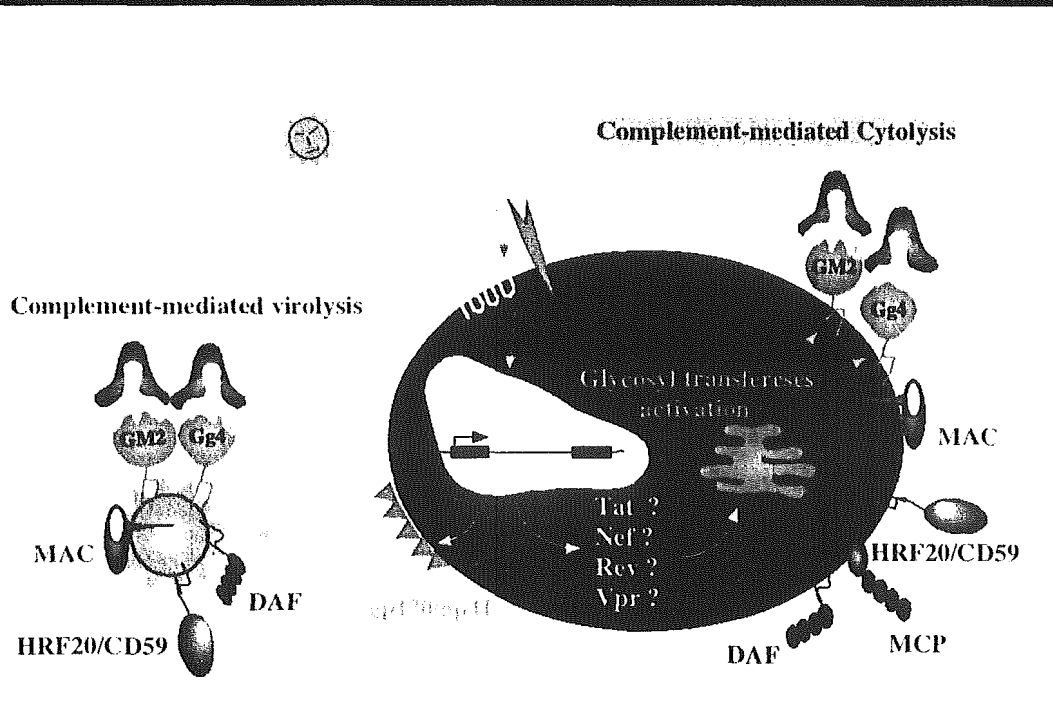


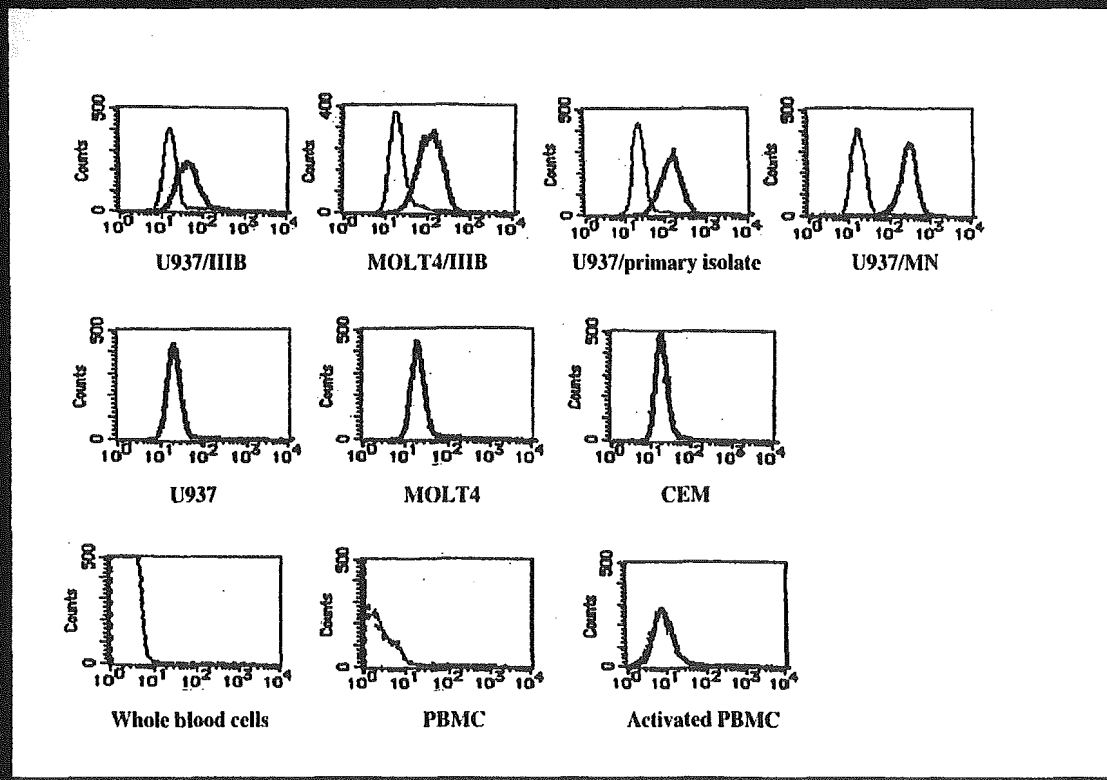
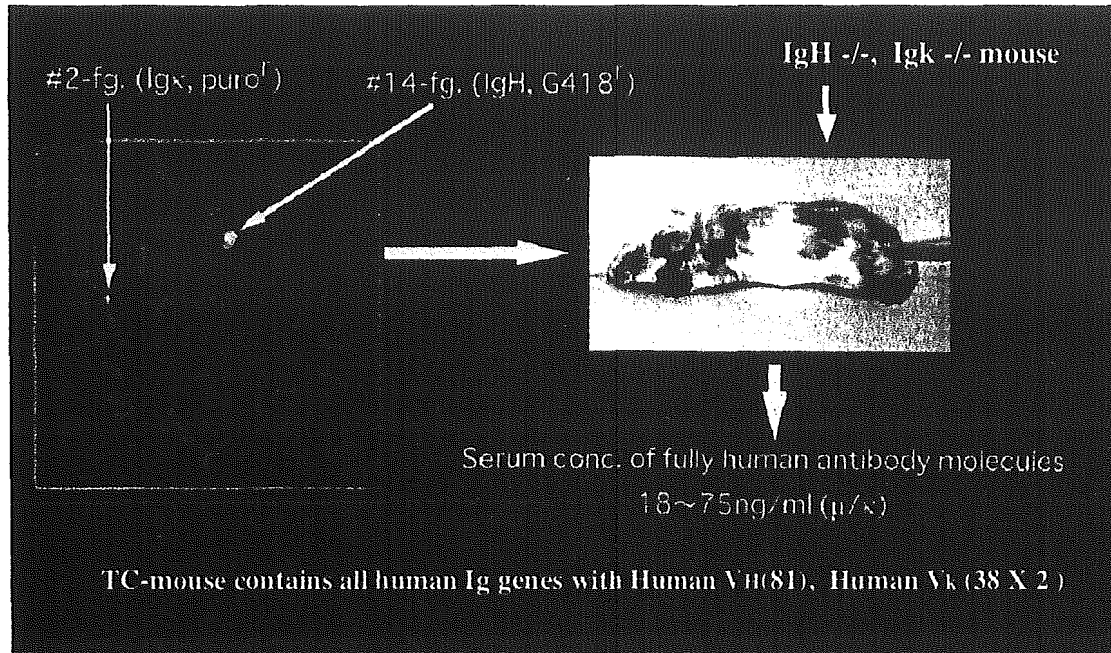
# Human IgM Monoclonal Antibodies which recognize and eliminate HIV-1 infected cells

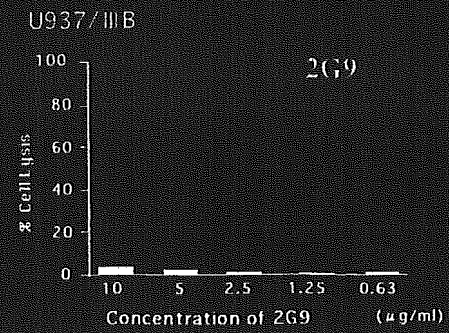
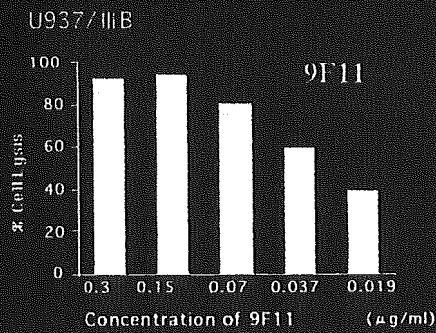
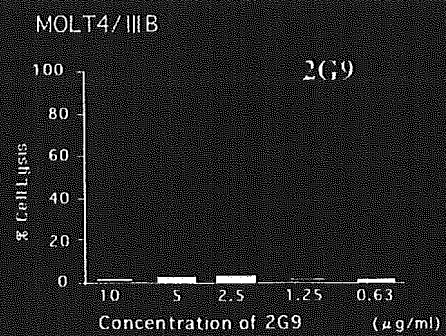
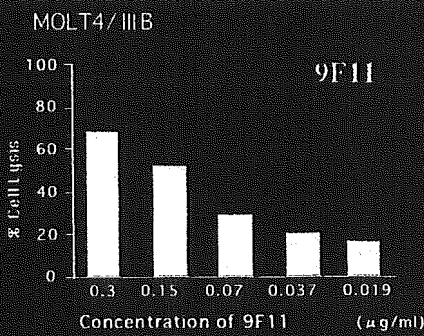
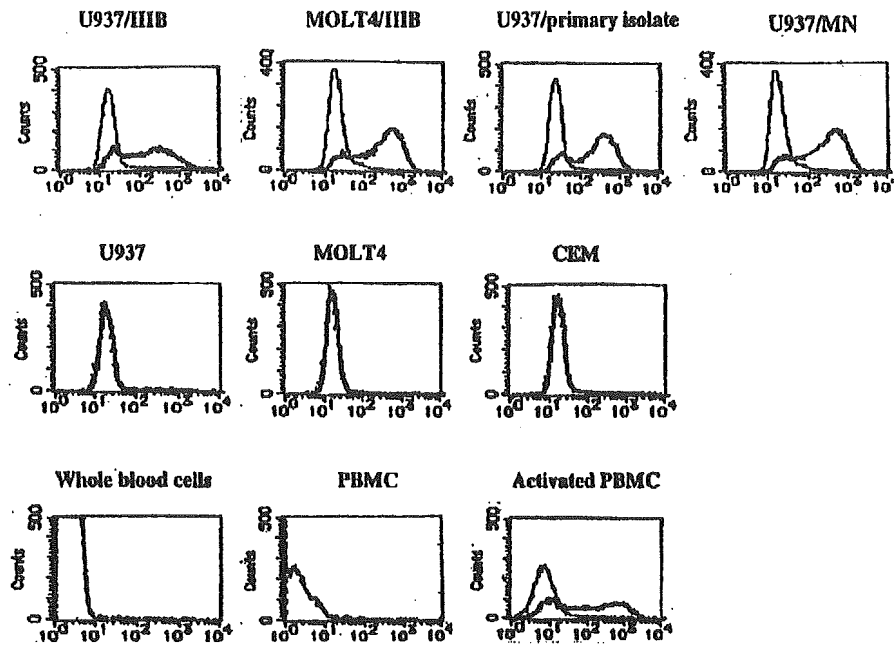
Noriko Okada

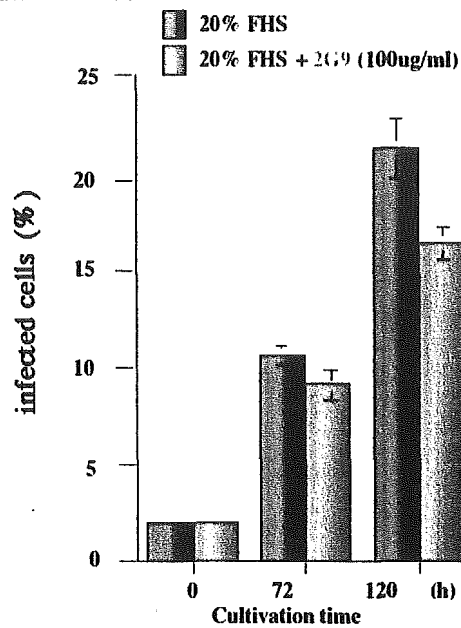
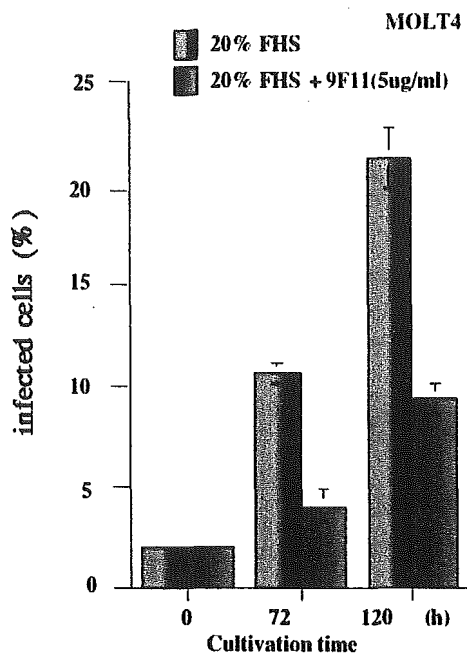
Dept Biodefense, Nagoya City Univ Grad Sch Med Sci

## BACK GROUND









```

+++++++L          FL  +L  GV  VQL  SG  GLVKP  L  L  CA  SG  S  S  W  RQ
-                +-  -  +-  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -
P  GLEW          S  Y  YA  SVK  R  TI  D  KN  LQ  NS  EDTAVYYCAR          WGQGLTVVSS
-                +-  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -

```

GSASAPLEELPLVSCLENSPSEDSVAVMVFAGDCEPDSLETSWKYKNNSEDESNTRGEPFVLRGGKFAAASDVELLPSKDYMMQGLDHL

VVCAVQHPNGNKEKNVPLPMTALELMPKQVNFVPRRDLGLGNPKRSKLELDALGELSPRDEQVWKEGKQVGSVGTLLDQVDALEK

SGPFLYKVTSELTLEKESDRLSOSMELEKVDHNSLEFDQNASSMCPDQDIAIRVLALEPSEAVLEFKSEKLELCLVTDLETTYDSV

ELSWTRONGEAVKTHIRNLSLHPDALLSAYLEAVLELDQWNSGERLELTVLHFDLPSDFEDLTPKRSVALHHPDVTLEPPAREL

ELHREYATITLCLVTGLSPADVIVDMDPQDPLDPLVYVSAPMPERQAPGRYFADLELTVGLLEWLELTYLQVVAHLEALPHRVI

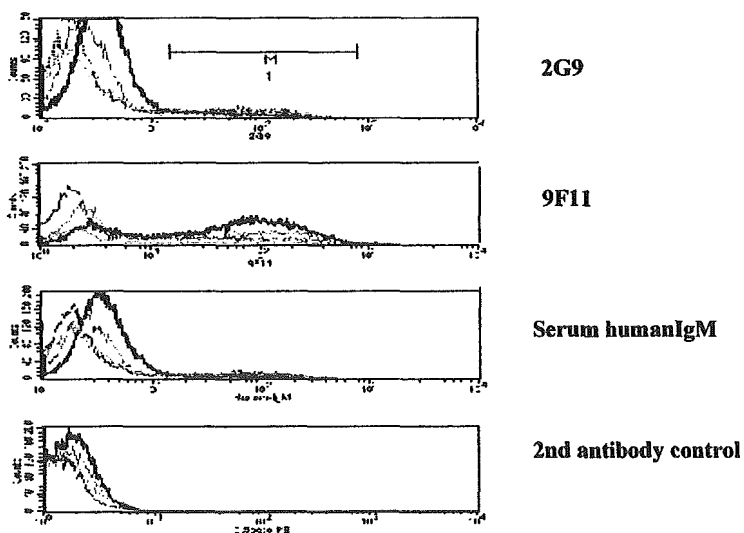
ERLVDSKSTGRPLLYRMSLVMSDLACTLYPWPADRLGAAGRSVLAFL

## Anti-HIV-1 activity of 9F11 in primary cultures of CD4 cells from infected patients

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

CD4 lymphocytes were incubated with 10 ug/ml 9F11 in the presence of 20% FHS for 18 hrs. And then those cells were washed out and cultured in the presence of anti CD3 antibody and IL2 for each cultivation days.

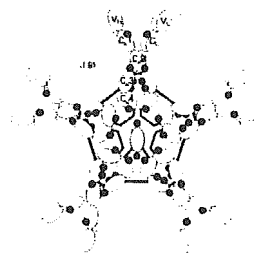
## Reactivity of 9F11 to PBMCs from SIV infected monkey



F

Resus monkeys were infected SIV (Mac 239) and after 10 days, the PBMCs were collected to analyse the reactivity.

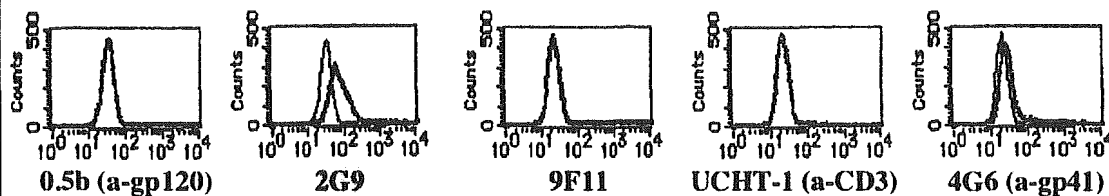
## Summary (1) 9F11



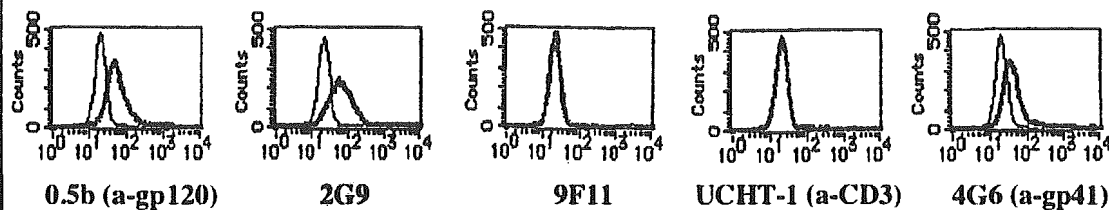
- 9F11はHIV感染細胞に反応して1ug/ml以下で補体依存性細胞傷害を引き起こし、抗HIV活性を示すヒトIgMモノクローナル抗体である。
- 9F11はHIVウイルス粒子に対しても補体依存性のウイルス溶解活性を示した。
- 9F11抗原は、HIV感染により発現誘導されて細胞膜上に現れる30kDの糖蛋白である。
- HIV感染者末梢血CD4細胞を用いた、ex vivoでの抗HIV効果の検討をp24量を指標に行った結果、ウイルス検出が可能であった6例全てで、抑制率97%以上の高い抗ウイルス活性が検出された。
- 9F11はサルSIV感染細胞やSHIV感染細胞にも反応性を示し細胞傷害活性を示した。

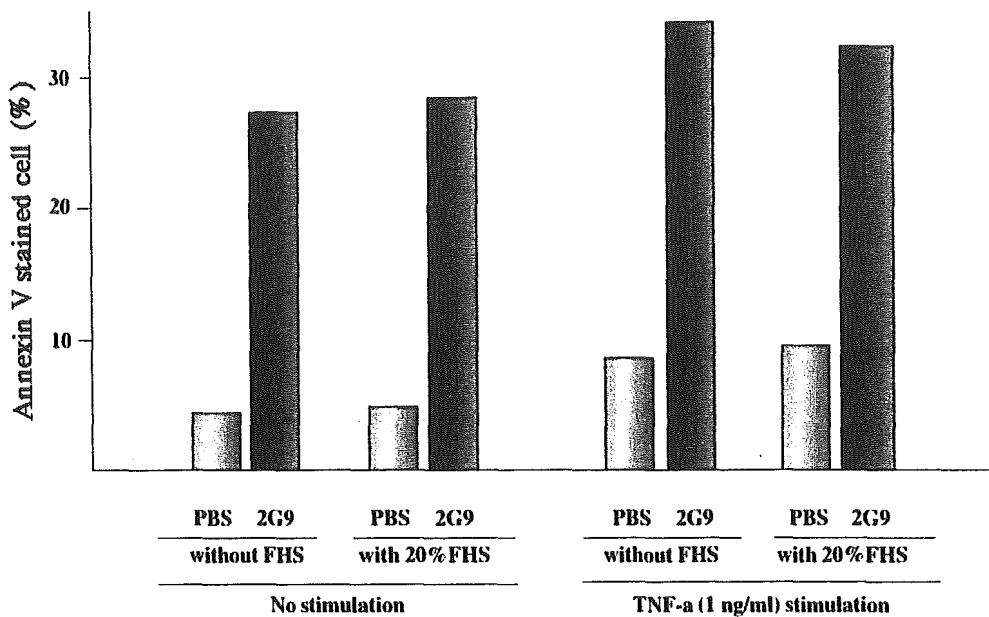
9F11の抗HIV効果とその安全性をSIV/SHIV感染サルを用いての検討を開始した。

### A. OM10.1

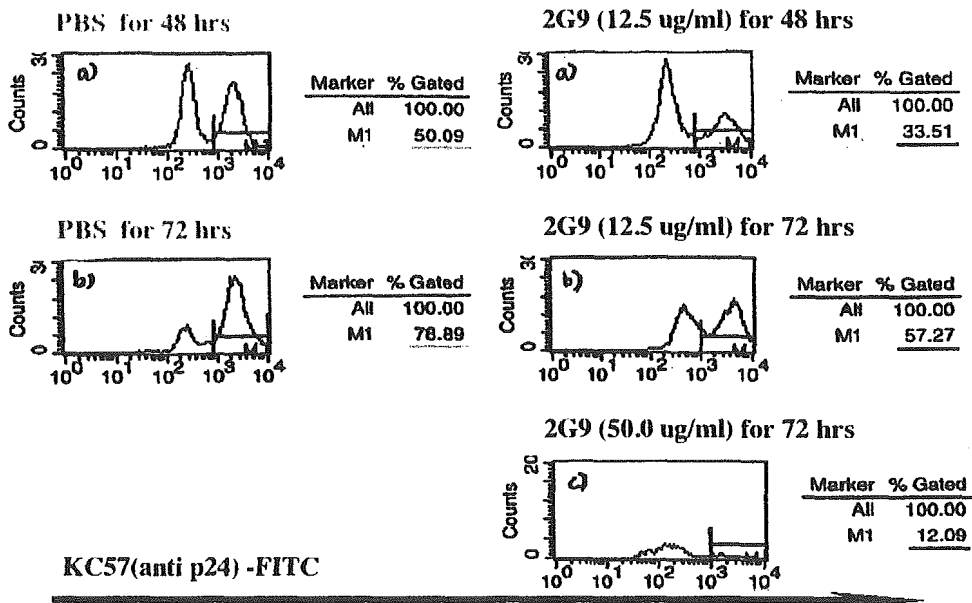


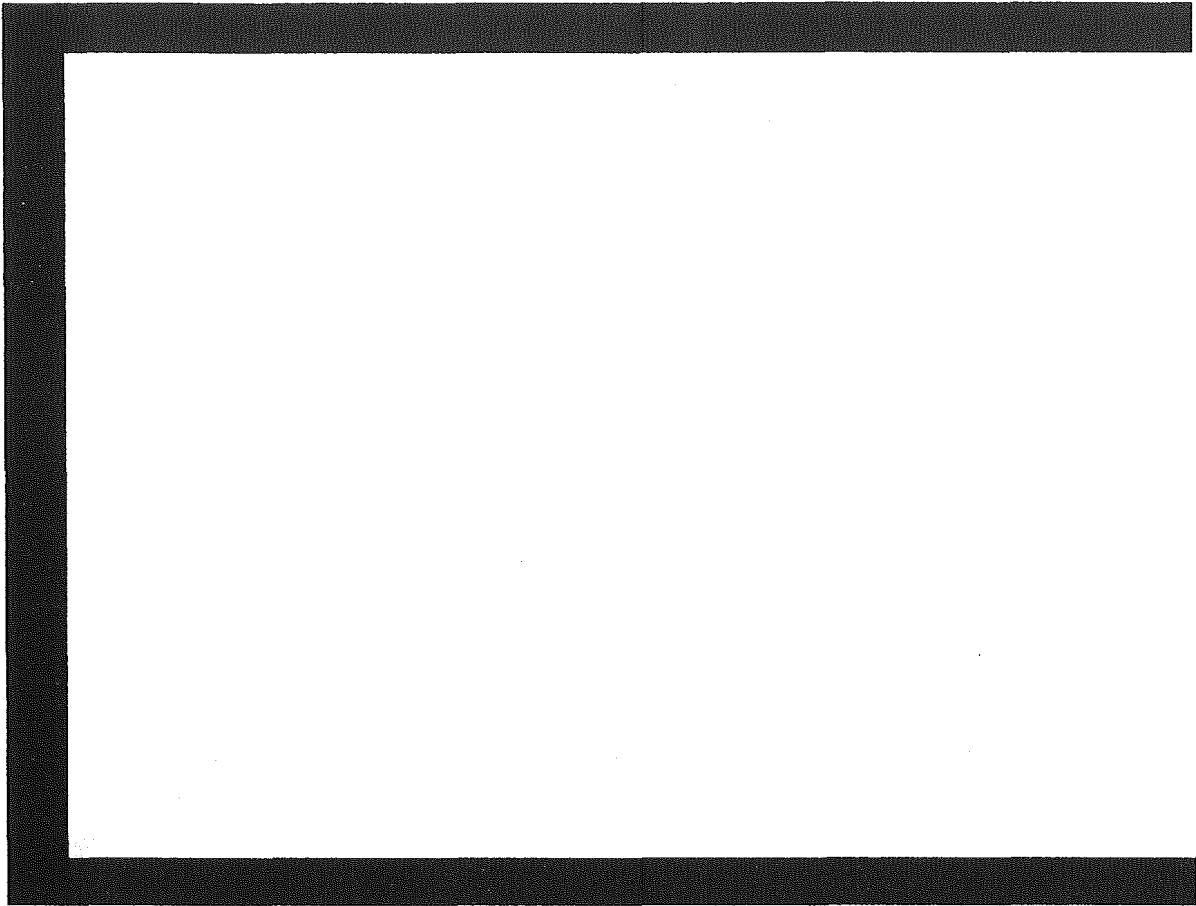
### B. OM10.1 with 1 ng/ml TNF-a for 10 days





Apoptosis of OM10.1 cells was determined after a 2-day cultivation in the presence or absence of 2G9 (12.5 ug/ml).



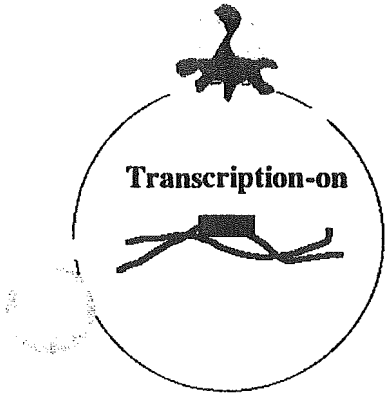


9F11 human IgM Ab

2G9 human IgM Ab

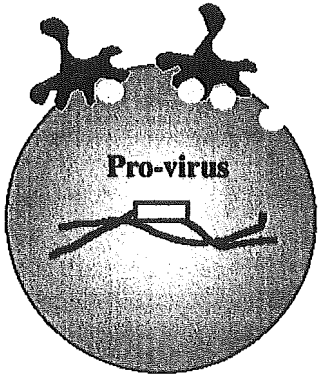


HIV-1 virions



HIV-1 infected cells

+

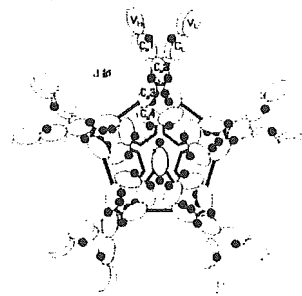


Apoptosis

Latently infected cells

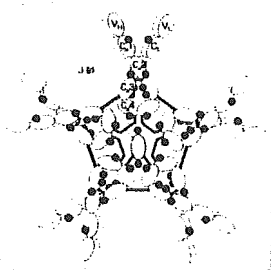


## Conclusions



IgM antibody..... Defense factor in acute stage of infection

- IgM抗体は強力な補体活性化能を有し、同種補体制御膜因子の機能をオーバーカムして細胞膜を破壊して、細胞死を引き起こす。
- IgM抗体は抗原をクロスリンクして、細胞内シグナル誘導によるアポトーシス細胞死を引き起こす場合がある。
- HIV感染細胞に特異的に反応するヒトIgMモノクローナル抗体を作成し、これらのIgM抗体により感染細胞死を誘導して排除することによる、HIV感染症に対する新しい抗体治療法を開発する。

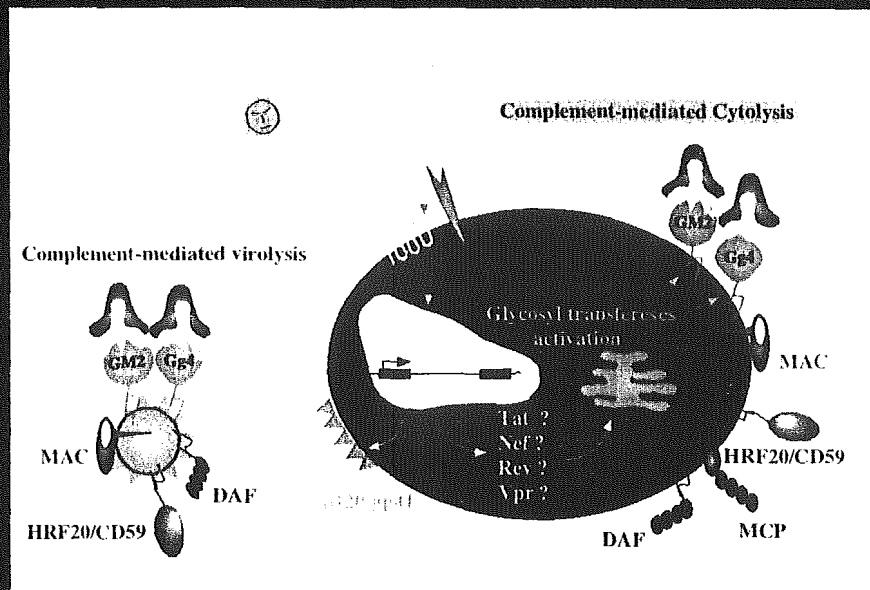


## 研究課題： HIV感染症の治療開発に関する研究

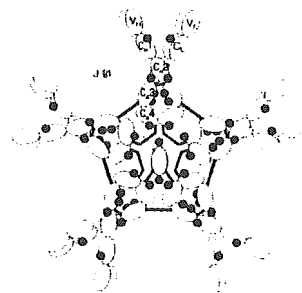
名古屋市立大学大学院医学研究科 岡田則子  
国立名古屋病院臨床研究センター 金田次弘  
福祉村病院長寿医学研究所 岡田秀親

### 研究背景

- GM2ガングリオシドなどに対するヒトIgM抗体が、HIV感染細胞に特異的に反応し、補体依存性の細胞死およびウイルス溶解を誘導して、抗HIV効果を発揮できることを検証した。



## 研究目的

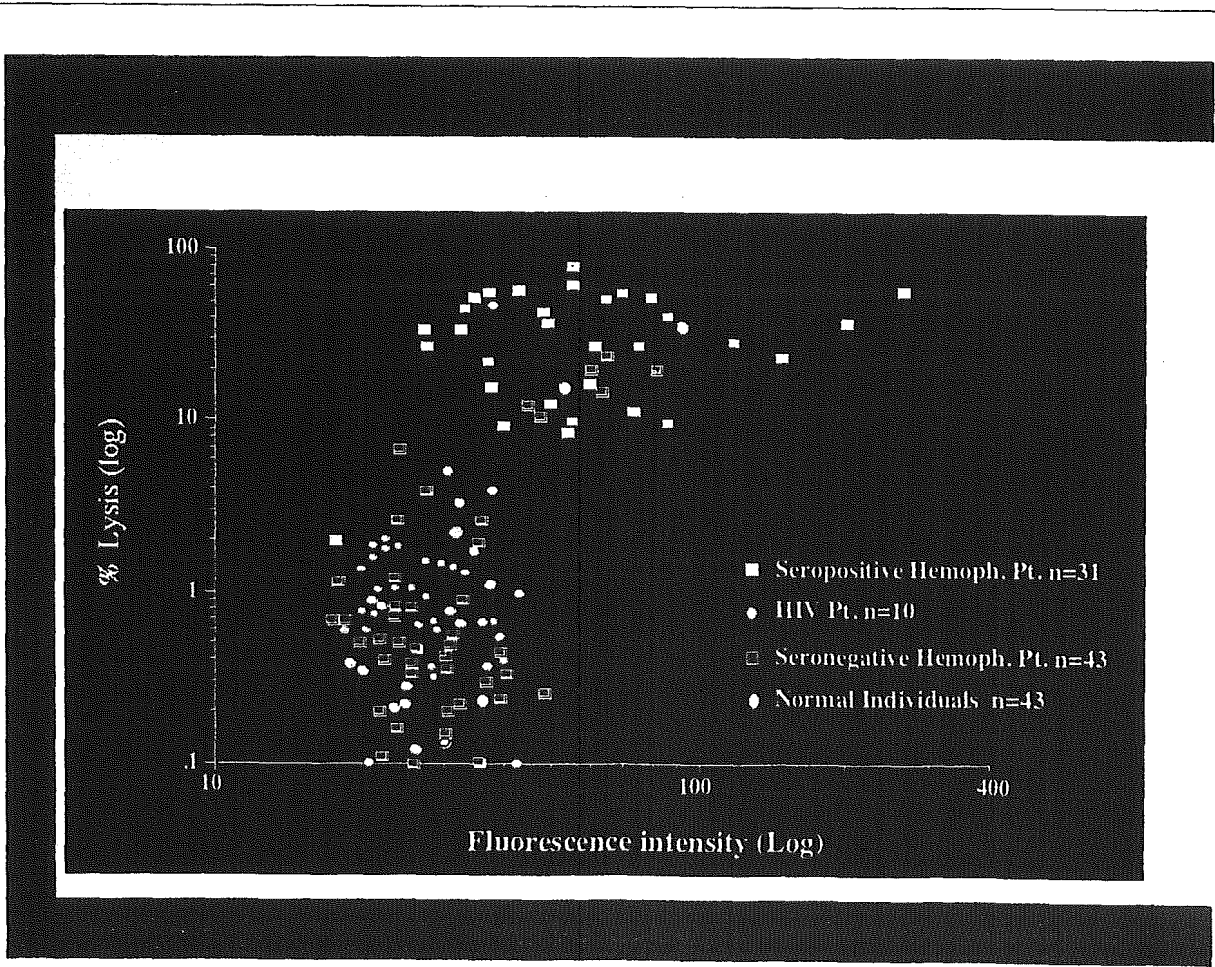
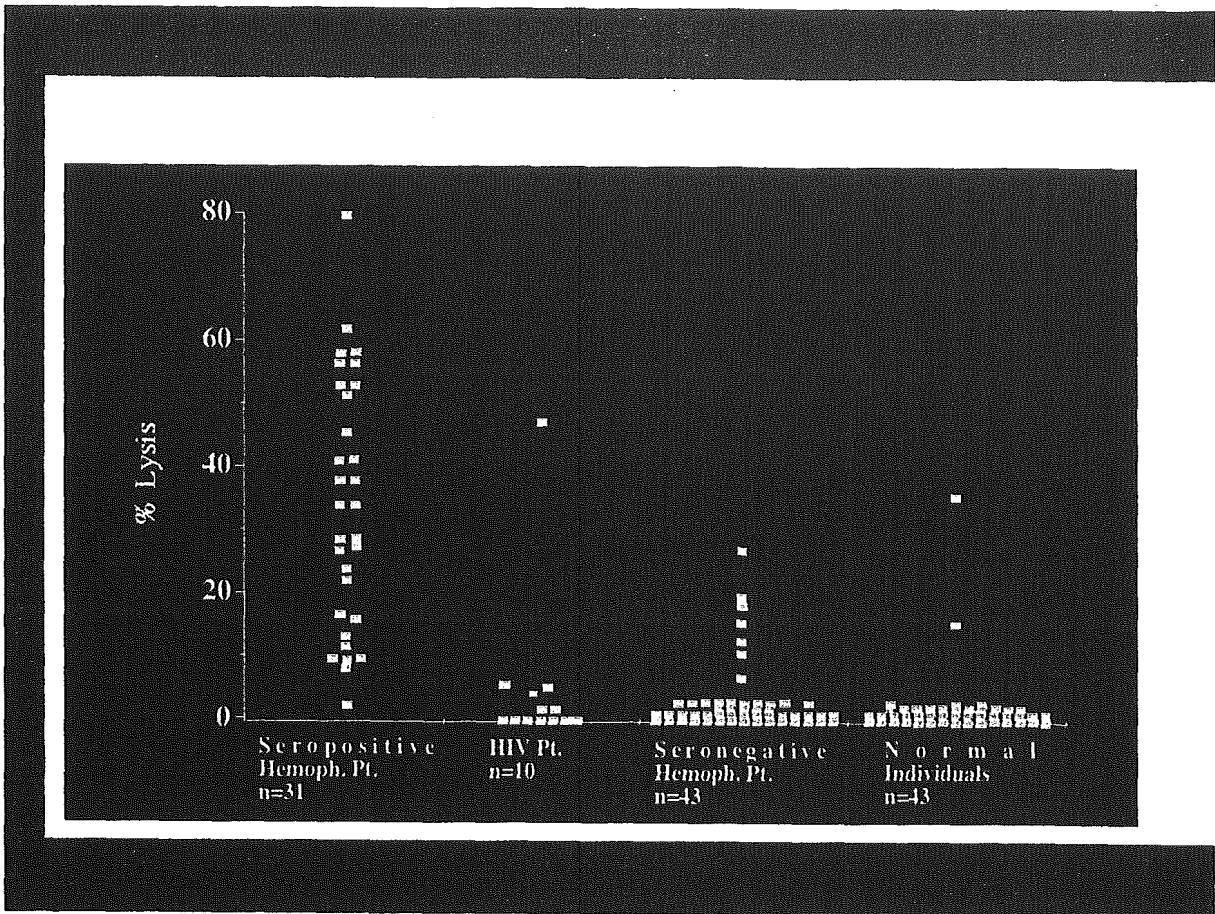


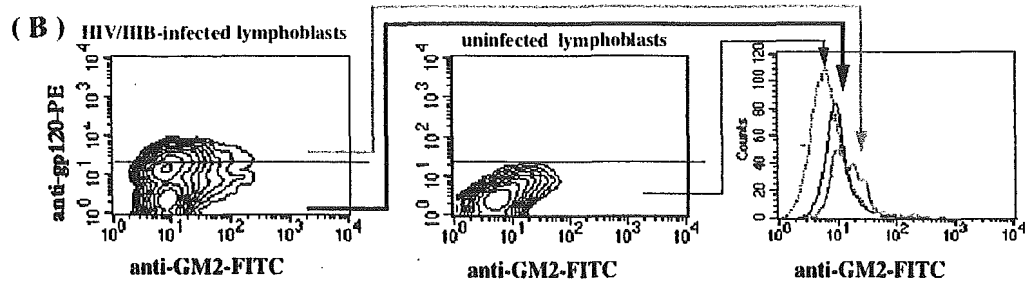
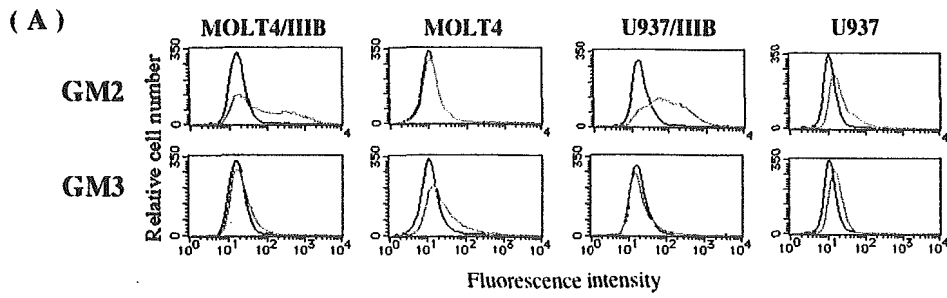
### IgM抗体 ..... 初期感染防御抗体

- IgM抗体は強力な補体活性化能を有し、同種補体制御膜因子の機能をオーバーカムして細胞膜を破壊して、細胞死を引き起こす。
- IgM抗体は抗原をクロスリンクして、細胞内シグナル誘導によるアポトーシス細胞死を引き起こす場合がある。
- HIV感染細胞に特異的に反応するヒトIgMモノクローナル抗体を作成し、これらのIgM抗体により感染細胞死を誘導して排除することによる、HIV感染症の治療法を開発する。

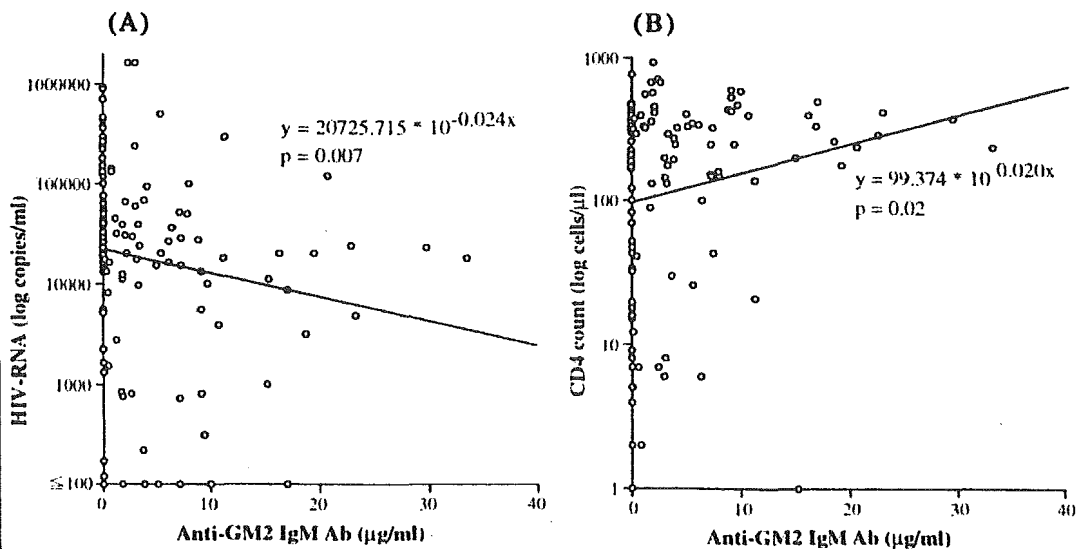
## 研究実施課題

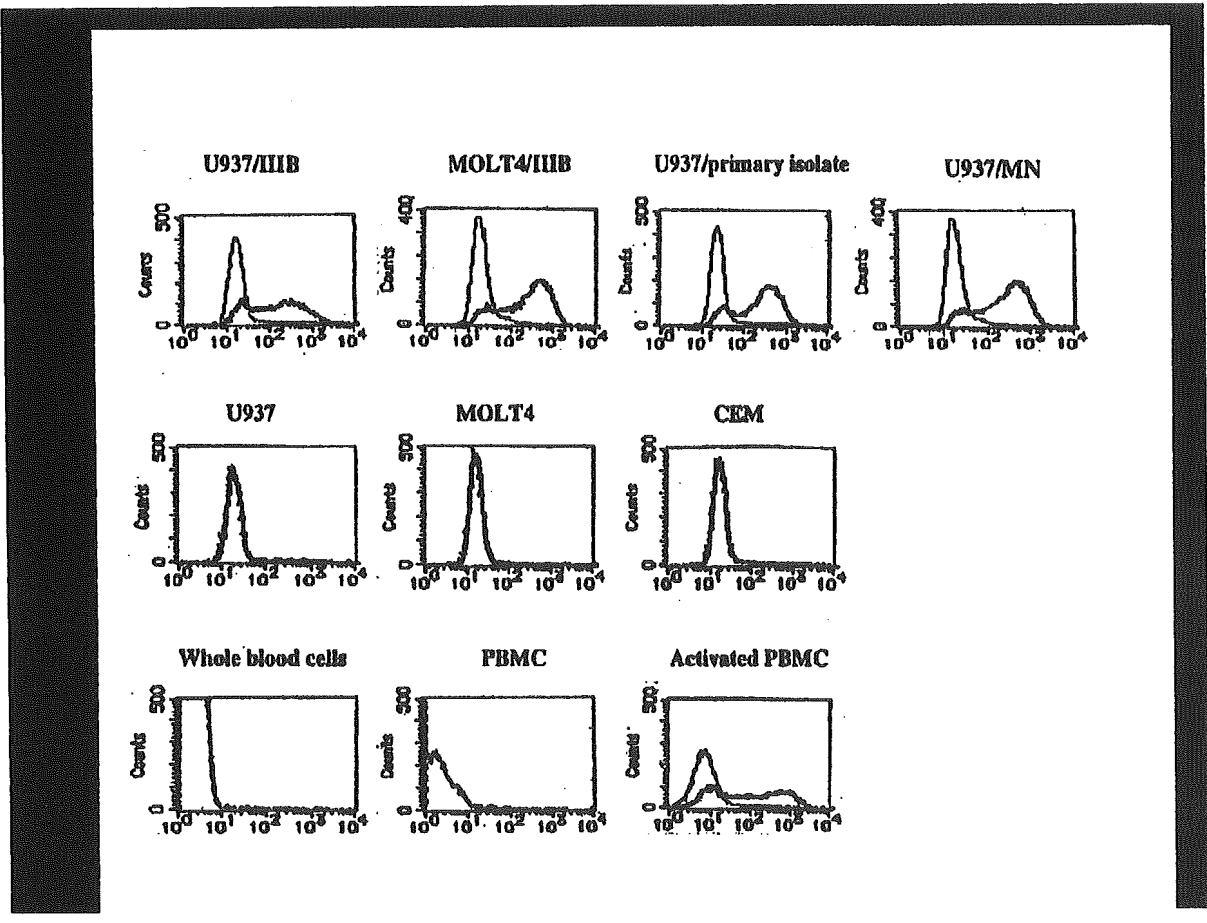
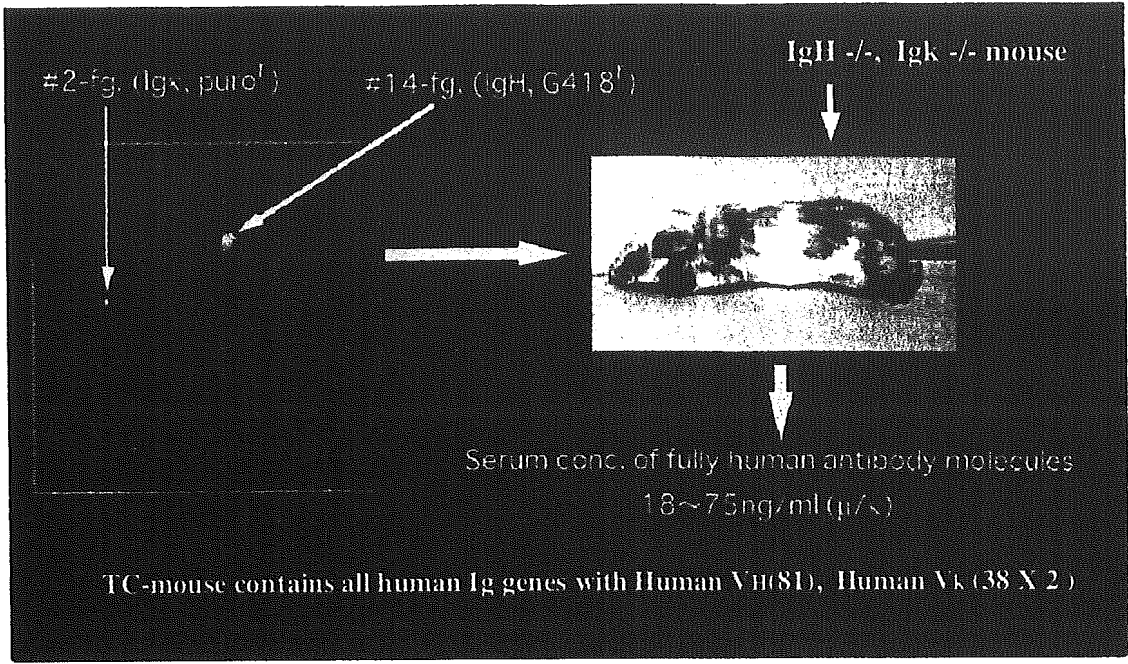
- HIV感染細胞に特異的に反応するヒトIgMモノクローナル抗体を産生する9F11, 2G9, CF8クローンを樹立した。
- 9F11抗体はHIV感染細胞に反応して補体依存性の細胞死を引き起こす。
- 2G9抗体はHIV感染細胞および潜伏感染細胞にも反応してアポトーシス誘導による細胞死を引き起こす。
- CF8抗体はNefに対する抗体であり、感染細胞に反応する。
- 9F11および2G9の反応する抗原分子を同定し、HIV感染症におけるこれらの抗原発現の意義を明確にする。
- Nefの細胞膜上での免疫標的としての意義を解明する。
- これらのヒトIgM抗体がHIV感染患者の血液中に含まれる感染細胞や、HAART成功例などでの潜伏感染細胞を排除することを立証し、HIV感染症の治療に有用であることを検証する。

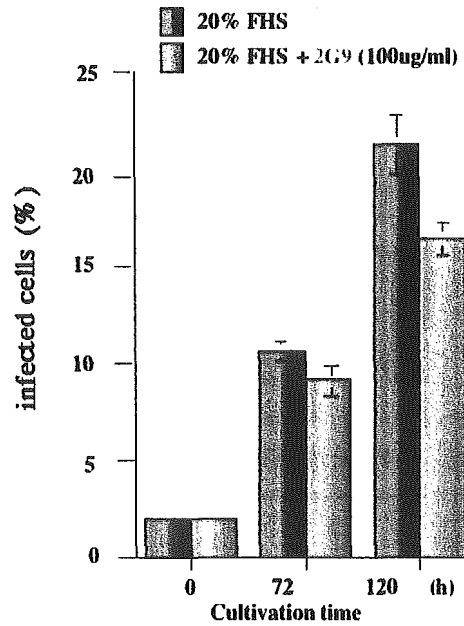
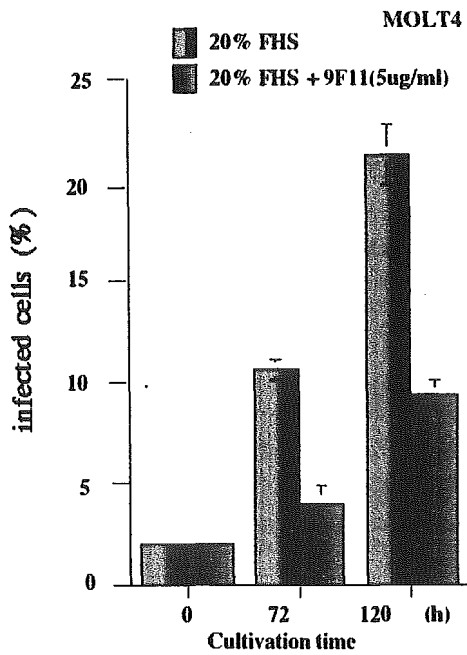
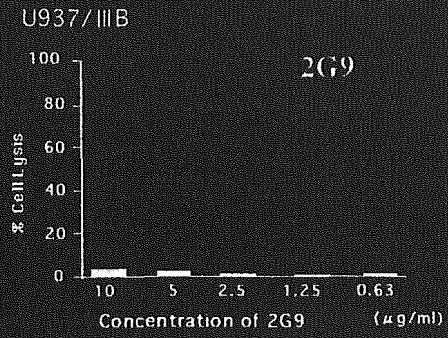
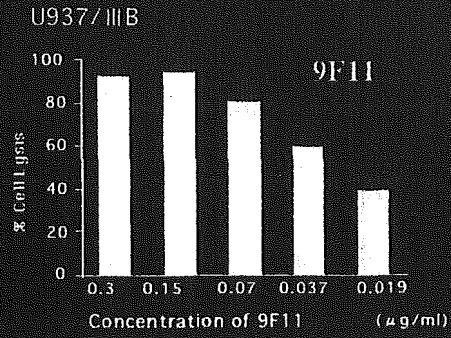
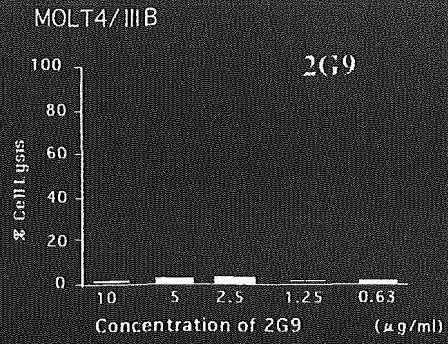
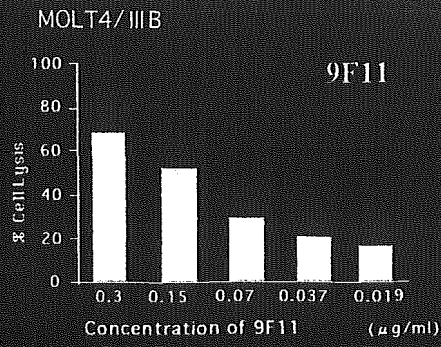


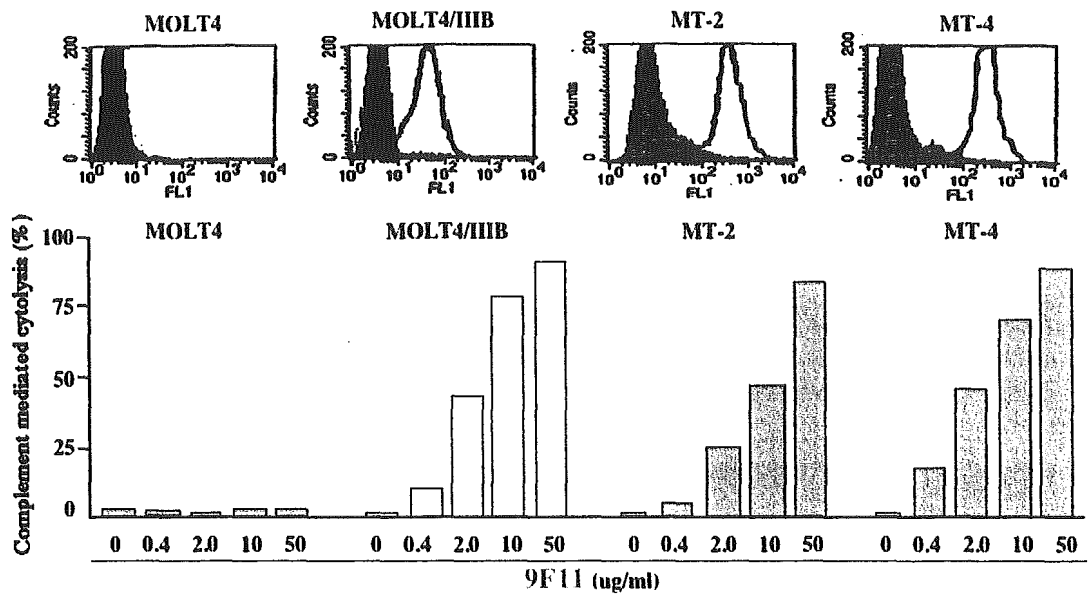


### Correlations between Anti-GM2 IgM Ab , HIV-RNA and CD4 counts



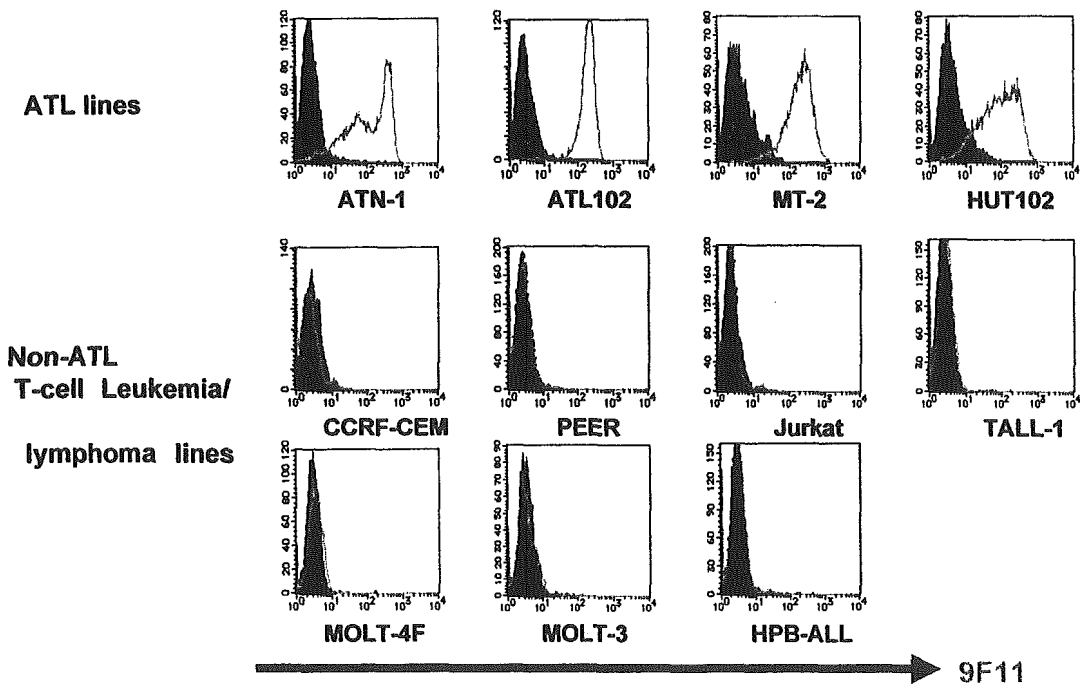






Each <sup>51</sup>Cr labeled cells were performed complement-mediated cytotoxicity assay of 9F11.

## 9F11 Antibody Specifically Reacted with ATL Cell Lines



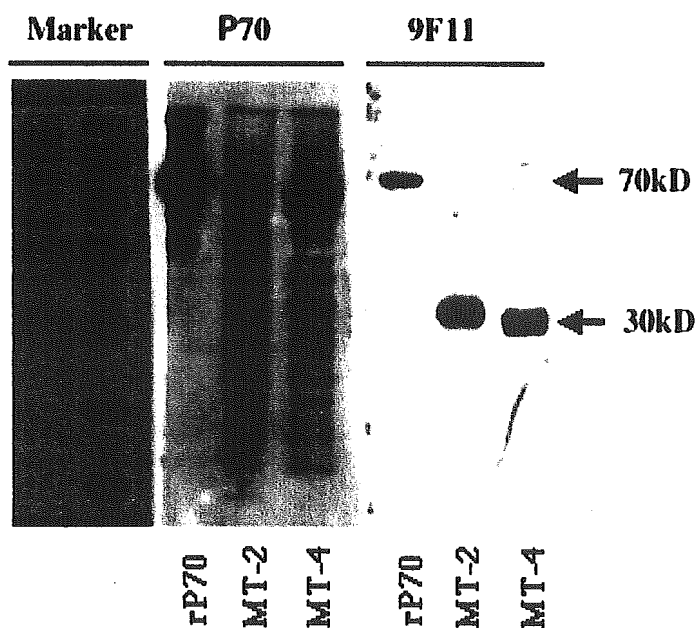


## 9F11抗原の同定

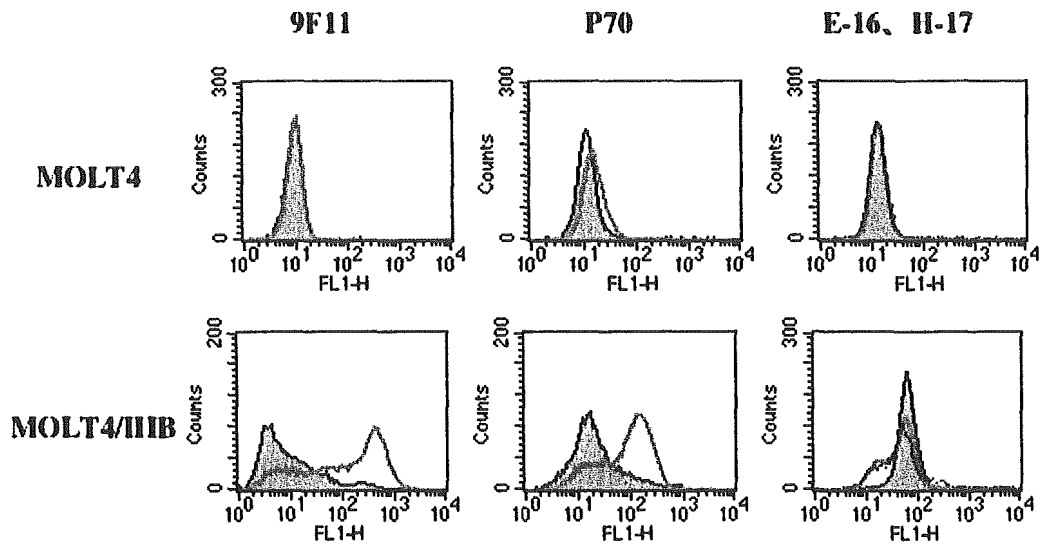
- 9F11が反応する抗原分子を特定するため、HIV感染細胞から作製したcDNAライブラリーを発現ベクターに組み込み、大腸菌等に導入発現させ、9F11抗体で9F11抗原のcDNAをスクリーニングした。
- 9F11と反応するタンパク質をコードする遺伝子を同定した。
- 70kDaの細胞内シグナル伝達に関わる分子として報告されていた分子であるが、細胞膜表面上に現れることは知られていなかったもので、新たな発見である(分子名はP70と仮称)。
- HIV感染におけるP70分子の細胞膜上での表出の意義を明らかにする。

## 9F11 Antibody Reacted with Recombinant P70 Protein on

### Western Blot analysis



## Rabbit polyclonal anti P70 antibody reacted with HIV-IIIB infected cells



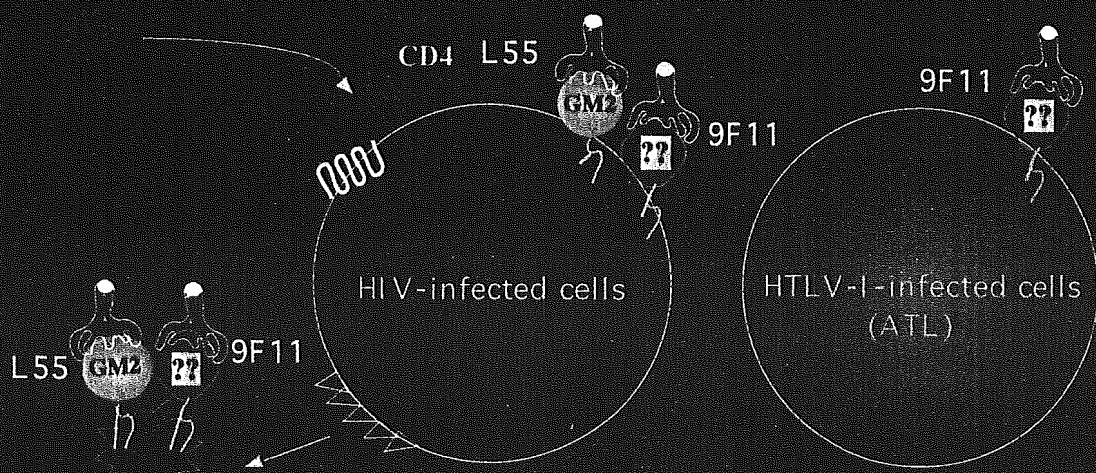
E-16 and H-17 are rabbit peptide antibodies to N-region and internal region of P70.

### 考察

- 9F11抗原は、HIV感染により発現誘導されて細胞膜上に現れる分子であることがわかった。
- HTLV-I感染細胞でも同様に発現するので、レトロウイルス感染に共通する現象の可能性もある。
- 9F11と反応する抗原分子は70kDaのシグナル伝達に関わる分子が同定された。しかし、9F11が反応する細胞には、他に30kDaの抗原分子が検出され、その点に関する解析が急務と考えている。
- HIV感染患者末梢血リンパ球に対する解析は検出限界以下であり、容易でなかったため、来年度への継続課題として残った。
- HTLV-I感染細胞に9F11が反応して細胞溶解を起こすので、ATLIに対する治療抗体としての活用も期待できる。
- 9F11などのヒトIgM抗体を大量に産生するには、遺伝子組換え法による大量産生法の確立が必要と考え検討を開始した。

Sequence	Antibody	$\mu$ -chain	$\kappa$ -chain
1) Nucleotide	2G9	VH3-21 ( 294 / 296 )	A20 ( 282 / 284 )
	9F11	VH6-1 ( 302 / 305 )	L5 ( 285 / 286 ) L19 ( 283 / 286 )
	L55	VH3-23 ( 286 / 290 )	B3 ( 299 / 301 )
2) Amino acid	2G9	VH3-21 ( 97 / 98 )	A20 ( 95 / 95 )
	9F11	VH6-1 ( 98 / 101 )	L5 ( 94 / 95 ) L19 ( 94 / 95 )
	L55	VH3-23 ( 98 / 98 )	B3 ( 99 / 100 )

### Human IgM monoclonal antibodies effective to HIV-1 infected cells and HTLV-I-infected cells



## 9F11 抗体のSIV感染サルリンパ球細胞に対する反応性

SIV(Mac 239株)を感染させて、10週間後に生存感染サルの末梢血よりリンパ球を分離し抗体の反応性を検討した。

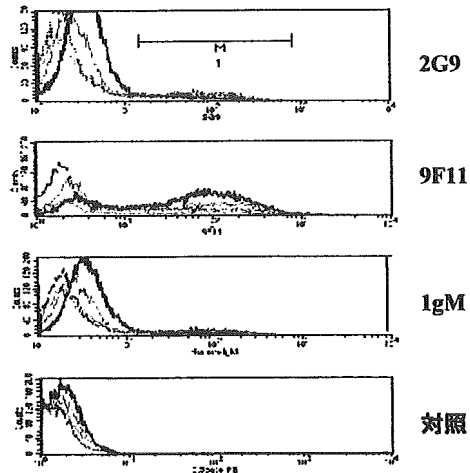


図: SIV感染サル末梢血白血球のIgM抗体反応性

## Effect of 9F11 on HIV propagation from patients CD4 lymphocytes ex vivo

Patient	P24 level ( pg/ml)		% Inhibition
	Control	9F11 (10 ug/ml)	
1	ND	ND	-
2	ND	ND	-
3	197.8	24.1	12.2
4	ND	ND	-
5	ND	ND	-
6	ND	ND	-
7	ND	ND	-

Patients CD4 lymphocytes reacted with 9F11 for 16hrs and washed with PBS, and then incubated with anti-CD3 and IL2 for 10 days.