

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4183754号
(P4183754)

(45) 発行日 平成20年11月19日(2008.11.19)

(24) 登録日 平成20年9月12日(2008.9.12)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5
C O 7 K 14/16 (2006.01)	C O 7 K 14/16 Z N A
請求項の数 5 (全 48 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願平10-501895	(73) 特許権者	プロジェニクス・ファーマスーティカルス・インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成9年6月13日(1997.6.13)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 O 5
(65) 公表番号	特表2001-503608 (P2001-503608A)		9 1、タリータウン、オールド・ソウ・ミル・リバー・ロード 7 7 7
(43) 公表日	平成13年3月21日(2001.3.21)	(73) 特許権者	アーロン・ダイヤモンド・エイズ・リサーチ・センター
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/010619		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 O O
(87) 国際公開番号	W01997/047319		1 6、ニューヨーク、ファースト・アベニュー 4 5 5、セブンス・フロアー
(87) 国際公開日	平成9年12月18日(1997.12.18)	(74) 代理人	弁理士 鈴江 武彦
審査請求日	平成16年6月11日(2004.6.11)		
(31) 優先権主張番号	08/665,090		
(32) 優先日	平成8年6月14日(1996.6.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/019,941		
(32) 優先日	平成8年6月14日(1996.6.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 H I V - 1 感染を阻害するためのケモカイン受容体の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) ヒト C C R 5 ケモカイン受容体の細胞外ドメインに存在する配列であり、且つ (2) 配列番号 7 に記載の配列を含む配列のポリペプチドであって、H I V - 1 の C D 4 + 細胞への融合を阻害するポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、前記ポリペプチドの配列が、配列番号 7 に記載の配列であるポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドと、キャリアとを含んでなる組成物。

10

【請求項 4】

H I V - 1 と C D 4 + 細胞との融合を阻害するための薬学的組成物であって、H I V - 1 と C D 4 + 細胞との融合を阻害するのに有効な量の請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドと、薬学的に許容可能なキャリアとを含んでなる薬学的組成物。

【請求項 5】

(1) ヒト C C R 5 ケモカイン受容体の細胞外ドメインに存在する配列であり、且つ (2) 配列番号 7 に記載の配列を含む配列のポリペプチドを含んでなる、H I V - 1 の C D 4 + 細胞への融合を阻害するための融合阻害剤。

【発明の詳細な説明】

本願は、1996年6月14日に出願された米国暫定出願公開番号第60/019,941号の優先権を主

20

張するものであり、その内容は参照文献として本願に取り込まれる。

本願に記載されている発明は、アメリカ合衆国保健社会福祉省国立衛生研究所のグラント AI35522、AI36057、AI36082、及びAI38573による補助の下でなされたものである。従って、合衆国政府は本発明に一定の権利を有する。

本願を通じて、様々な参照文献が括弧内にアラビア数字で引用されている。本発明の属する技術分野の現況をより完全に記述するために、これらの文献の開示内容全体は、本願明細書に参照文献として取り込まれる。これらの参照文献の完全な文献リストが、各実験の末尾に記載されている。

発明の背景

CD4⁺T細胞中での、初代非シンシチウム誘導性 (NSI ; non-syncytium-inducing) HIV-1単離株の複製は、C-Cβケモカイン類であるMIP-1α、MIP-1β及びRANTESによって阻害されるが(1,2)、T細胞株適応 (TCLA ; T-cell line adapted) 初代株又はシンシチウム誘導性 (SI ; syncytium-inducing) 初代株は非感受性である(2,3)。βケモカイン類は、リンパ系及び単球系の細胞上で活性を示す小さな(8kDa)近縁のタンパク質である(4-8)。それらの受容体は、7回膜貫通、Gタンパク質共役スーパーファミリーのメンバーであり、そのうちの一つ(LESTRオーファン受容体)が、TCLA HIV株の第二受容体として同定され、現在ではフシン(fusin)と名付けられている(9)。フシンがβケモカイン受容体であることは公知でない(7-9)。

発明の概要

本発明は、HIV-1のCD4⁺細胞への融合を阻害し、これにより細胞の感染を阻害することができる、ケモカイン受容体の一部の配列に対応する配列を有するポリペプチドを提供する。ある実施態様では、ケモカイン受容体は、C-C CKR-5である。CKR-5は、CCR5とも呼ばれている。別の実施態様では、ポリペプチドは、C-少なくとも一つのC-C CKR-5の細胞外ドメインの配列を有するアミノ酸を具備する。

ある好適な実施態様では、ケモカイン受容体の一部は、アミノ酸配列MDYQVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQIAAR(配列番号5)を具備する。別の好適な実施態様では、前記一部は、アミノ酸配列HYAAQWDFGNTMCQ(配列番号6)を具備する。さらに別の好適な実施態様では、前記一部は、アミノ酸配列RSQKEGLHYTCSSHPYSQYQFWKNFQTLKIV(配列番号7)を具備する。別の好適な実施態様では、前記一部は、アミノ酸配列QEFFGLNCCSSNRLDQ(配列番号8)を具備する。ケモカイン受容体C-C CKR-5の一部は、一以上の上記配列を具備し得る。ポリペプチドは、上記配列の一部であって、なおHIV-1感染を阻害し得る一部を含有してもよい。HIV感染を阻害するのに十分な最少アミノ酸数は、以下に示すRET又は感染アッセイによって決定し得る。

本発明は、有効量の一以上の上記ポリペプチド及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物も提供する。

本発明は、ケモカイン受容体C-C CKR-5に特異的に結合し得るHIV-1糖タンパク質の一部の配列に対応する配列を有するポリペプチドも提供する。

本発明は、ケモカイン受容体C-C CKR-5に特異的に結合し得るHIV-1糖タンパク質の一部の配列に対応する配列を有する有効量の一以上のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物を提供する。

本発明は、CD4⁺細胞上のケモカイン受容体に結合することができ、細胞のHIV-1感染を阻害し得る抗体又は抗体の一部を提供する。

本発明は、CD4⁺細胞上のケモカイン受容体に結合することができ、細胞のHIV-1感染を阻害し得る有効量の抗体及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物も提供する。

本発明は、患者に上記ポリペプチド、抗体、及び薬学的組成物を投与することを具備する、HIV-1に感染した患者の治療法を提供する。

本発明は、被験者に上記薬学的組成物を投与することを具備する、被験者がHIV-1に感染する率を減らす方法を提供する。

本発明は、CD4⁺細胞へのHIV-1の融合が阻害されるような量及び条件下で、ケモカイン受容体C-C CKR-5に結合し得る非ケモカイン剤とCD4⁺細胞を接触させることを具備する、HIV

10

20

30

40

50

-1がCD4⁺細胞に融合するのを阻害する方法を提供する。

本発明は、CD4⁺細胞へのHIV-1の融合が阻害されるような量及び条件下で、ケモカイン受容体C-C CKR-5に結合し得る非ケモカイン剤とCD4⁺細胞を接触させることによって、細胞のHIV-1感染を阻害することを具備する、CD4⁺細胞がHIV-1に感染するのを阻害する方法を提供する。

本発明は、ケモカイン受容体C-C CKR-5への結合及びHIV-1感染を阻害することができる非ケモカイン剤を提供する。

本発明は、非ケモカイン剤のケモカイン受容体への結合によって、リガンドが別の受容体に結合するのが妨害されないように、ケモカイン受容体以外のCD4⁺細胞の細胞表面受容体に結合し得るリガンドに連結された非ケモカイン剤を具備する、ケモカイン受容体C-C CKR-5への結合及びHIV-1感染を阻害することができる分子を提供する。

10

本発明は、HIV-1のCD4⁺細胞への融合を阻害するのに有効な相当量の上記分子及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物を提供する。

本発明は、非ケモカイン剤のインビボでの半減期を増加させ得る化合物に結合された非ケモカイン剤を具備する、ケモカイン受容体C-C CKR-5に結合することができ、HIV-1のCD4⁺細胞への融合を阻害し得る分子も提供する。

本発明は、さらに、CD4⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害するのに有効な非ケモカイン剤のインビボでの半減期を増加させ得る化合物に結合された非ケモカイン剤を具備する、ケモカイン受容体C-C CKR-5に結合することができ、HIV-1感染を阻害し得る相当量の分子及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物を提供する。

20

本発明は、被験者に上記薬学的組成物を投与することを具備する、被験者のHIV-1感染の率を減らす方法を提供する。

本発明は、患者に上記薬学的組成物を投与することを具備する、患者のHIV-1感染を治療する方法を提供する。

本発明は、ある非ケモカイン剤が、CD4⁺、C-C CKR-5⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害し得るかどうかを決定する方法であって、

(a) HIV-1のCD4⁺、C-C CKR-5⁺細胞への融合を阻害することが知られている薬剤の非存在下で、その表面上にHIV-1エンベロープ糖タンパク質を発現している細胞にCD4⁺、C-C CKR-5⁺細胞が融合し得る条件の下で、過剰の薬剤の存在下において、その表面上に適切なHIV-1エンベロープ糖タンパク質を発現している第二の色素で標識された細胞に、第一の色素で標識されたCD4⁺、C-C CKR-5⁺細胞を接触させ、第一及び第二の色素が、色素間の共鳴エネルギー移動を為し得るように選択されていることと；

30

(b) 融合が起これば共鳴エネルギー移動が生じる条件に、ステップ(a)の産物を接触させることと；

(c) 共鳴エネルギー移動が存在するかどうかを決定し、移動の不存在又は減少が、薬剤がCD4⁺及びC-C CKR-5⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害し得ることの指標であることと；

を具備する方法を提供する。

本発明は、ケモカイン受容体C-C CKR-5をコードする単離されたDNA分子を具備するヒト以外のトランスジェニック動物も提供する。ある実施態様では、該ヒト以外のトランスジェニック動物は、さらにHIV-1エンベロープ糖タンパク質を結合させ得るのに十分なCD4分子の一部をコードする単離されたDNA分子を具備する。

40

本発明は、さらに、ケモカイン受容体C-C CKR-5をコードする単離されたDNA分子及びフリンをコードする単離されたDNA分子を具備するヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。ある実施態様では、該ヒト以外のトランスジェニック動物は、さらにCD4分子の全長又はHIV-1エンベロープ糖タンパク質を結合するのに十分なCD4分子の一部をコードする単離されたDNA分子を具備する。

本発明は、ケモカイン受容体C-C CKR-5をコードする単離された核酸分子を具備する形質転換された細胞も提供する。

最後に、本発明は、前記ケモカイン受容体のケモカインへの結合能に、実質的に影響を与えずに、HIV-1感染を阻害することができ、ケモカイン受容体に結合し得る薬剤を提供す

50

る。

図面の説明

図 1 : β ケモカインによる HIV-1 複製の阻害の特異性、経時変化、及び段階 (1A) RANTES+MIP-1 α +MIP-1 β (R/M α /M β ; 各々 100ng/mL) とともに、PM1 細胞 (1×10^6) を 24 時間 (-24h) 又は 2 時間 (-2h) プレインキュベートした後、リン酸緩衝化生理的食塩水 (PBS) で二度洗浄した。HIV-1 (BaL env を補った) ウイルス (50ng の p24 ; 表 1 の脚注参照) を 2 時間添加した後、以前記載したように (10,11) 細胞溶離液中のルシフェラーゼ活性を測定する前に、細胞を 48 時間洗浄し、インキュベートした。ウイルスと R/M α /M β を細胞に同時に添加し、表記の時点 (1h、3h) で、細胞を PBS 中で二度洗浄し、培養液中に再懸濁して、ルシフェラーゼアッセイの前まで、48 時間インキュベートした。ゼロタイムは、 β ケモカインが全く添加されていないポジティブコントロールである。+2h とは、PBS 中で二度洗浄する前に細胞とウイルスを 2 時間混合し、R/M α /M β を添加して、ルシフェラーゼアッセイの前にさらに 48 時間培養を継続することを表す。

(1B) 500ng/mL の RANTES (レーン 1 及び 5)、又は MIP-1 β (レーン 2 及び 6) の存在下、又は β ケモカイン非存在下 (レーン 4 及び 8) で、CEM 細胞 (NL4/3 ; レーン 1-4) 又はマクロファージ中 (ADA ; レーン 5-8) で増殖させた HIV-1 (500pgp24) を PM1 細胞 (1×10^6) に感染させた。レーン 3 及び 7 は、ネガティブコントロール (ウイルスなし) である。PCR アッセイに用いた全てのウイルス株は、DNase によって、37 ° で 30 分間処置し、使用前に DNA の混入をテストした。2 時間後に、細胞を洗浄して、同一のケモカインを含有する培地中にさらに 8 時間時間後に、細胞を洗浄して、同一のケモカインを含有する培地中にさらに 8 時間再懸濁した。次に、DNA/RNA 単離キット (US Biochemicals) を用いて感染した細胞から DNA を抽出した。ネステッド PCR の第一ラウンドは、プライマー : U3+, 5' -CAA GGCTACTTCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGG-3' (配列番号 1) preGag, 5' -AGCAAGCCGAGTCTCT GCGTCGAGAG-3' (配列番号 2) を用い、ネステッド PCR の第二ラウンドは、プライマー : L TR-テスト、5' -GGGACTTTCCTGGGACTTTTC3' (配列番号 3) LRC2, 5' -CCTGTTCGGGCGCCAC TGCTAGAGATTTTCCAC3' (配列番号 4) を用いてパーキンエルマー 2400 サイクル中で、以下の増幅サイクル (94 ° 5 分間、94 ° 30 秒、55 ° 30 秒、72 ° 30 秒、72 ° 7 分間 35 サイクル) で行った。M は 1kb DNA ラダーを示し、1,10,100,1000 は参照プラスミド (pAD8) コピーの数を示す。該アッセイは、100 コピーの逆転写物を検出することができる。

図 2 : HIV-1 env を介した、C-C CKR-5 を一過性に発現している細胞の膜融合 HeLa 細胞中に発現された β ケモカイン受容体によって介される膜融合は、以下のように実証した。リポフェクチン (Gibco BRL) を用いて、対照プラスミド pcDNA3.1 又はプラスミド pcDNA3.1-CKR 構築物を細胞にトランスフェクトした。pcDNA3.1 プラスミドは、T7 ポリメラーゼプロモーターを担持し、 β ケモカイン受容体の一過性発現は、リポフェクションから 4 時間後に T7 ポリメラーゼ (vFT7.3) をコードする 1×10^7 pfu のワクシニアに細胞を感染することにより強化した (9)。次に、R18 含有培地中で、一晚細胞を培養して、それらが HeLa-JR-FL 細胞 (黒塗りのカラム) 又は HeLa-BRU 細胞 (斜線のカラム) と融合する能力を RET アッセイでテストした。対照 HeLa 細胞の %RET は、トランスフェクトされたプラスミドにかかわらず、3 ~ 4 % の間であった。

図 3 : CCR-5 への結合に対する gp120 と MIP1 β との、CD4-依存性の競合

(3A) JR-FL gp120 (黒四角)、LAI gp120 (黒三角)、JR-FL- Δ V3gp120 (白四角) 又は LAI- Δ V3gp120 (白三角) を活性化された CD4 $^+$ T 細胞に添加し、特異的な 125 I-MIP-1 β 結合の程度を決定した。示されているデータは、三つの独立した実験の平均であり、各実験は二回行った。

(3B) モノクローナル抗体 Q4120 (黒丸) 又は sCD4 (黒四角) の存在下で、活性化された CD4 $^+$ T 細胞に JR-FL gp120 ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$) 及び 125 I-MIP-1 β (0.1nM) を表記の濃度で添加した。特異的な 125 I-MIP-1 β 結合の程度を決定して、gp120 競合効果のパーセント阻害を各抗体濃度について算出した (全く存在しないのが、0 % 阻害である)。示されている実験は、行った二つのうちの一つであり、各々同様の結果を得た。

図 4 : CCR の予測された 4 つの細胞外ドメインへの突然変異導入

ヒトCCR5アミノ末端のアミノ酸配列 (Nt) 及び三つの細胞外ループ (ECL1-3) が示されている (第三の実験の19,20)。主配列の下に、電荷を有する残基の極性 (+ 又は -) が、マウスのCCR5と異なっている残基の同定とともに示されている。負の電荷を有するヒトCCR残基 (白四角)、及び正の電荷を帯びた側鎖 (黒四角)、及びマウスCCR5と電荷が異なる残基 (白丸) は全て、PCR又は部位特異的突然変異導入によってアラニンに修飾した。CCRコード領域全体の両ストランドを配列決定することにより、正確さを確認した。ある場合には、それらのドメインの正味の全電荷を保存するために、二重変異体K171A/E172A、K191A/N192A、及びR274A/D276Aを作成した。Ntダブル変異体及びトリプル変異体、D2A/D11A及びD2A/D11A/E18Aは、単一残基変異体を用いた最初の結果に基づいた。

図5：CCR5変異体のHIV-1共受容体 (co-receptor) 機能

10

HIV-1の侵入に対する、(A) 負に帯電した残基；(B) 正に帯電した残基；(C) ヒトの配列と異なる選択したマウスの残基中の置換の影響をテストした。U87MG-CD4細胞をCCR5変異体で一過性にリポフェクションし、続いて、NLluc/ADA (濃い斜線の棒)、NLluc/JR-FL (薄い斜線の棒)、又はNLluc/DH123 (白い棒) ルシフェラーゼ発現キメラウイルス (第三の実験の1,2) で感染させた。ルシフェラーゼ活性 (luc c.p.s.) を感染から72時間後に測定し (1,2)、リポフェクション効率及び受容体の発現レベルについて標準化した。X軸上に示された各変異体の共受容体活性は、野生型共受容体活性 (100%) のパーセントで表示され、三つの独立した実験の平均 $\pm$ s.d. であり、各実験は各々4回行った。(*) は、そのアミノ酸がマウスCCR5でも異なっていることを示している。同様の結果 (図には示されていない) が、SCL-1-CD4細胞でも得られた。

20

図6：CCR5 Nt変異体の膜融合活性

HeLa-CD4細胞を表記のNt変異体 (又はpcDNA3.1ネガティブコントロールプラスミド) でリポフェクションし、48時間後に、それらがJR-FL env遺伝子を発現しているHeLa細胞と融合する能力をテストした (黒いバー) (第三の実験の1.18)。共受容体発現を増大させるために、vFT7polシステムを用いた (斜線のバー) (第三の実験の1,4,5,13)。RETアッセイを用いて細胞-細胞融合の程度を決定した (第三の実験の1.18)。示されている%RET値は、各実験について二回行った三つの独立した実験の平均 $\pm$ s.d. である。

図7：CCR5結合に対するgp120とCCR5 Mab 2D7間の競合

2ng/mLのPEラベルされた2D7MAbを添加する前 (第三の実験の23,24)、及び平均蛍光強度 (m.f.i.) を決定するためのFACS分析の前に、CD4と野生型CCR5又は変異体CCR5の何れかを同時トランスフェクトし、受容体発現を増加させるためにvFT7polで感染させたHeLa細胞を10 μ g/mLのgp120 (JR-FL) (7) 加えて、又は加えずにブレインキュベートした。2D7-PE結合の阻害は、 $[1 - (\text{gp120を加えたm.f.i.} / \text{gp120を加えないm.f.i.})] \times 100\%$ で表されており、三つの独立した実験の平均 $\pm$ s.d. である。

30

図8：(B) CCR5⁻及び(B) CCR5⁺L1.2細胞、マウスプレBリンパ腫系へのsCD4-gp120複合体の結合のフローサイトメトリー分析

sCD4とビオチン化されたHIV-1_{JR-FL} gp120の等モル濃度 (~100nM) 混合物とともに、細胞を15分間インキュベートした後、ストレプトアビジン-フィコエリトリン抱合体を用いて染色し、2%ホルムアルデヒドで固定し、FACSによって分析した。Y軸に細胞数をプロットした。

40

図9：sCD4と複合体を形成したHIV-1JR-FL gp120のブチレート処理されたL1.2 CCR5⁺細胞への結合の阻害

阻害剤は、X軸上に示された濃度のCCケモカインMIP-1 β 又はRANTESであった。

図10：バイサイクラム (bicyclam) JM3100によるHIV-1エンベロープを介した細胞融合の阻害

阻害は、表記の細胞の組み合わせで、RETアッセイを用いて測定した。

発明の詳細な説明

本発明は、HIV-1のCD4+細胞への融合を阻害することができ、これにより細胞の感染を阻害し得るケモカイン受容体の一部の配列に対応する配列を有するポリペプチドを提供する。ある実施態様では、ケモカイン受容体は、C-C CKR-5 (CCR5) である。別の実施態様で

50

は、断片は、少なくとも一つのケモカイン受容体C-C CKR-5の細胞外ドメインを具備する。さらなる実施態様では、細胞外ドメインは、CCR5の第二の細胞外ループである。

別の実施態様では、ケモカイン受容体はCCR3又はCKR-2bである(31,32)。

ケモカイン受容体の一部の配列には、元のアミノ酸又は該受容体から得られる被修飾アミノ酸、それらの誘導体及び類縁体が含まれる。このような配列は、HIV-1感染を阻害する能力を保持しているものでなければならない。フシンの配列も含まれる。

ある好適な実施態様では、ケモカイン受容体の一部は、アミノ酸配列MDYQVSSPIYDINYTTSEPCQKINVKQIAAR(配列番号5)を具備する。別の好適な実施態様では、前記一部は、アミノ酸配列HYAAAQWDFGNTMCQ(配列番号6)を具備する。さらに別の好適な実施態様では、前記一部は、アミノ酸配列RSQKEGLHYTCSSHPYSQYQFWKNFQTLKIV(配列番号7)を具備する。別の好適な実施態様では、前記一部は、アミノ酸配列QEFFGLNNCSSSNRLDQ(配列番号8)を具備する。ケモカイン受容体C-C CKR-5の一部は、一以上の上記配列を具備し得る。ポリペプチドは、上記配列の一部であって、なおHIV-1感染を阻害し得る一部を含有してもよい。HIV-1感染を阻害するのに十分な最少アミノ酸数は、以下に示すRET又は感染アッセイによって決定し得る。

上述のポリペプチドは、断片が他の分子に連結されているような融合分子であり得る。ある実施態様では、分子はCD4ベースの分子である。CD4ベースの分子は本分野で公知であって、アラウェイら(Allaway et al.(1996))、特許協力条約出願PCT/US95/08805、公開番号WO96/02575に記載されており、その内容を参照文献として本願に取り込む。別の実施態様では、ポリペプチドは、ケモカイン受容体の一以上の部分を複数ユニット含有する。ある好適な実施態様では、ポリペプチドは、ケモカイン受容体C-C CKR-5の一以上の細胞外ドメインの複数ユニットに対応する配列を含有する。

本発明は、有効量の上記ポリペプチド及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物も提供する。

本明細書で用いる「薬学的に許容される担体」とは、PBS溶液、水、及びエマルジョン(油/水又は水/油エマルジョンなど)、及び様々なタイプの湿潤剤(wetting agent)のような任意の標準的薬学的担体を含む。

本発明は、化学受容体(chemoreceptor)C-C CKR-5に特異的に結合し得るHIV-1エンベロープ糖タンパク質の一部の配列に対応する配列を有するポリペプチドも提供する。このような配列は、日常的な実験によって同定し得る。例えば、gp120又はgp41の断片に相当するオーバーラップしている合成ペプチドが、HIV-1の臨床単離株のエンベロープ糖タンパク質を発現している細胞とCD4及びC-C CKR-5を発現している細胞との融合を阻害する能力をRETアッセイでテストすることができる。該アッセイで融合を阻害するペプチドが、実験室用に適合された(laboratory-adapted)HIV-1株のエンベロープ糖タンパク質によって介される融合を阻害する能力もRETアッセイでスクリーニングされ、後者のアッセイで阻害性を示すペプチドは破棄する。別の方法として、ペプチドが、C-C CKR-5を発現している細胞へのケモカインの結合と競合する能力についてテストしてもよい。

本発明は、ケモカイン受容体C-C CKR-5に特異的に結合し得るHIV-1糖タンパク質の断片を具備する有効量のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物を提供する。

本発明は、CD4⁺細胞上のケモカイン受容体に結合することができ、細胞のHIV-1感染を阻害し得る抗体又は抗体の一部を提供する。

本発明は、ケモカイン受容体に結合してHIV-1感染を阻害し得る有効量の抗体及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物も提供する。

本発明は、患者に上記薬学的組成物を投与することを具備するHIV-1に感染した患者を治療する方法を提供する。

本発明は、被験者に上記薬学的組成物を投与することを具備する、被験者がHIV-1に感染する率を減らす方法を提供する。

本発明は、CD4⁺細胞へのHIV-1の融合が阻害されるような量及び条件下で、ケモカイン受容体C-C CKR-5に結合し得る非ケモカイン剤とCD4⁺細胞を接触させることを具備する、CD4

10

20

30

40

50

⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害する方法を提供する。

本発明は、CD4⁺細胞へのHIV-1の融合が阻害されるような量及び条件下で、ケモカイン受容体C-C CKR-5に結合し得る非ケモカイン剤とCD4⁺細胞を接触させることによって細胞のHIV-1感染を阻害することを具備する、CD4⁺細胞へのHIV-1の感染を阻害する方法を提供する。

本発明の非ケモカイン剤は、ケモカイン受容体に結合してCD4⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害することができる。非ケモカイン剤にはケモカイン断片及びケモカイン誘導体及び類縁体が含まれるが（これらには限定されない）、天然のケモカインは含まれない。

ある実施態様では、非ケモカイン剤はオリゴペプチドである。別の実施態様では、非ケモカイン剤はポリペプチドである。さらに別の実施態様では、非ケモカイン剤は非ペプチド剤である。

10

本発明は、ケモカイン受容体C-C CKR-5への結合及びCD4⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害することができる非ケモカイン剤を提供する。

本発明は、非ケモカイン剤のケモカイン受容体への結合によって、リガンドが別の受容体に結合するのが妨害されないように、ケモカイン受容体以外のCD4⁺細胞の細胞表面受容体に結合し得るリガンドに連結された非ケモカイン剤を具備する、ケモカイン受容体C-C CKR-5への結合及びCD4⁺細胞へのHIV-1融合を阻害することができる分子を提供する。ある実施態様では、細胞表面受容体はCD4である。別の実施態様では、リガンドは抗体又は抗体の一部を具備する。

本発明は、CD4⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害するのに有効な相当量の上記分子及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物を提供する。

20

本発明は、非ケモカイン剤のインビボでの半減期を増加させ得る化合物に結合された非ケモカイン剤を具備する、ケモカイン受容体C-C CKR-5に結合することができ、HIV-1のCD4⁺細胞への融合を阻害し得る分子も提供する。ある実施態様では、該化合物はポリエチレングリコールである。

本発明は、さらに、CD4⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害するのに有効な非ケモカイン剤のインビボでの半減期を増加させ得る化合物に結合された非ケモカイン剤を具備する、ケモカイン受容体C-C CKR-5に結合することができ、CD4⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害し得る相当量の分子及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物を提供する。

本発明は、被験者に上記薬学的組成物を投与することを具備する、被験者がHIV-1に感染する率を減少させる方法を提供する。

30

本発明は、患者に上記薬学的組成物を投与することを具備する、患者のHIV-1感染を治療する方法を提供する。

本発明は、ある非ケモカイン剤が、CD4⁺、C-C CKR-5⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害し得るかどうかを決定する方法であって、

(a) HIV-1のCD4⁺、C-C CKR-5⁺細胞への融合を阻害することが知られている薬剤の非存在下で、その表面上にHIV-1エンベロープ糖タンパク質を発現している細胞にCD4⁺、C-C CKR-5⁺細胞が融合し得る条件の下で、過剰の薬剤の存在下において、その表面上に適切なHIV-1エンベロープ糖タンパク質を発現している第二の色素で標識された細胞に、第一の色素で標識されたCD4⁺、C-C CKR-5⁺細胞を接触させ、第一及び第二の色素が、色素間の共鳴エネルギー移動を為し得るように選択されていることと；

40

(b) 融合が起これば共鳴エネルギー移動が生じる条件に、ステップ(a)の産物を接触させることと；

(c) 共鳴エネルギー移動が存在するかどうかを決定し、移動の不存在又は減少が、薬剤がCD4⁺及びC-C CKR-5⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害し得ることの指標であることと；

を具備する方法を提供する。ある実施態様では、前記薬剤はオリゴペプチドである。別の実施態様では、前記薬剤はポリペプチドである。さらに別の実施態様では、前記薬剤は非ペプチド性薬剤である。さらなる実施態様では、前記CD4⁺細胞はPM1細胞である。別の実施態様ではHIV-1エンベロープ糖タンパク質を発現している細胞は、HIV-1_{JR-FL}gp120/gp41を発現しているHeLa細胞である。

50

本発明は、ケモカイン受容体C-C CKR-5をコードする単離されたDNA分子を具備するヒト以外のトランスジェニック動物も提供する。ある実施態様では、該ヒト以外のトランスジェニック動物は、さらにHIV-1エンベロープ糖タンパク質を結合させ得るのに十分なCD4分子の一部をコードする単離されたDNA分子を具備する。

本発明は、さらに、ケモカイン受容体C-C CKR-5をコードする単離されたDNA分子及びフリンをコードする単離されたDNA分子を具備するヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。ある実施態様では、該ヒト以外のトランスジェニック動物は、さらにHIV-1エンベロープ糖タンパク質を結合するのに十分なCD4分子の一部をコードする単離されたDNA分子を具備する。

例えばマウスを用いて、トランスジェニック動物を作成するのに利用できる一つの手段は以下の通りである。メスのマウスを交配させ、生じた受精卵を卵管から摘出する。該卵をM2培地のような適切な培地中に保存する（Hogan B.ら、Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1986)）。本分野で周知の方法により、C - C CKR - 5ケモカイン受容体又はCD4をコードするDNA又はcDNAをベクターから精製する。誘導性プロモーターをDNAのコード領域に融合して、トランス遺伝子の発現を調節するための実験的手段を得てもよい。これに代えて又はこれに加えて、組織特異的制御要素をコード領域と融合して、トランス遺伝子の組織特異的発現を可能にしてもよい。適切に緩衝化された溶液中で、マイクロインジェクションニードル（これはピペット吸器を用いて細管から作成し得る）の中に該DNAを入れて、凹面スライドガラスに該卵を注入する。該ニードルを該卵の前核に挿入し、前記DNAの溶液を注入する。次に、該注入された卵を偽妊娠マウス（妊娠を維持するために適切なホルモンで刺激されているが、実際には妊娠していないマウス）の卵管に移植し、これが子宮に移行して、着床し、出産まで成長する。上述したように、マイクロインジェクションは、卵細胞中にDNAを挿入するための唯一の方法ではなく、ここでは例示のために用いただけである。

本発明は、ケモカイン受容体C-C CKR-5をコードする単離された核酸分子を具備する形質転換された細胞を提供する。

本発明は、前記ケモカイン受容体のケモカインへの結合能に、実質的に影響を与えずに、HIV-1感染を阻害することができ、ケモカイン受容体に結合し得る薬剤も提供する。

本明細書において、「実質的に影響を与えずに」とは、薬剤のケモカイン受容体への結合の後に、ケモカイン受容体が、なおケモカインに結合できなければならないことを意味する。ある条件下では、薬剤がケモカイン受容体に結合した後は、ケモカイン受容体が薬剤に結合していないときに見られる結合の程度を達成するためにより高濃度のケモカインが必要とされる。該薬剤の好適な実施態様では、同一の結合を達成するために必要とされるケモカイン濃度は2倍である。別の実施態様では、ケモカイン濃度は10倍である。

本発明の好適な実施態様では、ケモカイン受容体はCCR5である。別の実施態様では、ケモカイン受容体はCXCR4、CCR3、又はCCR-2bである。

該薬剤は、オリゴペプチド、非ペプチド性薬剤、又はポリペプチドであり得る。あるいは、該薬剤は抗体又は抗体の一部であり得る。

本発明は、さらに、CD4⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害するのに有効な相当量の上記薬剤及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物を提供する。

本発明は、CD4⁺細胞のHIV-1感染を阻害する方法であって、HIV-1感染を阻害することができ、前記ケモカイン受容体がケモカインに結合する能力に実質的に影響を与えずにケモカイン受容体に結合し得る薬剤にこのようなCD4⁺細胞を接触させることを具備する方法を提供する。

本発明は、ケモカイン受容体CCR5に結合することができ、前記ケモカイン受容体が、非ケモカイン剤のインビボでの半減期を増加させ得る化合物に連結されたケモカインに、前記ケモカイン受容体が結合する能力に実質的に影響を与えずに、CD4⁺細胞へのHIV-1の融合を阻害し得る分子も提供する。ある実施態様では、前記化合物はポリエチレングリコールである。

本発明は、HIV-1感染を阻害するのに有効な相当量の上記分子及び薬学的に許容される担

10

20

30

40

50

体を具備する薬学的組成物を提供する。

本発明は、被験者に上記薬学的組成物を投与することを具備する、被験者がHIV-1に感染する率を減らす方法を提供する。

本発明は、患者に上記薬学的組成物を投与することを具備する、患者のHIV-1感染を治療する方法を提供する。

本発明は、ある薬剤がHIV-1感染を阻害し得るかどうかを決定する方法であって、

- (a) ケモカイン受容体を固相マトリックス上に固定化することと；
 - (b) 薬剤のケモカイン受容体への結合を可能とする条件下で、固定化されたケモカイン受容体と前記薬剤を接触させることと；
 - (c) 未結合の薬剤を除去することと；
 - (d) 前記薬剤の非存在下でgp120/CD4複合体とケモカイン受容体が結合できる条件で、CD4の存在下において、gp120とステップ(c)で得られた固定化されたケモカイン受容体を接触させることと；
 - (e) 結合したgp120/CD4複合体の量を測定することと；及び
 - (f) 前記薬剤の非存在下で決定した量とステップ(d)で決定された量を比較し、量の減少が、前記薬剤がHIV-1感染を阻害し得ることの指標となること；
- というステップを具備する方法を提供する。

10

本発明は、ある薬剤がHIV-1感染を阻害し得るかどうかを決定する方法であって、

- (a) ケモカイン受容体を固相マトリックス上に固定化することと；
 - (b) 固定化されたケモカイン受容体と前記薬剤を接触させることと；
 - (c) 前記薬剤の非存在下でgp120/CD4複合体とケモカイン受容体が結合できる条件で、CD4の存在下において、gp120とステップ(b)の混合物を接触させることと；
 - (d) 結合したgp120/CD4複合体の量を測定することと；及び
 - (e) 前記薬剤の非存在下で決定した量とステップ(d)で決定された量を比較し、量の減少が、前記薬剤がHIV-1感染を阻害し得ることの指標となること；
- というステップを具備する方法も提供する。

20

本発明は、ある薬剤がHIV-1感染を阻害し得るかを決定する方法であって、

- (a) gp120/CD4複合体を固相マトリックス上に固定することと；
 - (b) 薬剤のgp120/CD4複合体への結合を可能とする条件下で、固定化されたgp120/CD4複合体と前記薬剤を接触させることと；
 - (c) 未結合の薬剤を除去することと；
 - (d) 前記薬剤の非存在下でgp120/CD4複合体とケモカイン受容体が結合できる条件で、ケモカイン受容体とステップ(c)で得られた固定化されたgp120/CD4複合体を接触させることと；
 - (e) 結合したケモカイン受容体の量を測定することと；及び
 - (f) 前記薬剤の非存在下で決定した量とステップ(e)で決定された量を比較し、量の減少が、前記薬剤がHIV-1感染を阻害し得ることの指標となること；
- というステップを具備する方法も提供する。

30

本発明は、ある薬剤がHIV-1感染を阻害し得るかどうかを決定する方法であって、

- (a) gp120/CD4を固相マトリックス上に固定化することと；
 - (b) 固定化されたgp120/CD4複合体と前記薬剤を接触させることと；
 - (c) 前記薬剤の非存在下でgp120/CD4複合体とケモカイン受容体が結合できる条件で、ケモカイン受容体とステップ(b)の混合物を接触させることと；
 - (d) 結合したケモカイン受容体の量を測定することと；及び
 - (e) 前記薬剤の非存在下で決定した量とステップ(d)で決定された量を比較し、量の減少が、前記薬剤がHIV-1感染を阻害し得ることの指標となること；
- というステップを具備する方法も提供する。

40

これらのアッセイで用いる場合、CD4には、可溶性CD4、gp120を結合し得るCD4のgp120結合部位を取り込み、gp120が適切なケモカイン受容体に結合するのを可能とするCD4の断片又はポリペプチドが含まれる。

50

これらのアッセイで用いる場合、gp120は、HIV-1の適切な株から得たgp120である。例えば、マクロファージ指向性臨床単離株HIV-1_{JR-FL}から得たgp120は、ケモカイン受容体CCR5に結合するのに対して、実験室に適合させたT指向性株HIV-1_{LA1}は、ケモカイン受容体CXCR4に結合する。

上記方法の好適な実施態様において、CD4は可溶性CD4である。上記アッセイに使用し得るケモカイン受容体には、CCR5、CXCR4、CCR3及びCCR-2bが含まれる。

ある実施態様では、ケモカイン受容体は細胞上に発現されている。ある好適な実施態様では、細胞はL1.2細胞である。別の実施態様では、ケモカイン受容体は精製されて、リボソーム中に再構成される。リボソームの脂質二重層中に埋め込まれたこのようなケモカイン受容体は、受容体のgp120結合活性を保持している。

上記アッセイでは、gp120、CD4、又は両者を検出可能なマーカーで標識してもよい。本発明においては、放射性同位体又は西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素を含むマーカーを使用し得る。

ある実施態様では、gp120又はCD4又はケモカイン受容体は、ビオチンでラベルされる。さらなる実施態様では、ビオチン化されたgp120、又はCD4、又はケモカイン受容体は、

(i) ストレプトアビジン-フィコエリトリンとインキュベートすること；
(ii) ステップ(i)で得られたインキュベートした混合物を洗浄すること；及び
(iii) 530nmでの励起、590nmでの測定蛍光で、プレートリーダーを用いて、結合したgp120の量を測定すること

によって検出される。

本発明は、上記の方法によってHIV-1感染を阻害し得ることが明らかとなった、従来未知であった薬剤も提供する。

本発明は、上記の方法によってHIV-1感染を阻害し得ることが明らかとなった薬剤及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物も提供する。ある実施態様では、薬剤はオリゴペプチドである。別の実施態様では、薬剤はポリペプチドである。さらに別の実施態様では、薬剤は非ペプチド性薬剤である。

本発明は、非ケモカイン剤のインビボでの半減期を増加させ得る化合物に結合された明らかとなった上記薬剤を具備する、ケモカイン受容体CCR5に結合することができ、HIV-1のCD4⁺細胞への融合を阻害し得る分子も提供する。ある実施態様では、該化合物はポリエチレングリコールである。本発明は、HIV-1感染を阻害するのに有効な相当量の上記分子及び薬学的に許容される担体を具備する薬学的組成物も提供する。

本発明は、被験者に上記薬学的組成物を投与することを具備する、被験者のHIV-1感染の率を減らす方法を提供する。

本発明は、患者に上記薬学的組成物を投与することを具備する、患者のHIV-1感染を治療する方法を提供する。

本発明は、以下の実験の詳細を参照することによって、よりよく理解されるであろう。しかし、当業者であれば、詳述された具体的な実験は単なる例示であって、本明細書に記載の発明（その後続く請求の範囲で明示されている）を限定することを意図したものではないことが容易に理解されるであろう。

実験の詳細

β-ケモカインが如何にしてHIV-1の複製を阻害するのかを研究するために、トランスで発現されるエンベロープ糖タンパク質により補足されるenv欠損ウイルスNL4/3Δenv（これはルシフェラーゼレポーター遺伝子も保持している）による単一サイクルの感染に基づくウイルス侵入アッセイを用いた（10,11）。初代株とTCLA HIV-1株との複製を補助する特有の能力を有し、共通の細胞バックグラウンドに対するエンベロープ糖タンパク質の機能の比較を可能にするHUT-78の変異体であるPM1細胞において、種々のenv補足ウイルスを試験した（2,12）。MIP-1α、MIP-1βおよびRANTESは、一緒になってHIV-1に対して最も活性となり（2,3）、NS1初代株ADAおよびBaLに由来するエンベロープを有する捕捉されたウイルスによるPM1細胞への感染を強力に阻害した（表1a）。

表 1 : PM1 細胞および CD4⁺ T 細胞内への HIV-1 の侵入の β -ケモカインによる
阻害

ルシフェラーゼ活性(%)					
	BaL	ADA	NL4/3	HxB2	MuLV
a) PM1 細胞					
対照(ウイルス無し)	2	2	2	5	3
対照(ウイルス有り)	100	100	100	100	100
+R/M α /M β (50/50/50)	2	3	92	117	100
+RANTES(100)	1	1	nd	nd	nd
+MIP-1 α (100)	54	54	nd	nd	nd
+MIP-1 β (100)	1	6	nd	nd	nd
+MCP-1(100)	46	50	nd	nd	nd
+MCP-2(100)	28	26	nd	nd	nd
+MCP-3(100)	58	46	nd	nd	nd
b)	JR-FL	HxB2	MuLV		
LW4 CD ⁺ T 細胞					
対照(ウイルス無し)	1	1	1		
対照(ウイルス有り)	100	100	100		
+R/M α /M β (200/200/200)	14	68	nd		
LW5 CD4 ⁺ T 細胞					
対照(ウイルス無し)	1	1	1		
対照(ウイルス有り)	100	100	100		
+R/M α /M β (200/200/200)	15	73	nd		

表 1 の説明 :

Lussoら (12) に記載のとおり PM1細胞を培養した。研究所労働者 (LW) からフィコール / ハイパックで単離したPBMCを、抗CD8イムノマグネティックビーズ (DYNAL, Great Neck, NY) でのCD8⁺リンパ球の枯渇前の72時間、PHAで刺激した。文献記載 (3) のとおりに、インターロイキン-2 (100U/ml; Hofmann LaRoche, Nutley, NJ) を含有する培地内でCD4⁺リンパ球を維持した。NL4/3 Δ env-ルシフェラーゼベクターとHIV-1 env発現ベクターとでコトランスフェクトされた293細胞からの上清 (10~50ngのHIV-1 p24) を標的細胞 (1~2 $\times 10^5$ 個) に感染させた (10,11)。 β -ケモカイン (R & D Systems, Minneapolis) を、第 1 欄の括弧内に示されている最終濃度 (ng/ml) で、ウイルスと同時に該標的細胞に加えた。従前の研究 (2,3) に基づき、 β -ケモカインの濃度範囲を選択した。2 時間後、該細胞をPBSで 2 回洗浄し、 β -ケモカインを含有する培地に再懸濁し、48~96時間維持した。文献記載 (10,11) のとおりに、細胞ライセート中のルシフェラーゼ活性を測定した。示されている値は、 β -ケモカインを欠くウイルス対照培養 (100%) に対して表されたルシフェラーゼ活性 (cpm) / ng p24/mgタンパク質を意味し、二重または六重の測定の平均である。ndは、実施せず。R/M α / M β 、RANTES + MIP-1 α + MIP-1 β 。RANTESおよびMIP- β は、別々に加えた場合、強力な活性を示し、一方、他の β -ケモカイン (MIP-1 α 、MCP-1、MCP-2およびMCP-3 (参照文献13~15)) は、より弱い阻害物質であった (表1a)。MIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESの組合せは、TCLA株NL4/3およびHxB2による又は兩種指向性マウス白血病ウイルス (MuLV-Ampho) シュードタイプによるPM1細胞の感染を阻害しなかった (表1a)。したがって、HIV-1エンベロープ糖タンパク質の表現型特性は、ウイルス侵入アッセイにおける β -ケモカインに対するそれらの感受性に影響を及ぼす。

env補足アッセイを用いて、2つの対照個体（LW4およびLW5）に由来するCD4⁺T細胞内へのHIV-1の侵入を評価した。MIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESは、LW4およびLW5のCD4⁺T細胞へのNSI初代株JR-FLによる感染を強く阻害し、LW細胞へのHxB2の感染を若干減少させた（表1b）、このことは、種々のウイルス株による活性化CD4⁺T細胞上の受容体の利用において或る程度の重複が存在しうることを示唆している。また、感受性においてドナー間で有意な変動があるものの、正常PBLにおけるBaL env媒介性複製はMIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESにより阻害された（データは示していない）。

PM1細胞への感染の完全な阻害が、ADAまたはBaL env補足ウイルスの添加後5時間までの β -ケモカインの連続的な存在を必要とすることを示すことにより2時間または24時間、該細胞を β -ケモカインで前処理し、ついで、ウイルスの添加前に該細胞を洗浄した場合には、阻害効果は得られなかった。さらに、ウイルス添加の2時間後に β -ケモカインを加えた場合には、ウイルスの侵入に対する最小限の影響が生じたにすぎなかった（図1a）。つぎに、感染の10時間後、PM1細胞内のHIV-1初期DNA逆転写物を検出するために、PCRに基づくアッセイを用いた。MIP-1 β およびRANTESの存在下では、NL4/3でなくADAの逆転写を検出することはできなかった（図1b）。したがって、 β -ケモカインによる阻害は、HIV-1複製の初期段階（ウイルスの付着、融合および初期逆転写）の少なくとも1つにおいてそれが存在することを要する。

まず、 β -ケモカインが、可溶性CD4に対するJR-FLまたはBRU gp120の結合、またはオリゴマーエンベロープ糖タンパク質を発現するHeLa-JR-FL細胞に対する四量体CD4-IgG2の結合を阻害するか否かを試験することにより、これらの作用部位を識別した（17）。いずれの β -ケモカインも、いずれのアッセイにおいても阻害を示さなかったが、OKT4a CD4-Mabは、両方で強力な阻害性を示した（データは示していない）。したがって、エンベロープ糖タンパク質のコンホメーション変化がウイルスと細胞膜との融合を引き起こす場合には、 β -ケモカインは、CD4結合後の段階を阻害する（18）。また、細胞-細胞膜融合は、gp120-CD4相互作用により誘導され、細胞膜内に取込まれた蛍光染料間の共鳴エネルギー移動（RET）により直接モニターすることができる（17）。RETアッセイにおいては、JR-FLまたはBRUのいずれかのエンベロープ糖タンパク質を発現するHeLa細胞（それぞれHeLa-JR-FLまたはHeLa-BRU）とのPM1細胞の膜融合をOKT4aは完全に阻害し、このことは、この過程の特異性を証明するものである（17）。RANTES、MIP-1 β （および、より低度ではあるがMIP-1 α ）は、PM1細胞とHeLa-JR-FL細胞との膜融合を強力に阻害したが、PM1細胞とHeLa-BRU細胞との融合は、これらの β -ケモカインに不感受性であった（表2a）。

表2：RETアッセイで測定した、HIV-1エンベロープ糖タンパク質媒介性膜融合

10

20

30

表2: RET アッセイで測定した、HIV-1 エンベロープ糖タンパク質媒介性膜融合
に対する β -ケモカインの効果

	融合率(%)	
	HeLa-JR-FL	HeLa-BRU
a)PM1 細胞		
ケモカイン無し	100	100
+R/M α /M β (80/400/100)	1	95
+RANTES(80)	8	100
+MIP-1 α (400)	39	100
+MIP-1 β (100)	13	93
+MCP-1(100)	99	98
+MCP-2(100)	72	93
+MCP-3(100)	98	99
b)LW5 CD4 ⁺ 細胞		
ケモカイン無し	100	100
+R/M α /M β (106/533/133)	39	100
+RANTES(106)	65	95
+MIP-1 α (533)	72	100
+MIP-1 β (133)	44	92
+OKT4A(3 μ g/ml)	0	0

表2の説明:

CD4⁺標的細胞(マイトジェンにより活性化されたCD4⁺リンパ球またはPM1細胞)をオクタデシルローダミン(Molecular Probes, Eugene, OR)で標識し、HeLa-JR-FL細胞、HeLa BRU細胞(または対照HeLa細胞、示されていない)をオクタデシルフルオレセイン(Molecular Probes)で37℃で一晩標識した。等しい数の標識標的細胞とenv発現細胞とを96ウェルプレート内で混合し、 β -ケモカイン(またはCD4 MAb OKT4a)を、第1欄の括弧内に示されている最終濃度(ng/ml)で加えた。細胞混合の4時間後にフルオレセインの発光値を測定した(17)。細胞融合が生じたら、合体した膜内に該染料を密接に結合させて、フルオレセインの450nmでの励起が、共鳴エネルギー転移(RET)およびローダミンによる590nmでの発光を引き起こすようにする。融合率(%)は、 $100 \times [(Exp\ RET - 最小RET) / (最大RET - 最小RET)]$ 〔式中、最大RET=HeLa-EnvとCD4⁺細胞とを混合した場合に得たRET(%), Exp RET=融合阻害化合物の存在下でHeLa EnvとCD4⁺細胞とを混合した場合に得たRET(%), および最小RET=HeLa細胞(HIV-1エンベロープ糖タンパク質を欠くもの)とCD4⁺細胞とを混合した場合に得たRET(%)]に等しいと定義する。RET値(%)は、文献記載(17)の計算により定義し、それぞれは三重の測定の平均である。これらの値は、HeLa-JR-FL細胞およびHeLa-BRU細胞に関して、それぞれ、PM1細胞11.5%、10.5%; LW5 CD4⁺細胞、6.0%、10.5%; R/M α /M β 、RANTES+MIP-1 α +MIP-1 β であった。

LW5からの初代CD4⁺T細胞で、同様の結果を得た(表2b)(初代細胞における膜融合を阻害するためには、PM1細胞における膜融合を阻害するより高濃度の β -ケモカインが必要であった)。したがって、 β -ケモカインの作用は、PM1細胞系に限定されるものではない。RETアッセイは、 β -ケモカインがenv媒介性膜融合を阻害することを裏付けている。

これらの結果の最も簡単な解釈は、ある β -ケモカインのその受容体に対する結合が、直接的またはそれ以外の状態で、CD4⁺T細胞とHIV-1との融合を妨げる、というものである。HIV-1がCD4⁺T細胞内への侵入のために第2の受容体を必要とすることは、十年前から公知である(19-21)。TCLA株の場合には、この機能はフシン(fusin)により付与される(9)。MIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESのいくつかの受容体が同定されており(6,7)、 β -ケモカインは、受容体の利用において相当な交差反応性を示す(4-8)。しかしながら、C-C CKR-1、および特にC-C CKR-5は、組織発現パターンとMIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESに対するそれらの結合能とに基づき、最も有望な候補体であると目されている(4,7,8,15

,22)。C-C CKR-1、C-C CKR-5およびLESTRはそれぞれ、PM1細胞および初代マクロファージ内でmRNAレベルで発現される（データは示していない）。したがって、これら及び他のβ-ケモカイン受容体をPCR増幅し、クローニングし、発現させた。

HIV-1侵入のenv補足アッセイにおいては、HeLa-CD4（ヒト）、COS-CD4（サル）および3T3-CD4（マウス）細胞内でのC-C CKR-5の発現により、初代NSI株ADAおよびBaLは、それらの各々に容易に感染することが可能となった

表3：C-C CKR-5の発現は、初代NSI HIV-1株によるCD4発現細胞への感染を可能とする

		pcDNA3.1	LESTR	CKR-1	CKR-2a	CKR-3	CKR-4	CKR-5	R/Ma/MS
COS-CD4	ADA	798	456	600	816	516	534	153000	CKR-5
	BaL	660	378	600	636	516	618	58800	3210
	HxB2	5800	96700	5240	5070	5470	5620	4850	756
HeLa-CD4	ADA	678	558	4500	912	558	600	310000	5000
	BaL	630	738	1800	654	516	636	104000	6336
	HxB2	337000	nd	nd	nd	nd	nd	nd	750
3T3-CD4	ADA	468	558	450	618	534	606	28400	356000
	BaL	606	738	660	738	534	558	11700	1220
	HxB2	456	24800	618	672	732	606	618	756
									606

表3の説明：

ケモカイン受容体遺伝子C-C CKR-1、C-C CKR-2a、C-C CKR-3、C-C CKR-4およびC-C CKR-5

10

20

30

40

50

はイントロンを有しておらず(4-8,15,22)、7人の健康なドナーのPBMC由来のヒトゲノムDNAプール上で直接行なうPCRにより、それらを単離した。ATGおよび停止コドンと重複し、pcDNA3.1発現ベクター(Invitrogen Inc.)内への定方向(directional)クローニングのためのBamHIおよびXhoI制限部位を含有するオリゴヌクレオチドを使用した。NIHデータベースに由来する配列を用いてPM1細胞に由来するcDNA上で直接行なうPCRにより、LESTR(フシンまたはHUMSTRとしても公知である)(4,9,24)をクローニングした。ヒトゲノムDNAに直接由来するCKR遺伝子およびPM1 cDNA由来のLESTRの第1(5-1および3-1)および第2(5-2および3-2)ラウンドPCR増幅において用いる5'および3'プライマー対を、以下に挙げる。CKR-5の増幅には、単一のプライマーセットのみを使用した。

LESTR: L/5-1 = AAG CTT GGA GAA CCA GCG GTT ACC ATG GAG GGG
ATC (配列番号: 9) ;

10

L/5-2 = GTC TGA GTC TGA GTC AAG CTT GGA GAA CCA (配列番号:
10) ;

L/3-1 = CTC GAG CAT CTG TGT TAG CTG GAG TGA AAA CTT GAA GAC
TC (配列番号: 11) ;

L/3-2 = GTC TGA GTC TGA GTC CTC GAG CAT CTG TGT (配列番号:
12) ;

CKR-1:C1/5-1 = AAG CTT CAG AGA GAA GCC GGG ATG GAA ACT CC
(配列番号: 13) ;

20

C1/5-2 = GTC TGA GTC TGA GTC AAG CTT CAG AGA GAA (配列番号:
14) ;

C1/3-1 = CTC GAG CTG AGT CAG AAC CCA GCA GAG AGT TC (配列番号:
15) ;

C1/3-2 = GTC TGA GTC TGA GTC CTC GAG CTG AGT CAG (配列番号:
16) ;

30

CKR-2a:C2/5-1 = AAG CTT CAG TAC ATC CAC AAC ATG CTG TCC AC
(配列番号: 17) ;

C2/5-2= GTC TGA GTC TGA GTC AAG CTT CAG TAC ATC (配列番号 :
18) ;
C2/3-1 = CTC GAG CCT CGT TTT ATA AAC CAG CCG AGA C (配列番号 :
19) ;
C2/3-2 = GTC TGA GTC TGA GTC CTC GAG CCT CGT TTT (配列番号 :
20) ;

CKR-3: C3/5-1 = AAG CTT CAG GGA GAA GTG AAA TGA CAA CC
(配列番号 : 21) ; 10

C3/5-2= GTC TGA GTC TGA GTC AAG CTT CAG GGA GAA (配列番号 :
22) ;
C3/3-1 = CTC GAG CAG ACC TAA AAC ACA ATA GAG AGT TCC (配列番号 :
23) ;

C3/3-2 = GTC TGA GTC TGA GTC CTC GAG CAG ACC TAA (配列番号 :
24) ;

CKR-4: C4/5-1 = AAG CTT CTG TAG AGT TAA AAA ATG AAC CCC ACG
G (配列番号 : 25) ; 20

C4/5-2 = GTC TGA GTC TGA GTC AAG CTT CTG TAG AGT (配列番号 :
26) ;

C4/3-1 = CTC GAG CCA TTT CAT TTT TCT ACA GGA CAG CAT C
(配列番号 : 27) ;

C4/3-2 = GTC TGA GTC TGA GTC CTC GAG CCA TTT CAT (配列番号 :
28) ;

CKR-5: C5/5-12 = GTC TGA GTC TGA GTC AAG CTT AAC AAG ATG GAT
TAT CAA (配列番号 : 29) ; 30

C5/3-12 = GTC TGA GTC TGA GTC CTC GAG TCC GTG TCA CAA GCC
CAC (配列番号 : 30) ;

ヒトCD4発現細胞系HeLa-CD4 (P42)、3T3-CD4 (sc6) およびCOS-CD4 (Z28T1) (23) に、リン酸カルシウム法により種々のpcDNA3.1-CKR構築物をトランスフェクトし、48時間後、 β -ケモカイン (それぞれ400ng/mlのRANTES、MIP-1 α およびMIP-1 β) の存在下または不存在下で種々のレポーターウイルス (200ngのHIV-1 p24/10⁶細胞) を感染させた。48時間後、細胞ライセート内のルシフェラーゼ活性を測定した (10,11)。C-C CKR-5以外のC-C CKR遺伝子により媒介される感染は、阻害の定量が可能となるほど強くなかったため、 β -ケモカインの遮断データは、C-C CKR-5だけについて示されている。PCRに基づくHIV-1侵入のアッセイにおいては、C-C CKR-1発現細胞内へのNL4/3およびADAの低レベルの侵入が、一貫して認められた (データは示していない)。

このアッセイでは、LESTRもC-C CKR-1、-2a、-3または-4も、C-C CKR-5を置換することができなかった。COS-CD4および3T3-CD4内でのLESTRの発現はHxB2の侵入を許容せず、トランスフェクトされていない (または対照プラスミドでトランスフェクトされた) HeLa-CD4細胞にはHxB2は容易に侵入した (表3)。合計3つのC-C CKR-5発現細胞系内へのBALおよびADAの侵入は、MIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESの組合せによりほぼ完全に阻害され、一方、LESTR発現細胞内へのHxB2の侵入は、 β -ケモカインに不感受性であった (表3)。これらの結果は、C-C CKR-5が、初代NSI HIV-1株に対する β -ケモカイン感受性第2受容体

として機能することを示唆している。

C-C CKR-5の第2受容体の機能は、env媒介性膜融合のアッセイで確認した。ヒトCD4を恒久的に発現するCOSおよびHeLa細胞系内でC-C CKR-5を一過性に発現させた場合には、両細胞系は、JR-FLエンベロープ糖タンパク質を発現するHeLa細胞と強力に融合し、一方、対照プラスミドを使用した場合には、融合は生じなかった（データは示していない）。C-C CKR-5の代わりにLESTRを発現させた場合には、COS-CD4細胞またはHeLa-CD4細胞とHeLa-JR-FL細胞との融合は可能でなかったが、COS-CD4細胞とHeLa-BRU細胞との融合は可能になった（データは示していない）。

また、RETアッセイにおいて、 β -ケモカイン受容体の融合能を試験した。C-C CKR-1、-2a、-3または-4ではなくC-C CKR-5の発現が、HeLa-CD4細胞とHeLa-JR-FL細胞との強力な融合を可能にした。HeLa-JR-FL細胞とC-C CKR-5発現HeLa-CD4細胞との融合の度合は、HeLa-BRU細胞とHeLa-CD4細胞との融合の構成的レベルより大きかった（図2）。したがって、初代NSI HIV-1株に関するC-C CKR-5の融合付与機能は、2つの独立した融合アッセイで確認されている。

10

実験の考察

総合すると、前記の結果は、MIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESが、CD4結合に次ぐウイルス細胞融合反応を妨げることにより、HIV-1の感染を侵入段階で阻害することを裏付けている。また、C-C CKR-5が、CD4+T細胞内へのHIV-1の初代NSI株の侵入のための第2の受容体として役立ちうること、および β -ケモカインとC-C CKR-5との相互作用が、HIV-1融合反応を阻害することが示された。

20

前節の参考文献

1. Levy, J.A., Mackewicz, C.E. & Barker, E. *Immunol. Today* 17, 217-224 (1996).
2. Cocchi, F. et al. *Science* 270, 1811-1815 (1995).
3. Paxton, W.A. et al. *Nat. Med.* 2, 412-417 (1996).
4. Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J.Y., Horuk, R., & Schall, T.J. *Cell* 72, 415-425 (1993).
5. Gao, J.-L. et al. *J. Exp. Med.* 177, 1421-1427 (1993).
6. Bacon, K.B., Premack, B.A., Gardner, P. & Schall, T.J. *Science* 269, 1727-1729 (1995). 10
7. Raport, C.J. et al. *J. Leukoc. Biol.* 59, 18-23 (1996).
8. Wells, T.N.C. et al. *J. Leukoc. Biol.* 59, 53-60 (1996).
9. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. & Berger, E.A. *Science* 272, 872-877 (1996).
10. Chen, B.K., Saksela, K., Andino, R. & Baltimore, D. *J. Virol.* 68, 654-660 (1994).
11. Connor, R.I., Chen, B.K., Choe, S., & Landau, N.R. *Virology* 206, 935-944 (1995). 20
12. Lusso, P. et al. *J. Virol.* 69, 3712-3720 (1995).
13. Charo, I.F. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2752-2756 (1994).
14. Ben-Baruch, A. et al. *J. Biol. Chem.* 270, 22123-22128 (1995).
15. Combadiere, C. et al. *J. Biol. Chem.* 270, 29671-29675 (1995). 30
16. Lip, J.P., D'Andrea, A.D., Lodish, H.F. & Baltimore, D. *Nature* 343, 762-764 (1990).
17. Litwin, V. et al. *J. Virol.* (submitted for publication).
18. Moore, J.P., Jameson, B.A., Weiss, R.A. & Sattentau, Q.J. in *Viral Fusion Mechanisms* (ed Bentz, J.) 233-289 (CRC Press Inc, Boca Raton, USA, 1993).
19. Maddon, P.J. et al. *Cell* 47, 333-348 (1986).
20. Ashorn, P.A., Berger, E.A. & Moss, B. *J. Virol.* 64, 2149-2156 (1990). 40

21. Clapham, P.R., Blanc, D. & Weiss, R.A. *Virology* 181, 703-715 (1991).
22. Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G. & Parmentier, M. *Biochemistry* 11, 3362-3367 (1996).
23. Dragic, T., Charneau, P., Clavel, F. & Alizon, M. *J. Virol.* 66, 4794-4802 (1992).
24. Loetscher, M. et al. *J. Biol. Chem.* 269, 232-237 (1994).
25. Moore, J.P. & Ho, D.D. *AIDS* 9 (suppl A), S117-S136 (1995). 10
26. Trkola, A. & Moore, J.P. (unpublished data).
27. Chaudhuri, A., et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 269, 7835-7838 (1994).
28. Neote, K., Mak, J.Y., Kolakowski Jr., L.F. & Schall, T.J. *Blood* 84, 44-52 (1994).
29. Dragic, T., Picard, L. & Alizon, M. *J. Virol.* 69, 1013-1018 (1995). 20
30. Puri, A., Morris, S.J., Jones, P., Ryan, M. & Blumenthal, R. *Virology* 219, 262-267 (1996). 31
31. Choe, H., Farzan, F., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. *Cell* 85, 1135-1148 (1996).
32. Doranz, B.J., Rucher, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G., and Doms, R.W. *Cell* 85, 1149-1158, (1996). 30
33. Wu, L., Paxton, W.A., Kassam, N., Ruffing, N., Rottman, J.B., Sullivan, N., Choe, H., Sodroski, J., Newman, W., Koup, R.A., and Mackay, C.R. *J. Exp. Med.* 185, Number 9, 1681-1691, (1997).

第2の一連の実験

実験方法

試薬の入手源：組換えヒトβ-ケモカインはR & D Systems (Minneapolis) から購入し、¹ 25I-MIP-1β (比活性2,200Ci nmol⁻¹) はDupont-NENから購入した。抗CD4モノクローナル抗体は、Q. Sattentau (16) から入手した。ただし、5A8はL. Burkly (Biogen) (27) およびL120 (UK MRC AIDS Reagent Repository) (16) から入手した。可溶性CD4は、文献に記載されている(17)。gp120に対するモノクローナル抗体は、23A (gp120C末端、J. Robinsonから)、447-Dおよび697-D (参照文献28; Cellular Products Inc.) および83.1 (参照文献29; Repligen) 以外は、文献(19,20)に挙げられているドナーから得た。組換えgp41 (IIIB) エクトドメインはViral Therapeutics Inc. から、V3ペプチドは、RepligenまたはUK MRC AIDS Reagent Repositoryから得た。組換えMN gp120 (Genentech)、SF-2 gp120 (Chiron) およびCM243 gp120はNIAID AIDS Reagents Repositoryから提供され、W61D gp120 (SmithKline Beecham, Belgium) はUK MRC AIDS Reagent Repositoryから得た。

ジヒドロ葉酸レダクターゼ発現カセットを含有する、Progenics Pharmaceuticalsで開発されたベクターを使用して、組換え単量体JR-FLおよびLA1 gp120（共に完全長であり、V3ループが欠失している）を発現させた。該遺伝子の発現は、サイトメガロウイルス最初期プロモーターの制御下に置く。Δ-V3 gp120の場合には、重複伸長によるスプライシング技術（splicing-by-overlap-extension technique）によりV3ループを切除し、この際、該ループを規定するシステインが保有され、ペプチド配列TGAGHにより架橋される（Spanned）ようにする。すべての構築物を配列決定して、クローニング操作中に突然変異が導入されていないことを確認した。安定にトランスフェクトされたチャイニーズハムスター卵巣細胞（DXB-11）内で、該タンパク質を発現させ、ヌクレオシドを含まない培地内で選択し、メトトレキサートを使用して増幅した（文献記載（17）の方法に従い行なった）。分泌したタンパク質を、イオン交換、ガラントス・ニバラス（*Galanthus nivalus*）レクチンアフィニティーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを含む非変性法により、>95%均一になるまで精製した。精製されたタンパク質は、ナノモラーのアフィニティーでsCD4に結合した（18）。

SF162 gp160の発現の場合には、env遺伝子を含有する3.5kbのEcoRI-BamHI断片を、SV40に基づくベクターであるpSMから切り出し、β-アクチンに基づく発現ベクターであるpCAGGSのR1/BglII部位内にサブクローニングした。SF170 gp160の発現の場合には、env遺伝子を含有する3.8kbの断片を、pBSKS⁺プラスミドから切り出し、T4 DNAポリメラーゼでの処理により平滑末端化し、pCAGGSのRV/XhoI部位内にサブクローニングした。該発現プラスミドを、リン酸カルシウム共沈法により293T細胞内にトランスフェクトした。3日後、培養上清内の可溶性gp120を集め、0.2 μmのフィルターで濾過し、Amicon 1000メンブレン上で濃縮した。

JR-FLおよび94RW020エンベロープ糖タンパク質の可溶性オリゴマー形態（および92TH014からの単量体gp120）の調製を、以下のとおりに行なった。JR-FL env遺伝子は、I. Chen（UCLA）により提供され、92TH014および92RW020のenv遺伝子は、NIAID AIDS Reagent Repositoryから得た（30）。gp120およびgp41エクトドメイン（JR-FLおよび92RW020のもの）、92TH014のgp120のみをコードする可溶性発現プラスミドを、文献記載（30）のとおり構築し、リン酸カルシウム法によりチャイニーズハムスター卵巣細胞内にトランスフェクトした。JR-FLおよび92TH014 gp120およびgp41部分間の切断部位を保有させ、タンパク質をオリゴマーとして分泌させた（J.A., J.M.B.およびJ.P.M., 未公開データ）。エンベロープ糖タンパク質を、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより培養上清から部分精製した。残基457での単点突然変異によりCD40結合が不能になったgp120/gp41分子を含有する対照調製物93MW959（c）は、¹²⁵I-MIP-1βと競合しなかった。未精製培養上清内の単量体gp120またはオリゴマーgp120/gp41の濃度の推定を、該タンパク質を変性させ、ニトロセルロースメンブレン上にドットプロットし、連続エピトープに対するマウスモノクローナル抗体の混液（19）、ついで抗マウスIgG-HRP結合体およびECL化学発光系（Amersham）でgp120を検出することにより行なった。精製された単量体JR-FL gp120を濃度基準として使用した（17）。オリゴマーgp120/gp41複合体の濃度は、該調製物内の単量体gp120サブユニットの全濃度と定義した。酵素結合抗体免疫アッセイ（ELISA）により、gp120に対する高いアフィニティーのCD4結合を確認した（19）。

細胞および細胞系

PBMCを、フィコール・ハイパック遠心法により血液ドナーから単離し、フィトヘマグルチニン（5 μg ml⁻¹）およびIL-2（100U ml⁻¹）（Roche）で2～3日間刺激した。抗CD4イムノマグネティックビーズ（DynaI Inc）を使用する陽性選択により、活性化PBMCからCD4⁺T細胞を精製した。精製されたリンパ球を、¹²⁵I-MIP-1β結合アッセイで使用する前に、IL-2（200U ml⁻¹）を含有する培地内で2×10⁶/mlで少なくとも3日間培養した。CCR-5欠損対立遺伝子に関して該細胞をスクリーニングし（14）、野生型ドナーからの細胞だけを使用した（特に示されている場合を除く）。リン酸カルシウム法を用いてpcDNA3.1-ckr-5（参照文献1）を293細胞にトランスフェクトし、1 μg ml⁻¹ネオマイシン（G418;Sigma）を含有する培地内で耐性クローンを選択した。耐性細胞をサブクローニングし、¹²⁵I-MIP

10

20

30

40

50

-1 β を使用する結合アッセイにおいてCCR-5発現に関して試験した。

MIP-1 β 結合アッセイおよびgp120競合

精製されたCD4⁺T細胞を、氷冷結合緩衝液（1%BSA、25mM HEPES、0.05%アジ化ナトリウムを含有するRPMI1640培地）中で2回洗浄した。二重のサンプル（200 μ l中の 2×10^6 個の細胞）を、0.1nM 125 I-MIP-1 β （2,200Ci nmol⁻¹; 0.25 μ Ci ml⁻¹）と共に氷上で2時間インキュベートした。放射能標識リガンドを加える直前に、未標識リガンドまたはgp120（適宜、モノクローナル抗体と混合する）を細胞に加えた。抗CD4モノクローナル抗体を、gp120と同時に該細胞に加えた。ついで、これらの細胞を、油（80%シリコンオイル, Aldrich; 20%鉱油, Sigma）による遠心分離（60秒、14,000g）により未結合リガンドから分離し、細胞ペレット内の放射能をガンマカウンターにより測定した。100倍過剰の未標 β を加えることにより、 125 I-MIP-1 β の特異的結合を推定した。各実験は、異なるドナーからの細胞を使用して少なくとも2回繰返した。293-CCR-5細胞での実験では、該細胞を1mM EDTAで解離させ、ついで結合緩衝液で2回洗浄した。サンプル（ 5×10^5 個の細胞）を0.5nM 125 I-MIP-1 β と共にインキュベートし、ついで前記のとおり加工した。 125 I-MIP-1 β の濃度を0.1nMまで減少させた場合には、特異的結合は検出されなかった。

概括

β -ケモカイン受容体CCR-5は、非シンシチウム誘導（non-syncytium-inducing（NSI））表現型のHIV-1株とCD4⁺T細胞との融合のための必須の補因子である（1-5）。ヒト免疫不全ウイルス（HIV）-1の初期結合部位は、CD4分子であり、その相互作用は、ウイルス表面糖タンパク質gp120により媒介される（6,7）。HIV-1の侵入中のCCR-5機能のメカニズムは明らかにされていないが、本発明者らは、その β -ケモカインリガンドが、HIV-1と該細胞との融合を妨げることを既に示している（1）。したがって、本発明者らは、CCR-5が、gp120とCD4との相互作用と同時に又はその後でHIV-1の第2の結合部位として作用するか否かを検討した。本発明者らは、CCR-5リガンドであるマクロファージ炎症性タンパク質（MIP）-1 β が活性化CD4⁺T細胞またはCCR-5陽性CD4細胞上のその受容体に結合するのをgp120が阻害することに基づく競合アッセイを用いた。本発明者らは、CD4結合が、gp120-CCR-5相互作用に絶対に必要というわけではないが、その効率を著しく増大させると結論した。V3ループとCD4で誘導されたエピトープとを含むgp120上のいくつかの部位に対する中和モノクローナル抗体は、gp-120-CD4結合に影響を及ぼすことなく、gp120とCCR-5との相互作用を阻害した。HIV-1の受容体（CD4およびCCR-5）の一方または両方に対するHIV-1結合の阻害は、ウイルスの中和の重要なメカニズムかもしれない。

MIP-1 β は、CCR-5に対する最も特異的なリガンドである（8-10）。なぜなら、MIP-1 α およびRANTESは、リンパ球系細胞上の β -ケモカイン受容体ファミリーの他のメンバーにも高いアフィニティーで結合するからである（8-11）。したがって、本発明者らは、競合アッセイにおいてMIP-1 β をCCR-5リガンドとして使用した。この受容体ファミリーの他のメンバーと同様に（12）、CCR-5は、マイトジェン応答遺伝子である。静止期にある精製されたCD4⁺T細胞内でのその発現は、通常、最小であるが、フィトヘマグルチニンおよびインターロイキン（IL）-2による該細胞の活性化の3日後、本発明者らは、CCR-5メッセンジャーRNAと 125 I標識MIP-1 β 結合との著しい増加を観察した（データは示していない）。特異性対照として、本発明者らは、欠損CCR-5対立遺伝子に関してホモ接合の個体からのCD4⁺T細胞を使用した（13,14）。そのような3個体からの細胞に対する特異的（すなわち、非放射性MIP-1 β と競合した） 125 I-MIP-1 β （0.1nM）結合の量は、 2×10^6 個の細胞当たり 92 ± 12 c.p.m.（平均 $\pm$ s.d.）であった。これに対して、21の対照個体からの細胞に対する平均結合は、 2×10^6 個の細胞当たり $1,044 \pm 1,073$ （範囲、222~4,846c.p.m.）であった。したがって、活性化CD4⁺T細胞内との 125 I-MIP-1 β の反応性のほとんどは、CCR-5に対する結合に由来する。

組換え単量体gp120を 125 I-MIP-1 β と共に活性化CD4⁺T細胞に加えた場合には、本発明者らは、NSI株JR-FL〔これは、侵入のためにCCR-5を使用した（1）〕からのgp120が、MIP-1 β 結合を強力に阻害することを見出した（図3a：表4）。

表 4 MIP-1 β 結合に対する組換え gp120 の影響

	0.1	0.2	gp120 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	5	20	50	V3 sequence
NSL gp120							
JR-FL (B)	44 $\pm$ 9	40 $\pm$ 23	58 $\pm$ 26	67 $\pm$ 9	91 $\pm$ 3	95 $\pm$ 6	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGTEIIGDIRQAHC
JR-FL (B) *	46 $\pm$ 28	56 $\pm$ 3	84 $\pm$ 11				
SF 162 (B)	81 $\pm$ 8	113 $\pm$ 41					CTRPNNNTRKSIITIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC
W61D (B)	39 $\pm$ 14	53 $\pm$ 17	65 $\pm$ 23		86 $\pm$ 12		CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHC
92TH014 (B)	6 $\pm$ 1	57 $\pm$ 16	65 $\pm$ 5				CTRPNNNTRKSIHLGPGRAWYTTGQIIGDIRQAHC
SF 170 (A)	87 $\pm$ 45	140 $\pm$ 49					CTRPNNNTRKSVRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAYC
92RW020 (A) *	21 $\pm$ 39	49 $\pm$ 22	74 $\pm$ 36				CTRPNNNTRKSVRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHC
CM243 (E)	17 $\pm$ 14	40 $\pm$ 11	56 $\pm$ 38		76 $\pm$ 24		CTRPSNNTRPSITVGGQGVFYRTGDIIGDIRRAYC
TCLA gp120							
LAI (B)			-1 $\pm$ 3	-5 $\pm$ 36	-18 $\pm$ 39	-6 $\pm$ 9	CTRPNNNTRKSIIRIQGPGRAFYTIKIGNMRQAHC
MN (B)			-20 $\pm$ 14	-23 $\pm$ 4	1 $\pm$ 0	0 $\pm$ 6	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTKNIGTIRQAHC
SF-2 (B)			-1 $\pm$ 4	3 $\pm$ 3	8 $\pm$ 26	21 $\pm$ 3	CTRPNNNTRKSIYIGPGRAFYTTGRIIGDIRKAHC
gp41							
IIIB (B)				24 $\pm$ 5			

表 4 の説明 :

組換えタンパク質を、0.1nM ^{125}I -MIP-1 β の存在下で力価測定し、活性化CD4 $^{+}$ T細胞に加えた。各gp120濃度における ^{125}I -MIP-1 β 結合の阻害率(%)が示されており、それらは、2~4個の独立した実験の平均 $\pm$ s.d.である。値の記載がないものは、その濃度でgp120分子を試験しなかったことを示す(いくつかの分子は、 $>1\mu\text{g ml}^{-1}$ で利用できなかった)。

*オリゴマー性gp120/gp41複合体

半最大阻害は、gp120-CD4相互作用に関する会合定数と同様の値である(7)0.1~1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.8~8nM)のgp120で生じた。これに対して、T細胞系順化(T-cell-line adapted (TCLA)) SI株LAIからのgp120は無効であった(図3a;表4)。このウイルスは、CCR-5でなくフシン(CXCR-4)を侵入のために用いる(1-5)。JR-FLの突然変異体と、V3ループ(Δ -V3 gp120)を欠くがCD4に高いアフィニティーで結合するLAI gp120とは、MIP-1 β 結合を遮断しなかった(図3a)。しかしながら、以下の株のV3ループからのペプチド(特に示

10

20

30

40

50

されていない限り15残基)も不活性であった:JR-FL(32残基)、RA、VS、Case-B(それぞれNSI);HxB2、MN、SF-2(それぞれTCLA)($60 \mu\text{ml}^{-1}$ gp120のおよそのモル当量、 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ でペプチドを加えた)。gp41のエクトドメインと非共有結合しているJR-FL gp120のオリゴマー複合体は、MIP-1 β 結合の有効な阻害物質であったが、gp41エクトドメインだけを含む組換え分子はそうではなかった(表4)(後者の分子は、天然構造に折り畳まれないことがある(15))。

遺伝子亜型A、B、CおよびEからのHIV-1株は、侵入のためにCCR-5を利用し(3)、本発明者らは、MIP-1 β が、亜型A~Eからのほとんどの初代NSI HIV-1株の複製を阻害することを見出した。CCR-5とのHIV-1の反応性のこのような広さは、 ^{125}I -MIP-1 β 競合アッセイに及ぶものである。以下のNSI初代株からの組換えgp120は競合性であり、MIP-1 β の半最大阻害は約 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ の濃度で生じた:JR-FL(亜型B)、SF162(B)、W61D(B)、92TH014(B)、SF170(A)、92RW020(A)およびCM243(E)(表4)。これに対して、TCLA亜型B株LAI、MNおよびSF-2からのgp120との競合は認められなかった(表4)(ただ、それらのそれぞれは、CD4と高いアフィニティーで結合する(示されていない))。したがって、CCR-5との相互作用の判定において、gp120分子が由来するウイルスの表現型は、ウイルス遺伝子型より重要である。

本発明者らは、gp120-CD4相互作用のアンタゴニストを使用することにより、NSI gp120とMIP-1 β との競合におけるCD4の役割を評価した。CD4のドメイン1と反応してgp120結合を阻害するモノクローナル抗体Q4120およびL77(16)、ならびにgp120と反応してCD4結合を阻害する可溶性CD4(sCD4)(17)は共に、CCR-5に対するMIP-1 β 結合のJR-FL gp120による阻害を逆転させた(図3b;表5)。

10

20

表5 CCR-5 と gp120 との相互作用のモノクローナル抗体による阻害

	エピトープ	モノクローナル抗体	阻害 (%)	±s.d.
CD4 抗体	CD4-D1	Q4120 L77	83	27
	CD4-D2	SA8	77	12
	CD4-D3	Q425	3	15
	CD4-D4	L120	15	23
抗 gp120 抗体 非中和面	C5	D7324 23A	-17	23
	C1 (D)	CRA-1	-13	1
	C1 (L)	522-149	-11	14
	C1-C4	133/192	-2	18
	C1-C5	A32	9	1
		211C	8	7
		C11	51	11
		sCD4*	5	11
		15e†	3	21
			91	18
抗 gp120 抗体 中和面	CD4bs CD4bs		65	18
	C4 (L)	IG1b12*	125	40
	C4-V3 (D)	G3 508†	57	1
	CD4i	G3 42†	13	10
		48d*	54	33
	V2	17b*	79	41
		697-D†	3	37
	V3	SC258	-3	8
		447-D*	109	2
		19b†	88	12
		83.1†	140	48
		2G12*	38	4

表5の説明：

活性化CD4⁺T細胞に対する¹²⁵I-MIP-1β結合のJR-FL gp120 (2 μg ml⁻¹) による阻害を、sCD4 (50 μg ml⁻¹) またはCD4に対するモノクローナル抗体 (50 μg ml⁻¹) またはgp120に対する抗体 (20 μg ml⁻¹) の存在下または不存在下で試験した。各抗体の存在下のgp120の競合効果の平均逆転率 (%) (±s.d; n=2 ~ 4 個の独立した実験) を示す。gp120の存在下かつ抗体の不存在下で記録された特異的¹²⁵I-MIP-1β結合 (c.p.m.) のレベルを0%と設定した。gp120および抗体の両方の不存在下で記録されたレベルを100%と設定した。負の逆転率 (%) は、¹²⁵I-MIP-1β結合に対するgp120の競合効果が、該抗体の存在下で増加したことを示す。また、文献 (19,20) で定義されているgp120上の抗体エピトープのおおよその位置も記載されている。抗体の起源についての言及は文献 (19,20) に記載されているが、「方法の部」に記載されている。

*HIV-1_{JR-FL}を中和しうる抗gp120モノクローナル抗体 (またはsCD4)

†他のHIV-1株 (初代またはTCLA) に対する中和活性を有するモノクローナル抗体

CD4の他のドメインに対するモノクローナル抗体 [これは、gp120-CD4結合を遮断しない (16)] は無効であり (表5)、gp120の不存在下では、sCD4 (50 μg ml⁻¹) は、MIP-1βの阻害を引き起こさなかった (データは示していない)。したがって、gp120がCCR-5と効率的に相互作用しMIP-1β結合を遮断するのに、細胞表面CD4との相互作用は重要である。CD

10

20

30

40

50

4が絶対要件であるか否かを確認するために、本発明者らは、安定なヒトCD4⁺CCR-5⁺293細胞系を作製した。これらの細胞は、¹²⁵I-MIP-1β (5×10⁵個の細胞当たり2,500c.p.m.までの特異的結合)に結合し、一方、トランスフェクトされていない293細胞は結合しない(<50c.p.m.の特異的結合)。CD4⁺CCR-5⁺293細胞に対する¹²⁵I MIP-1βの結合は、JR-FL gp120により単発的に阻害されたが、これは、試験した最高gp120濃度のみで認められた(50~100μg ml⁻¹)。これらの細胞上で認められた最強の競合は、50μg ml⁻¹のJR-FL gp120によるMIP-1β結合の73%阻害であったが(比較しうる阻害が、他の2つの実験で認められた)、競合が何ら検出されないことが多く、本発明者らは、より低いgp120濃度でのMIP-1β結合の阻害を全く観察しなかった。該CD4⁺CCR-5⁺細胞に過剰のsCD4を加えても、JR-FL gp120の阻害効果は減少も増加もしなかった(データは示していない)。

JR-FL gp120とCCR-5との相互作用は、CD4⁺細胞上ではCD4⁺細胞上より少なくとも100倍高いgp120濃度を要する。これは、該細胞表面上のCD4に対するgp120の結合がgp120-CCR-5相互作用の確率を増加させることによるものである、と本発明者らは示唆する。すなわち、gp120-CD4-CCR-5三重複合体が形成されるか、またはgp120とCD4、ついでCCR-5との逐次的な相互作用が生じるかのいずれかである。1つの可能性は、gp120とCD4との間の高いアフィニティーの会合が、gp120とCCR-5とのより低いアフィニティーの相互作用の確率を増加させること(近接効果)である。これは、sCD4が細胞表面CD4(少なくとも、JR-FL gp120を有するもの)を置換しないという知見と一致する。あるいは、CD4に対する結合は、gp120上のCCR-5結合部位を(より良好に)露出させるために必要かもしれない。これは、単量体gp120上で接近可能なオリゴマー性エンベロープ糖タンパク質の領域のいくつか(V3ループを含む)がCD4結合前に最適に露出されないピリオンの場合には特に重要である(18)。

gp120-CD4複合体が活性化CD4⁺T細胞上のCCR-5と如何にして相互作用するかに関する更なる知見を得るために、本発明者らは、JR-FL gp120に結合可能であることが各々確認されているHIV-1を中和する及び中和しない抗gp120モノクローナル抗体(19,20)のパネルを用いた。MIP-1β結合部位上のgp120の競合効果の逆転に関して、該抗体を試験した(表5)。sCD4の場合と同様に、CD4ガイディング(ginding)部位と重複するコンホメーションエピトープ(15eおよびIgG1b12)または線状エピトープ(G3-508)に対する抗体は(20)、JR-FL gp120がMIP-1βと競合するのを妨げた。しかしながら、CD4に対する単量体gp120の結合に影響を及ぼさないいくつかの抗体も(20)、gp120-CCR-5相互作用を阻害した(表5)。これらは、V3ループに対して3個(447-D、10bおよび83.1)、C3-V4領域内の保存エピトープに対して1個(2G12)、保存されたCD4誘導性エピトープに対して2個(48dおよび17b)含んでいた。A32以外のこれらのすべては、本発明者らがgp120中和面と定義した位置(20)にマッピングされる。JR-FL gp120がMIP-1β結合を遮断するのを妨げなかった他の8個のモノクローナル抗体は(表2)、本発明者らがgp120非中和面と定義した位置(20)にクラスター化する。それらのエピトープは、単量体gp120に接近しうるが、オリゴマーの場合には、それらは他のgp120サブユニットまたはgp41分子により塞がれる(19,20)。無効なこれらの抗体は、A32のものと重複するエピトープに対する2/11cを含む。この理由により、また、A32はHIV-1株を強力には中和しないため、gp120-CCR-5相互作用に対するA32の部分阻害作用の意義は明らかでない。また、V2ループに対する2つのモノクローナル抗体(697-DおよびSC259)も無効であった。V2ループ構造はgp120中和面(20)上にモデル化されるが、これらの2つ抗体は、HIV-1_{JR-FL}を中和する能力を有していない。また、モノクローナル抗体2G12、17b、447-D、48d、IgG1b12、G3-508および697-Dを、オリゴマー性JR-FL gp120/gp41タンパク質に対して試験し、697-D以外のすべてが、このタンパク質とCCR-5との相互作用を阻害した(示されていない)。

したがって、gp120の中和面に対するこれらの抗体のほとんどは、CD4に対するgp120の結合を妨げるか、CCR-5第2受容体との後続の相互作用を妨げた。初代ウイルスは中和に抵抗し、組換えタンパク質での研究は中和効力を不正確に予測しうるにすぎないため(18)、gp120のこの面に対するすべての抗体が、HIV-1_{JR-FL}を実際に中和するわけではない。しかしながら、本発明者らの知見は、HIV-1が如何にして抗体に中和されるかに関する理

10

20

30

40

50

解を示唆しているかもしれない。該ウイルスの第1または第2受容体相互作用の遮断が特に重要であるかもしれない。

Δ -V3 JR-FL gp120がMIP-1 β 結合を遮断する能力を有していないこと(図3a)についての最も簡単な解釈は、CCR-5結合部位がV3ループ内に含有されている、というものである。これは、V3ループがHIV-1表現型および指向性の重要な決定因子を含有するという多数の観察(18,21)と一致し、第2受容体の利用に影響を及ぼしうる(3)。しかしながら、本発明者らは、CCR-5結合部位がV3ループに限定されないと考えている。CCR-5と相互作用する亜型A、BおよびEのgp120のV3配列は、相当に可変性である(表4)。さらに、いくつかのサル免疫不全ウイルス(SIV)株もまた、第2受容体としてヒトCCR-5を使用しうるが(Z.W. ChenおよびP. Marx, 私信)、HIV-1およびSIVのV3領域は、一次配列の相同性をほとんど有していない。これらすべての配列のそれぞれが、同じ保存された細胞タンパク質に対する結合部位を形成することは、TCLA HIV-1株からの同様のV3配列がそのようにできない場合に可能なのであろうか(表4)。リガンドとケモカイン受容体との相互作用の双状部位モデル(twin-site models)(8)は、比較的保存されたV3ループ部が、gp120上のCCR-5に対する複数点(multi-point)結合部位の成分となりうる可能性を依然として残している。しかしながら、本発明者らは、CCR-5結合部位が、HIV-1遺伝子亜型間だけでなく霊長類免疫不全ウイルス間で強く保存されているgp120領域を含んでいるにちがいないと示唆する。これがCXCR-4とのHIV-1相互作用にも当てはまるか否かは、依然として明らかでない。

V3ループの構造は、gp120上のCCR-5に対する複雑な結合部位の性質に影響を及ぼすかもしれない。モノクローナル抗体48dおよび17bのCD4誘導性エピトープと重複している(必ずしも同一というわけではない)gp120の領域は、そのような部位の優れた候補である。これらの抗体は、V1、V2およびV3ループの塩基の周囲におそらく位置するコンホメーション的に感受性の同様の構造を認識する(22,23)。HxBc2 gp120およびJR-FL gp120の両方からのV3ループの欠失は、48dおよび17bエピトープを破壊し(22,23)(未公開データ)、これは、 Δ -V3 JR-FL gp120がCCR-5と相互作用する能力を有していないことと関連している可能性があり(図5A)、HIV-1_{LA1}のV3およびC4領域内の単一のアミノ酸の変化も、これらのエピトープの構造に大きな影響を及ぼすかもしれない(24)。

CCR-5結合部位についての本発明者らの理解を深めるためには、さらなる研究が必要であらう。 β -ケモカインが末梢血単核細胞(PMBC)内でNSI初代分離株の複製を阻害する効率は、亜型ではなく株に左右され(未公開データ)、このことは、おそらく、gp120とCCR-5上の β -ケモカイン結合部位との重複の程度がgp120間で異なることを示唆している。もしそうだとしたら、gp120上のCCR-5結合部位は、CD4結合部位より柔軟かもしれない。最後に、HIV-1および(特に)HIV-2およびSIVのいくつかの株では、sCD4はCD4⁺細胞上のJR-FL gp120とCCR-5との相互作用を阻害したが、sCD4は、第2受容体相互作用の効率を増強して、CD4またはCD4⁺細胞内へのこれらの霊長類免疫不全ウイルスの侵入を容易にしている可能性がある(25,26)。

第2の一連の実験の参考文献

1. Dragic, T. et al. *Nature* 381, 667-673 (1996).
2. Deng, H.K. et al. *Nature* 381, 661-666 (1996).
3. Choe, H. et al. *Cell* 86, 1135-1148 (1996).
4. Doranz, B.J. et al. *Cell* 86, 1149-1159 (1996).
5. Alkhatib, G. et al. *Science* 272, 1955-1958 (1996).
6. Maddon, P.J. et al. *Cell* 47, 333-348 (1986).
7. Lasky, L.A. et al. *Cell* 50, 975-985 (1987).
8. Wells, T.N.C. et al. *J. Leuk. Biol.* 59, 53-60 (1996). 10
9. Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G. & Parmentier, M. *Biochemistry* 11, 3362-3367 (1996).
10. Raport, C.J., Gosling, J., Schweickart, V.L., Gray, P.W. & Charo, I.F. *J. Biol. Chem.* 271, 17161-17166 (1996).
11. Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J.Y., Horuk, R. & Schall, T.J. *Cell* 72, 415-425 (1993).
12. Loetscher, P., Seitz, M., Baggiolini, M. & Moser, B. 20
J. Exp. Med. 184, 569-578 (1996).
13. Paxton, W.A. et al. *Nature Med.* 2, 412-417 (1996).
14. Liu, R. et al. *Cell* 86, 367-378 (1996).
15. Weissenhorn, W. et al. *EMBO J.* 15, 1507-1514 (1996).
16. Healey, D. et al. *J. Exp. Med.* 172, 1233-1242 (1990).
17. Allaway, G.P. et al. *AIDS Res. Hum. Retrovirus* 11, 533-540 (1995).
18. Moore, J.P. & Ho, D.D. *AIDS* 9 (suppl. A), S117-S136 30
(1995).
19. Moore, J.P. & Sattentau, Q.J., Wyatt, R. & Sodroski, J.
J. Virol. 68, 469-484 (1994).
20. Moore, J.P. & Sodroski, J. *J. Virol.* 70, 1863-1872
(1996).
21. Cheng-Mayer, C. *AIDS* 4 (suppl.1), S49-S56 (1990).
22. Thali, M. et al. *J. Virol.* 67, 3978-3988 (1993).
23. Wyatt, R. et al. *J. Virol.* 69, 5723-5733 (1995). 40

24. Moore, J.P., Yoshiyama, H., Ho, D.D., Robinson, J.E. & Sodroski, J. AIDS Res. Hum. Retroviruses 9, 1179-1187 (1993).
25. Sullivan, N., Sun, Y., Li, J., Hoffmann, W. & Sodroski, J. J. Virol. 69, 4413-4422 (1995).
26. Allan, J.S., Strauss, J. & Buck, D.W. Science 247, 1084-1088 (1990).
27. Burkly, L.C. et al. J. Immunol. 149, 1779-1787 (1992).
28. Gorny, M.K. et al. J. Virol. 68, 8312-8320 (1994).
29. White-Scharf, M.E. et al. Virology 192, 197-208 (1993).
30. Lu, S. et al. J. Virol. 70, 3978-3991 (1996).

10

第3の一連の実験

概括

C-Cケモカイン受容体CCR5は、CD4⁺細胞の原形質膜とのM指向性HIV-1株の効率的な融合に必要であり(1-5)、ウイルス表面糖タンパク質gp120と直接的に相互作用する(6,7)。受容体キメラ研究は有用な情報を提供しているが(8-10)、HIV-1の侵入のために機能するCCR5のドメイン(gp120相互作用の部位を含む)は明確には同定されていない。負に荷電した残基Asp-2(D2)、Asp-11(D11)およびGlu-18(E18)の置換だけが、単独で又は一緒にあって、ADAおよびJR/FL M指向性株およびDH123二重指向性(dual-tropic)株へのCCR5媒介性HIV-1侵入を損なうか破綻することを示すために、本発明者らはここで、CCR5の部位特異的アラニンスキャニング突然変異誘発を用いる。また、これらの突然変異は、env媒介性膜融合およびgp120-CCR5相互作用を損なう。これらの3つの残基のうち、D11だけが、HIV-1侵入のCC-ケモカイン媒介性阻害に必要であるが、それは、他の細胞外CCR5残基にも左右される。したがって、gp120およびCC-ケモカイン結合部位(CCR5上)は部分的に重複するにすぎず、前者は、N末端CCR5ドメイン内の負に荷電した残基を必要とする。

20

結果

gp120結合およびHIV-1侵入に関与するCCR5の領域を同定するために、本発明者らは、荷電残基がCC-ケモカインとその受容体との相互作用に予め関与していることに基づいて、N末端(Nt)および3つの細胞外ループ(ECL1~3)内の負(D、E)または正(K、R、H)に荷電した残基のアラニンスキャニング突然変異誘発を行なった(11,12)。また、本発明者らは、ヒトCCR5とそのマウスホモログ(これは、HIV-1侵入には非機能的である)(9,10)との間で異なるいずれかの残基を、該相違が荷電変化を伴うたびに改変した。全部で、15個の一重突然変異体、4個の二重突然変異体および1個の三重突然変異体を、これらの研究で試験した(図4)。

30

野生型および突然変異CCR5タンパク質(検出を容易にするためにC末端でHA標識されている)を、U87MG-CD4およびSCL-1-CD4細胞内で一過性に発現させ、HIV-1エンベロープ糖タンパク質により媒介される侵入をそれらが補助する能力を、ルシフェラーゼで読み取るenv補足アッセイを用いて測定した(図5)(1,2)。これらの非リンパ球系ヒト細胞系を選択したのは、それらが、CCR5、CCR3およびCXCR4共受容体を欠き、トランスフェクトされた共受容体の不存在下でHIV-1による感染に抵抗するからである(2,4,13,14)(少数の例外的なHIV-1株は、未知の経路でU87MG-CD4細胞に侵入するが(15)、本発明者らはそれらを使用しなかった)。両方の細胞系で、ほぼ同じ結果を得た。CXCR4ではなくCCR5を使用する2つのM指向性ウイルス(ADAおよびJR-FL)(1-5)、およびCCR5およびCXCR4の両方を同等に十分に利用する1つの二重指向性ウイルス(DH123)(15)を用いて、突然変異体CCR5タンパク質がHIV-1の侵入を補助しうるか否かを試験した。トランスフェクトされた各CCR5突然変異体の発現レベルを、ウェスタンブロット法により評価し、共受容体の効率の測定の際に考慮した。

40

50

15個の一重突然変異のうち3個だけが、CCR5の共受容体の機能に対する有意な阻害効果を有していた(図5)。これらは、D2A、D11AおよびE18Aであり、すべて、CCR5のNtドメイン内に位置していた(図4)。E18A置換だけが、CCR5の機能を15~20倍減少させるのに十分であった。二重突然変異体D2A/D11Aは、いずれの一重突然変異体よりも低活性であり、三重突然変異体(D2A/D11A/E18A)はほぼ完全に不活性であった(野生型と比べて>50倍の侵入の減少)(図5A)。残りの置換はいずれも、このアッセイにおいてはCCR5の機能に有意な影響を及ぼさなかった(図5B、C)。両方のM指向性エンベローブ糖タンパク質で同様の結果を得た。二重指向性DH123エンベローブで認められた唯一の相違は、D11A置換に対する感受性の有意な増加であった(図5A)。このように、CCR5 Nt内の負に荷電した残基は、この分子の共受容体の機能に大きな影響を及ぼす。

10

HIV-1 env機能に関する独立したアッセイにおいてD2A、D11AおよびE18A置換の効果を研究するために、本発明者らは、JR-FL env遺伝子を安定に発現するHeLa細胞と、野生型または突然変異体CCR5で一過性にトランスフェクトしたHeLa-CD4細胞とを混合する膜融合アッセイを用いた(図6)(1,18)。それらの2つの細胞型を種々の蛍光プローブで標識し、それらの2つの染料が同一膜内に存在する場合にだけ生じる共鳴エネルギー転移(RET)(1,18)により融合をモニターする。本発明者らは、D2A、D11AおよびE18A一重突然変異体ならびに二重および三重突然変異体を、RETアッセイにおいて野生型CCR5と比較して試験した。各突然変異体は、ウイルス侵入アッセイで観察されたのと同じ表現型をこの融合アッセイにおいて有していた(図5A、6)。E18Aならびに二重および三重突然変異体は、env媒介性膜融合を補助することが完全に不可能であった。しかしながら、本発明者らが、ワクチン-T7ポリメラーゼ(vFT7-pol)系を用いて共受容体の発現を約100倍増強した場合には(1,4,5,13)、該CCR5突然変異体のそれぞれは、野生型タンパク質より低効率ではあったものの、膜融合を補助することができた(図6)。本発明者らは、CCRのCC-ケモカインリガンドが膜融合を阻害する能力をCCR過剰発現が破綻させることを既に認めており、このことは、CCR5発現が高すぎる場合にはいくつかの表現型変化が生じない可能性があることを示唆している(1)。しかしながら、vac-T7pol系での結果は、三重突然変異体(D2A/D11A/E18A)でさえ、共受容体として完全に不活性というわけではなく、非常に強く損なわれているにすぎないことを示している。

20

つぎに、本発明者らは、HIV-1の侵入を補助するCCR5突然変異体が、CCR5のCC-ケモカインリガンド(MIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTES)の阻害効果に対して感受性であるか否かを試験した(表1)(19-21)。

30

表 6

		MIP-1 α	MIP-1 β	RANTES	
Nt	Wt	100	100	100	10
	D2A	81	97	85	
	D11A	10	41	7	
	N13A	121	93	92	
	E18A	100	100	62	
	K22A	19	12	-11	
	K26A	100	97	100	
	R31A	-5	2	-16	
ECL1	Q93A	88	97	114	
	D95A	107	112	121	
	Q102A	107	98	93	
ECL2	K171A/E172A	21	97	107	20
	H175A	119	100	95	
	H181A	29	53	39	
	Y184A	102	68	36	
	Q188A	95	75	51	
	K191A/N192A	14	15	18	
ECL3	E262A	100	102	100	
	R274A/D276A	48	36	33	

表 6 : CC-ケモカインによる共受容体機能の阻害

U87MG-CD4細胞に、野生型または突然変異体CCR5を一過性にリポフェクションし、ついでN IIuc/JR-FLを感染させた(2 μ g/mlのMIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESの存在下または不存在下で行なった)。72時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した(1,2)。各突然変異体に対するCC-ケモカインによる相対阻害率(%)を、 $[1 - (\text{ケモカイン存在下のルシフェラーゼc.p.s.} / \text{ケモカイン不存在下のルシフェラーゼc.p.s.})] / [1 - (\text{ケモカイン存在下の野生型ルシフェラーゼc.p.s.} / \text{ケモカイン不存在下の野生型ルシフェラーゼc.p.s.})] \times 100\%$ と定義する。各値は、それぞれ四重に行なった3つの独立した実験の平均値である。相対阻害率(%)が野生型CCR5で認められるものの<50%である突然変異共受容体には、陰影が付されている。

(D2A、D11AおよびE18A突然変異体はHIV-1侵入に関して損なわれているが、それらは、阻害に対する感受性を測定するに十分な程度の侵入を補助したことに注意されたい。しかしながら、これは、Nt二重および三重突然変異体には当てはまらなかった)。U87MG-CD4細胞では、他の非リンパ球様細胞の場合と同様に(1,2,22)、CC-ケモカインは、HIV-1感染を完全には阻止せず、効果を得るためには高濃度を要する。したがって、本発明者らは、突然変異体および野生型CCR5受容体上でCC-ケモカインにより得られる阻害の程度を比較した(個々のリガンドに応じて40~60%、それぞれの効力はRANTES>MIP-1 β >MIP-1 α)。以下の突然変異体は、CC-ケモカインの1以上の作用に対して比較的に不感受性であった：D11A、K22A、R31A(Nt)、H181A、Y184A、K171A/E172A、K191A/N192A(ECL2)、R274A/D276A(ECL3)。これらのうち、D11Aだけが、HIV-1侵入および侵入のCC-ケモカイン阻害の両方に関して損なわれた。したがって、ある位置(ほとんどは、NtおよびECL2内)でのア

ミノ酸置換は、CCR5のHIV-1共受容体機能に影響を及ぼさないが、この過程のCC-ケモカイン媒介性阻害には影響を及ぼす(表6)。これらの置換がCC-ケモカインの作用に影響を与える様態は、明らかでない。しかしながら、最も簡単な解釈は、CCR5上のCC-ケモカイン結合部位とHIV-1相互反応部位とが同一ではなく、ECL2およびECL3内の或る置換がCC-ケモカイン結合部位にだけ影響を及ぼす、というものである。

Nt置換が如何にしてCCR5のHIV-1共受容体機能に影響を及ぼすのかを理解するために、本発明者らは、それらがgp120結合に影響を及ぼすか否かを確認した。本発明者らは、CCR5に対する標識化gp120の結合を直接測定することができなかった。なぜなら、一過性にトランスフェクトされた細胞上でのCCR5発現のレベルが低すぎて、試験したいいくつかの結合アッセイのいずれにおいても、再現可能なシグナルを得ることができなかったからである。したがって、本発明者らは、フィコエリトリン(PE)標識化CCR5特異的Mab(2D7-PE)(23-25)に対する結合をgp120(JR-FL)(7)が阻害する能力を測定する競合アッセイを用いた。このMabに対するエピトープはECL2内に位置し、本発明者らは、それが、CD4およびCCR5 Nt突然変異体でコトランスフェクトされたHeLa細胞に効率的に結合しうることを見出した。

gp120結合の検出を可能にする程度にまでCCR5を過剰発現するマウスL1.2細胞系(25)上のCCR5に対する(125)I標識gp120の結合を2D7が阻害することが、独立した研究で示されている(6,25)。ここでは、本発明者らは、野生型CCR5に対する2D7-PEの結合が、gp120を予め加えることにより強力(70%)に阻害されたことを示す。このことは、gp120および2D7と該受容体との相互作用が、互いに排他的であることを示している(図7)。しかしながら、gp120は、D2A、D11AおよびE18A突然変異体に対する2D7-PEの結合を部分的(40%)に阻害したにすぎず、二重および三重Nt突然変異体に対する2D7-PE結合の遮断に関してはほとんど無効であった(それぞれ25%および15%の阻害)(図7)。注目すべきは、HIV-1侵入に関して最も損なわれている突然変異体(図5)が、同時に、2D7-PE結合がgp120阻害に対して最も低感受性であるものでもあったことである(図7)。この結果についての最も確かな解釈は、gp120が、ECL2に対する2D7-PEの結合を立体的に妨害するように野生型CCR5分子に結合するが、Nt突然変異体には不完全にしか結合しない、というものである。それより低い可能性は、gp120がNt突然変異体に効率的に結合するものの、その結合が、ECL2に対する2D7-PE結合を阻害する可能性を低下させる異常な配向で生じる、というものである。後者の場合には、CCR5内のドメイン間相互作用の幾何構造は、CCR5共受容体機能を損なうNt置換により改変されている。

本研究において本発明者らは、共受容体機能のCC-ケモカイン阻害を必然的に妨げることなくCCR5の共受容体機能に影響を及ぼすアミノ末端ドメイン内の負に荷電した3個の残基での点置換を同定した。同じ置換は、おそらくgp120-CCR5相互作用のアフィニティを減少させることにより、gp120がCCR5と正しく相互作用する能力に影響を及ぼす。これは、共受容体欠損表現型を説明するのに十分であるかもしれない。CCR5内のNt置換により生じるgp120に対するアフィニティの喪失は、突然変異共受容体の過剰発現により部分的に補われうる(図6)。これはおそらく、低いアフィニティの共受容体の数の増加が、膜融合を開始させるエンベロープ糖タンパク質内のコンホメーション変化に適合するのに十分な程度に迅速に、首尾良いgp120-CCR5相互作用を引き起こしうるからであろう(26-28)。

したがって、CCR5上のgp120結合部位はNt内の残基に左右され、実際には、別個のgp120結合ドメインがNtに局限されている可能性がある。キメラ受容体または欠失突然変異体を用いる従前の研究は、共受容体機能に対するCCR5およびCXCR4 Ntの重要性を示している(8-10,29)。また、該キメラ研究は、CCR5とHIV-1との相互作用の部位が、比較的広く、ある程度柔軟であると示唆している(8-10)。この可能性を無視すべきではないが、受容体キメラの細胞外ループ内の改変がCCR5 Ntの配向(したがって、それがgp120と正しく相互作用する能力)に間接的に影響を及ぼしている可能性もある。gp120結合部位とは対照的に、CCR5上のCC-ケモカイン結合部位は、Nt内と細胞外ループ内との両方の残基に左右される(ECLが、独占的ではないものの顕著である)。したがって、gp120とCC-ケモカイン結

10

20

30

40

50

合部位との間には或る程度の重複があるが（CCR5に対するCC-ケモカイン結合のgp120阻害により示されるとおり）（6,7）、それらは同一ではなく、シグナル伝達および共受容体活性がCCR5の分離可能な機能であることを示す研究と一致した結論となる（10,30,31）。HIV-1の標的細胞内への侵入のためにHIV-1がCCR5を如何に使用するかを明らかにし、そしておそらくこの過程の阻害剤を開発するためには、gp120およびCC-ケモカインに対するCCR5上（およびCCR5に対するこれらの分子上）の相互活性部位についてのより詳細な理解が必要となろう。また、CCR5 Nt内で本発明者らが同定した負に荷電した残基が、gp120内、V3ループ内および/またはその他の部位内の正に荷電したアミノ酸と直接的または間接的に相互作用するか否かを確認することが重要となろう。

方法

リポフェクションおよびレポーター遺伝子アッセイ

突然変異cDNAをpcDNA3.1（Stratagene）発現ベクター内にサブクローニングした。U87MG-CD4およびSCL-1-CD4細胞を、リポフェクション（5 μ g/ml）およびpSVlacZ（5 μ g/ml）、または突然変異体DNA（4 μ g/ml）+ pSVlacZ（1 μ g/ml）（OPTI-MEM（Gibco BRL）内）と共に、37 で5時間インキュベートした。24時間後、200～500ng/ml p24を含有するNLuc/Env上清を、該細胞に37 で2時間感染させた。HIV-1の侵入のCC-ケモカインによる阻止のために、2 μ g/mlのMIP-1 α 、MIP-1 β またはRANTES（R & D System）を、HIV-1（50～100ng/ml p24）と同時に加え、該培養内に12時間維持した。感染の72時間後、細胞サンプルを100 μ lの溶解緩衝液（Promega）で処理し、ルシフェラーゼ（luc）および β -ガラクトシダーゼ活性（OD₄₂₀）を測定した（1,2）。標準化ルシフェラーゼ活性を、（luc c.p.s / ng/ml p24 / （OD₄₂₀ ÷ 対照OD₄₂₀） / （突然変異体CCR5バンドに関するr.f.e. ÷ 野生型CCR5バンドに関するr.f.e.））と定義する（以下を参照されたい）。Luc c.p.s.値は、野生型CCR5に関しては5 $\times 10^5$ ～2 $\times 10^6$ の範囲であった。

全細胞抽出物におけるCCR5発現の免疫プロット分析

この研究で使用するすべてのCCR5分子は、検出を容易にするために、C末端伸長として9残基の赤血球凝集素（HA）-タグを有していた。60mm組織培養プレートからのリポフェクション化U87MG-CD4細胞を、1%ドデシルマルトシドナトリウム、10mM Tris-HCl（pH6.8）、50mM NaCl、1mM CaCl₂、0.1mM PMSF、5 μ g/mlロイペプチン、10 μ g/mlアプロチニン、0.7 μ g/mlペプスタチンおよび10mM EDTAに再懸濁した。該懸濁液を4 で30分間インキュベートし、上清画分を集めた。全タンパク質濃度を、Bio-Rad DC Protein Assayを用いて測定した。ついでタンパク質（15 μ g）を、予め煮沸することなく、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分画した。タンパク質をImmobilon-Pメンブレン（Millipore）にトランスファーし、CCR5に関してウサギ抗HAタグ抗体（1:500希釈;Berkeley Antibody Company）およびAP標識ヤギ抗ウサギIgG（1:10⁴希釈;Amersham）でプローブし、ついで化学蛍光基質（Vistra ECF, Amersham）と共にインキュベートした。450nmで励起された免疫反応性バンドの相対蛍光発光（r.f.e.）を、レーザーベーススキャナー（laser-based scanner）（Molecular Dynamics Storm 860）上で検出した。全細胞抽出物と原形質膜抽出物とで同一の発現パターンが得られた。CCR5突然変異体の発現レベルは、野生型タンパク質の20%～100%で変化した。野生型CCR5の発現レベルとHIV-1の侵入効率との関係は、10倍の範囲にわたり直線的であることを確認した（データは示していない）。

CCR5結合に関するgp120と2D7MAbとの競合

リポフェクション（10 μ g/ml）およびpCDM8 CD4発現ベクター（3.75 μ g/ml）+野生型または突然変異型CCR5プラスミド（1.25 μ g/ml）と共に、HeLa細胞（2 $\times 10^6$ 個）をOPTI-MEM内で5時間インキュベートした。ついで、CCR5発現を増強するために、該細胞に2 $\times 10^7$ p.f.u.のvFT7を12時間感染させ、その細胞を2mM EDTA/PBSで解離させ、結合緩衝液（DPBS内の1%BSA、0.05%アジド）で1回洗浄した。細胞（1 $\times 10^6$ 個）を、10 μ g/mlのgp120（JR-FL）（7）の存在下または不存在下、37 で1時間インキュベートした後、PE標識2D7 MAb（23,24）（20ng/ml）を4 で30分間加えた。該細胞を結合緩衝液で1回、PBSで1回洗浄し、1%ホルムアルデヒド/PBSに再懸濁し、FACSにより分析して、平均蛍光強度（m.f.i.）を測定した。Leu3Aでの染色によりCD4の発現をモニターした。該発現は、サンプル

10

20

30

40

50

間で±10%以下で変動した。CCR5突然変異体の発現レベルは、野生型CCR5の発現レベルの20%～100%の範囲であった

第三の一連の実験の参考文献

1. Dragic, T., et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-673 (1996).
2. Deng, H.K., et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661 -666 (1996). 10
3. Choe, H., et al. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 86, 1135-1148 (1996).
4. Doranz, B.J., et al. A dual-tropic, primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 86, 1149-1159 (1996).
5. Alkhatib, G., et al. CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955-1958 (1996). 20
6. Wu, L., et al. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384, 179-183 (1996).
7. Trkola, A., et al. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR5. *Nature* 384, 184-186 (1996). 30
8. Rucker, J., et al. Regions in β -chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell* 87, 437-446 (1996).
9. Atchison, R.E., et al. Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: Dissociation from response to chemokines. *Science* 274, 1924-1926 (1996).
10. Bieniasz, P.D., et al. HIV-1 induced cell fusion is mediated by multiple regions within both the viral envelope and the CCR-5 co-receptor. *EMBO J* . (in press). 40

11. Murphy, P. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 12, 593-633 (1994).
12. Wells, T.N.C., et al. Selectivity and antagonism of chemokine receptors. *J.Leukoc.Biol.* 59, 53-60 (1996).
13. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. & Berger, E.A. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877 (1996) . 10
14. Berson, J.F., et al. A seven transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell tropic human immunodeficiency virus type-1 strains. *J.Virol.* 70, 6288-6295 (1996).
15. McKnight, A., et al. Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent. *J. Virol.* 71, 1692-1696 (1997). 20
16. Shibata, R. et al. Isolation and characterization of a syncytium-inducing, macrophage/T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolate that readily infects chimpanzee cells in vitro and in vivo. *J.Virol.* 69, 4453-4462 (1995).
17. Trkola, A., Dragic, T. & Moore, J.P. (unpublished results). 30
18. Litwin, V. et al: Human immunodeficiency virus type 1 membrane fusion mediated by a laboratory-adapted strain and a primary isolate analyzed by resonance energy transfer. *J. Virol.* 70, 6437-6441 (1996) .
19. Cocchi, F., et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270, 1811 - 1815 (1995). 40

20. Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G. & Parmentier, M. Molecular cloning and functional expression of a new CC-chemokine receptor gene, CC-CKR5. *Biochemistry* 11, 3362-3367 (1996).
21. Raport, C.J., Gosling, J., Schweickart, V.L., Gray, P.W. & Charo, I.F. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC-chemokine receptor (CCR5) for Rantes, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J.Biol.Chem.* 271, 17161-17166 (1996). 10
22. Moriuchi, M., Moriuchi, H., Combadiere, C., Murphy, P.M. & Fauci, A.S. CD8+ T cell-derived factor(s), but not β -chemokines RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β , suppress HIV-1 replication in monocyte/ macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 15341-15345 (1996).
23. Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., & Mackay, C.R. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94, 1925-1930 (1997). 20
24. Wu, L., et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage tropic HIV-1, in vitro. *J.Exp.Med.* 185, 1681-1691 (1997).
25. Wu, L. et al. (Manuscript in preparation).
26. Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. & Kim, P.S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-273 (1997). 30
27. Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J. & Wiley, D.C. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387, 426-430 (1997).
28. Binley, J. & Moore, J.P. HIV-cell fusion. The viral mousetrap. *Nature* 387, 346-348 (1997).

29. Picard, L. et al. Role of the amino-terminal extracellular domain of CXCR-4 in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Virology* 231, 105-111 (1997).
30. Farzan, M., et al. HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1 β -mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5. *J. Biol. Chem.* 272, 6854-6857 (1997).
31. Gosling, J. et al. Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5-induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 94, 5061 -5066 (1997).

10

第四の実験

CCR5⁺CD4⁻細胞へのHIV-1_{JR-FL}gp120の直接的結合

CCR5⁺CD4⁻細胞へのHIV-1_{JR-FL}gp120の直接的結合を実証した。この場合には、gp120をsCD4又は他のCD4ベースの分子とブレインキュベートすることが必要であるが、おそらく、これによってケモカイン受容体結合部位を露出せしめるgp120の立体構造の変化がもたらされるためであると思われる。図8は、ヒトCCR5を有するマウスL1.2細胞へのsCD4/gp120複合体の直接的結合を測定するためのフローサイトメトリーの使用を表している。結合のバックグラウンドレベルは、ビオチン化されたタンパク質のみ、又は実験室に適合させたHIV-1LAI株を用いるならばHIV-1_{JR-FL}gp120の代わりの何れかによって観察した(図には示されていない)。

20

該アッセイは、薬物スクリーニングの目的のために、sCD4/gp120複合体のCCR5⁺/CD4⁻細胞への結合が、蛍光プレートリーダーを用いて測定される96穴マイクロプレートフォーマットに適合させた。一つの方法は、以下のとおりである。

- 1) L1.2-CCR5⁺細胞を播種する(約500,000/ウェル)
- 2) 室温で1時間阻害剤を添加する
- 3) 洗浄し、ビオチン化されたsCD4(2.5 μ g/mL)及びビオチン化されたHIV-1_{JR-FL}gp120(5 μ g/mL)を加え、次に室温で2時間インキュベートする
- 4) 洗浄し、ストレプトアビジン-フィコエリトリン(100ng/nL)とともにインキュベートする
- 5) 洗浄し、530nmでの励起、及び590nmの測定蛍光で蛍光プレートリーダーを用いて、結合したgp120/sCD4の量を測定する

30

該方法を用いて、CCケモカインによるgp120/sCD4へのCCR5の阻害(図9)及びHIV-1感染をブロックするCCR5に対する抗体(図には示されていない)が実証された。

CCR5の細胞外ドメインによるHIV-1エンベロープを介した膜融合の阻害

クオリティー・コントロールド・バイオケミカルズ(Quality Controlled Biochemicals; Hopkinton, MA)によってヒトCCR5の4つの細胞外ドメインに相当する合成ペプチドを作成し、上述した共鳴エネルギー移動(RET)アッセイを用いて、HIV-1のLAI又はJR-FL株のエンベロープ糖タンパク質によって介される膜融合を阻害する能力をテストした。ECL2ペプチドを用いると、JR-FLエンベロープによって介される融合の特異的な阻害がみられたが、他のペプチドではみられなかった。ECL2は、100 μ g/mLで97%、33 μ g/mLで65%、及び11 μ g/mLで15%、HeLa-env_{JR-FL}細胞とPM1細胞との融合を阻害した(二つのアッセイの平均)。ECL2はHeLa-env_{LAI}とPM1細胞との融合又はHeLa-env_{LAI}とHeLa-CD4細胞との融合を阻害しなかった。これらの結果は、おそらくHIV-1JR-FL gp120とCCR5との相互作用をブロックすることによって、CCR5 ECL2が融合を特異的に阻害することを強く示唆している。テストした他のペプチドは、有意なレベルの特異的な融合の阻害を与えなかった。

40

50

バイサイクラム、JM3100によるHIV-1エンベロープを介した膜融合の阻害

J.ムーア博士 (Dr. J. Moore; Aaron Diamond AIDS Research center, NY) から入手したバイサイクラムが、上述した共鳴エネルギー移動 (RET) アッセイを用いて、HIV-1のLAI又はJR-FL株のエンベロープ糖タンパク質によって介される膜融合を阻害する能力をテストした。図10に示されているように、該分子は、HIV-1_{LAI}由来のgp120/gp41によって介される融合を特異的且つ強力に阻害するが、HIV-1_{JR-FL}株由来のgp120/gp41によって介される融合は阻害しない。これらのデータは、HIV-1_{LAI}gp120とCXCR4との相互作用をブロックすることによって、該分子がHIVの融合を特異的に阻害することを示唆している。

配列表

- (1) 一般情報: 10
- (i) 出願人: アラウェイ, グラハム P
ドラジク, タティヤナ
リトウィン, バージニア A
マドン, ポール J
ムーア, ジョン P
- (ii) 発明の名称: HIV-1感染を阻害するためのケモカイン受容体の使用
- (iii) 配列の数: 30
- (iv) 通信宛先:
- (A) 名宛人: クーパー・アンド・ダンハム LLP
- (B) 通り: 1185 アヴェニュー・オブ・ジ・アメリカズ 20
- (C) 市: ニューヨーク
- (D) 州: ニューヨーク
- (E) 国: アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号: 10036
- (v) コンピュータ読取り可能な形態:
- (A) 媒体タイプ: フロッピーディスク
- (B) コンピュータ: IBM・PCコンパチブル
- (C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア: Patent Inリリース#1.0、バージョン#1.30
- (vi) 現在の出願データ: 30
- (A) 出願番号:
- (B) 出願日:
- (C) 分類:
- (viii) アトニー/エージェント情報:
- (A) 氏名: ホワイト, ジョン P.
- (B) 登録番号: 28, 678
- (C) 参照/ドケット番号: 51320
- (ix) 電信情報:
- (A) 電話: (212) 278-0400
- (B) テレファックス: (212) 391-0525 40
- (2) 配列認識番号: 1のための情報:
- (i) 配列特性:
- (A) 長さ: 38塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: DNA (genomic)
- (xi) 配列の記載: 配列認識番号: 1:
CAAGGCTACT TCCCTGATTG GCAGAACTAC ACACCAGG 38
- (2) 配列認識番号: 2のための情報: 50

(i) 配列特性：

(A) 長さ：25塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列認識番号：2：

AGCAAGCCGA GTCCTGCGTC GAGAG 25

(2) 配列認識番号：3のための情報：

(i) 配列特性：

10

(A) 長さ：23塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列認識番号：3：

GGGACTTTC GCTGGGGACT TTC 23

(2) 配列認識番号：4のための情報：

(i) 配列特性：

20

(A) 長さ：33塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列認識番号：4：

CCTGTTCGGG CGCCACTGCT AGAGATTTTC CAC 33

(2) 配列認識番号：5のための情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：31アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

30

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列の記載：配列認識番号：5：

Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
1 5 10 15

Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg
20 25 30

(2) 配列認識番号：6のための情報：

(i) 配列特性：

40

(A) 長さ：15アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列の記載：配列認識番号：6：

His Tyr Ala Ala Gln Trp Asp Phe Gly Asn Thr Met Cys Gln
1 5 10 15

(2) 配列認識番号：7のための情報：

(i) 配列特性：

50

(A) 長さ : 3 2 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 7 :

Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr Thr Cys Ser Ser His Phe Pro
1 5 10 15

Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val
20 25 30

10

(2) 配列認識番号 : 8 のための情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 1 7 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 8 :

Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser Asn Arg Leu Asp
1 5 10 15

20

Gln

(2) 配列認識番号 : 9 のための情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 3 6 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (g e n o m i c)

(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 9 :

AAGCTTGGAG AACCAGCGGT TACCATGGAG GGGATC

36

30

(2) 配列認識番号 : 1 0 のための情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 3 0 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (g e n o m i c)

(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 1 0 :

GTCTGAGTCT GAGTCAAGCT TGGAGAACCA

30

40

(2) 配列認識番号 : 1 1 のための情報 :

(i) 配列特性 :

(A) 長さ : 4 1 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (g e n o m i c)

(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 1 1 :

CTCGAGCATC TGTGTTAGCT GGAGTGAAAA CTTGAAGACT C

41

(2) 配列認識番号 : 1 2 のための情報 :

(i) 配列特性 :

50

- (A) 長さ：30塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (xi) 配列の記載：配列認識番号：12：
GTCTGAGTCT GAGTCCTCGA GCATCTGTGT 30
- (2) 配列認識番号：13のための情報：
 (i) 配列特性：
 (A) 長さ：32塩基対 10
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (xi) 配列の記載：配列認識番号：13：
AAGCTTCAGA GAGAAGCCCG GATGGAAACT CC 32
- (2) 配列認識番号：14のための情報：
 (i) 配列特性：
 (A) 長さ：30塩基対
 (B) 型：核酸 20
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (xi) 配列の記載：配列認識番号：14：
GTCTGAGTCT GAGTCAAGCT TCAGAGAGAA 30
- (2) 配列認識番号：15のための情報：
 (i) 配列特性：
 (A) 長さ：32塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖 30
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (xi) 配列の記載：配列認識番号：15：
CTCGAGCTGA GTCAGAACCC AGCAGAGAGT TC 32
- (2) 配列認識番号：16のための情報：
 (i) 配列特性：
 (A) 長さ：30塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状 40
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic)
 (xi) 配列の記載：配列認識番号：16：
GTCTGAGTCT GAGTCCTCGA GCTGAGTCAG 30
- (2) 配列認識番号：17のための情報：
 (i) 配列特性：
 (A) 長さ：32塩基対
 (B) 型：核酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：DNA (genomic) 50

(xi) 配列の記載：配列認識番号：17： AAGCTTCAGT ACATCCACAA CATGCTGTCC AC	32	
(2) 配列認識番号：18のための情報：		
(i) 配列特性：		
(A) 長さ：30塩基対		
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(ii) 配列の種類：DNA (genomic)		
(xi) 配列の記載：配列認識番号：18： GTCTGAGTCT GAGTCAAGCT TCAGTACATC	30	10
(2) 配列認識番号：19のための情報：		
(i) 配列特性：		
(A) 長さ：31塩基対		
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(ii) 配列の種類：DNA (genomic)		
(xi) 配列の記載：配列認識番号：19： CTCGAGCCTC GTTTTATAAA CCAGCCGAGA C	31	20
(2) 配列認識番号：20のための情報：		
(i) 配列特性：		
(A) 長さ：30塩基対		
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(ii) 配列の種類：DNA (genomic)		
(xi) 配列の記載：配列認識番号：20： GTCTGAGTCT GAGTCCTCGA GCCTCGTTTT	30	
(2) 配列認識番号：21のための情報：		30
(i) 配列特性：		
(A) 長さ：29塩基対		
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(ii) 配列の種類：DNA (genomic)		
(xi) 配列の記載：配列認識番号：21： AAGCTTCAGG GAGAAGTGAA ATGACAACC	29	
(2) 配列認識番号：22のための情報：		
(i) 配列特性：		40
(A) 長さ：30塩基対		
(B) 型：核酸		
(C) 鎖の数：一本鎖		
(D) トポロジー：直鎖状		
(ii) 配列の種類：DNA (genomic)		
(xi) 配列の記載：配列認識番号：22： GTCTGAGTCT GAGTCAAGCT TCAGGGAGAA	30	
(2) 配列認識番号：23のための情報：		
(i) 配列特性：		
(A) 長さ：33塩基対		50

(B) 型 : 核酸	
(C) 鎖の数 : 一本鎖	
(D) トポロジ : 直鎖状	
(ii) 配列の種類 : DNA (g e n o m i c)	
(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 2 3 :	
CTCGAGCAGA CCTAAACAC AATAGAGAGT TCC	33
(2) 配列認識番号 : 2 4 のための情報 :	
(i) 配列特性 :	
(A) 長さ : 3 0 塩基対	
(B) 型 : 核酸	10
(C) 鎖の数 : 一本鎖	
(D) トポロジ : 直鎖状	
(ii) 配列の種類 : DNA (g e n o m i c)	
(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 2 4 :	
GTCTGAGTCT GAGTCCTCGA GCAGACCTAA	30
(2) 配列認識番号 : 2 5 のための情報 :	
(i) 配列特性 :	
(A) 長さ : 3 4 塩基対	
(B) 型 : 核酸	
(C) 鎖の数 : 一本鎖	20
(D) トポロジ : 直鎖状	
(ii) 配列の種類 : DNA (g e n o m i c)	
(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 2 5 :	
AAGCTTCTGT AGAGTTAAAA AATGAACCCC ACGG	34
(2) 配列認識番号 : 2 6 のための情報 :	
(i) 配列特性 :	
(A) 長さ : 3 0 塩基対	
(B) 型 : 核酸	
(C) 鎖の数 : 一本鎖	
(D) トポロジ : 直鎖状	30
(ii) 配列の種類 : DNA (g e n o m i c)	
(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 2 6 :	
GTCTGAGTCT GAGTCAAGCT TCTGTAGAGT	30
(2) 配列認識番号 : 2 7 のための情報 :	
(i) 配列特性 :	
(A) 長さ : 3 4 塩基対	
(B) 型 : 核酸	
(C) 鎖の数 : 一本鎖	
(D) トポロジ : 直鎖状	
(ii) 配列の種類 : DNA (g e n o m i c)	40
(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 2 7 :	
CTCGAGCCAT TTCATTTTTC TACAGGACAG CATC	34
(2) 配列認識番号 : 2 8 のための情報 :	
(i) 配列特性 :	
(A) 長さ : 3 0 塩基対	
(B) 型 : 核酸	
(C) 鎖の数 : 一本鎖	
(D) トポロジ : 直鎖状	
(ii) 配列の種類 : DNA (g e n o m i c)	
(xi) 配列の記載 : 配列認識番号 : 2 8 :	50

GTCTGAGTCT GAGTCCTCGA GCCATTTCAT

30

(2) 配列認識番号：29のための情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：39塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列の記載：配列認識番号：29：

GTCTGAGTCT GAGTCAAGCT TAACAAGATG GATTATCAA

39

10

(2) 配列認識番号：30のための情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：39塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

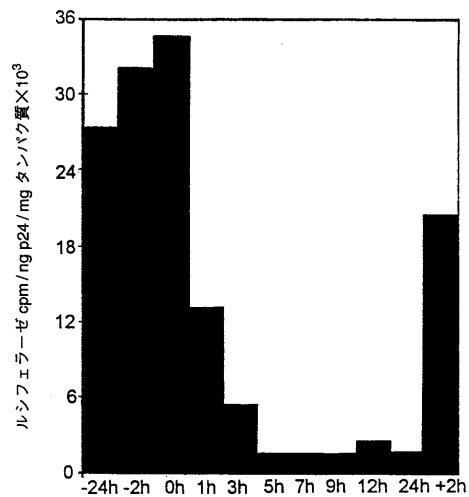
(xi) 配列の記載：配列認識番号：30：

GTCTGAGTCT GAGTCCTCGA GTCCGTGTCG CAAGCCCAC

39

【図1A】

FIG. 1A



【図1B】

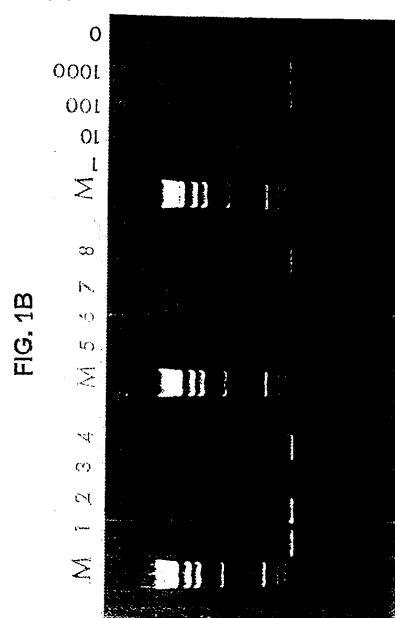


FIG. 4

【図 4】

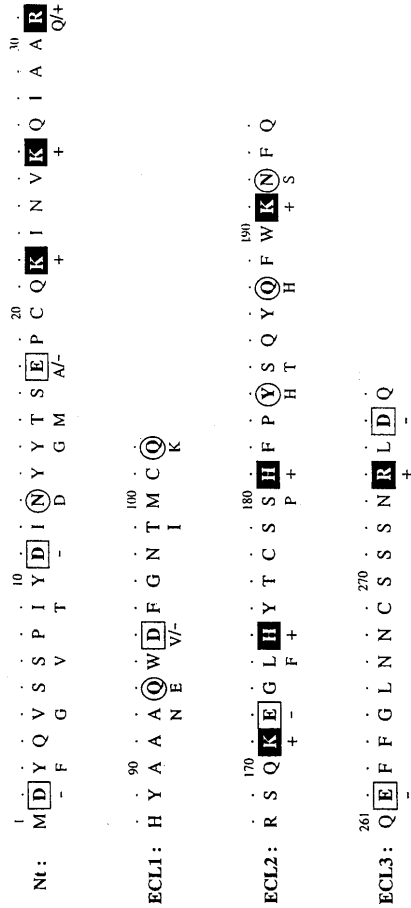


FIG. 2

【図 2】

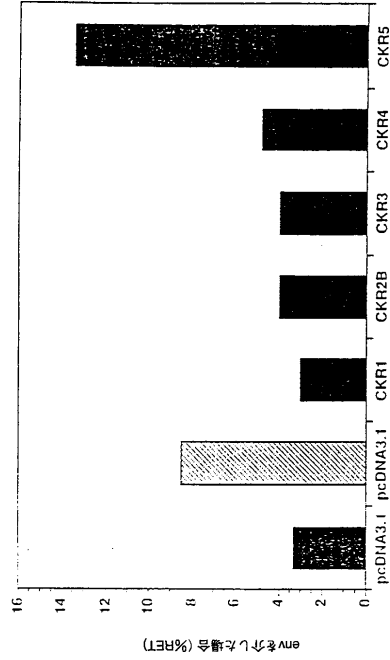


FIG. 5A

【図 5 A】

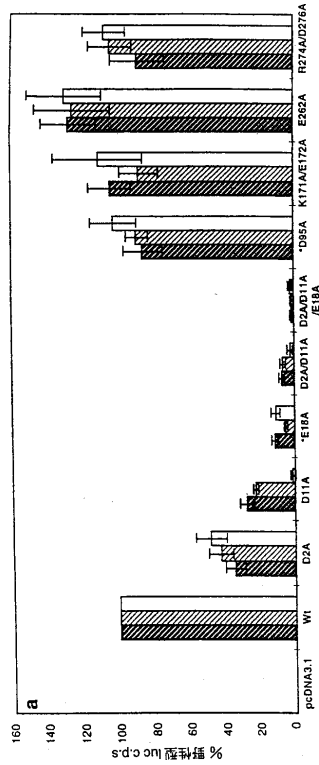


FIG. 3B

【図 3 B】

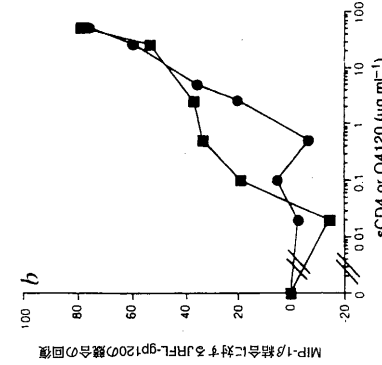
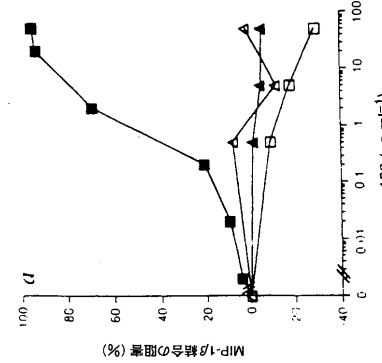
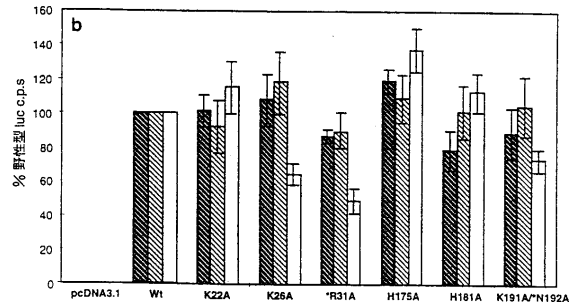
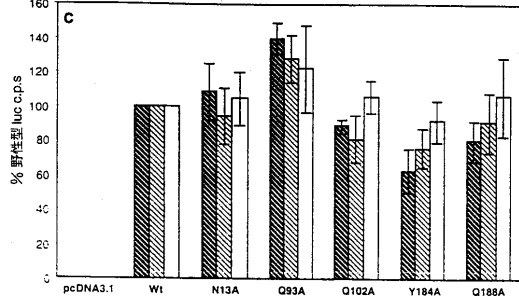


FIG. 3A

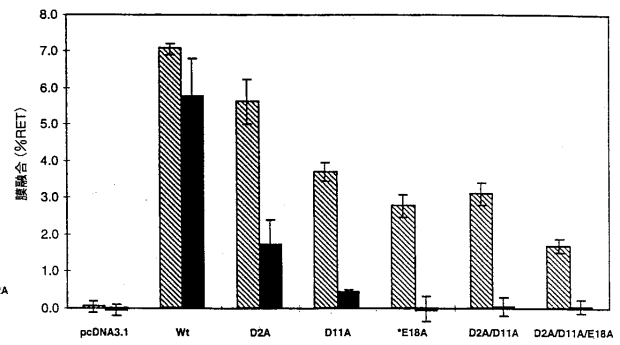
【図 3 A】



【図 5 B】
FIG. 5B【図 5 C】
FIG. 5C

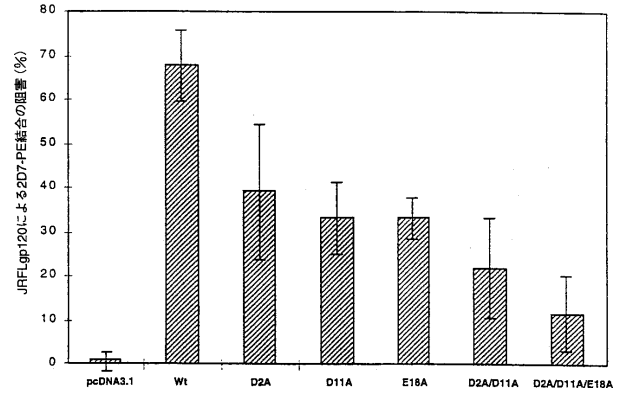
【図 6】

FIG. 6

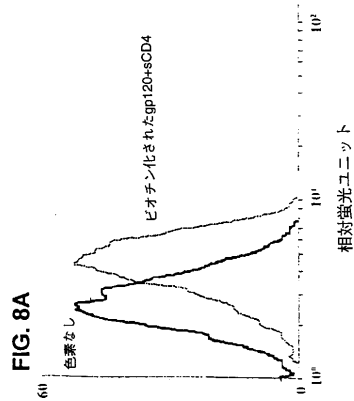


【図 7】

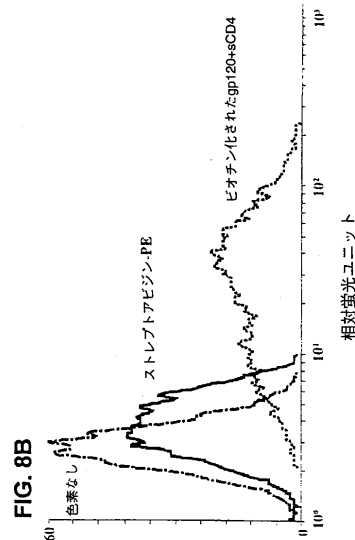
FIG. 7

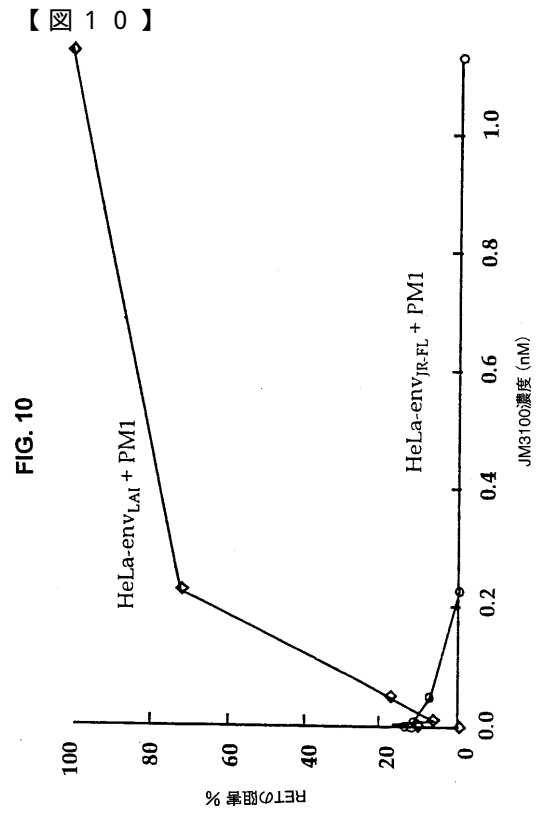
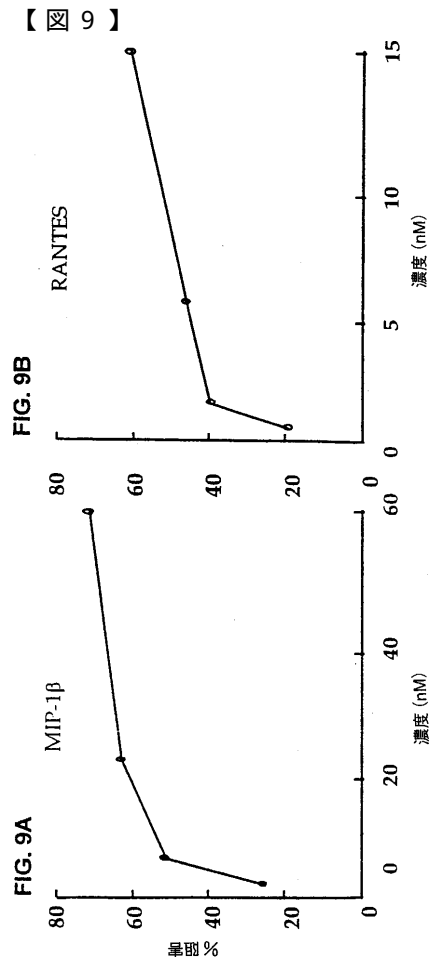


【図 8 A】



【図 8 B】





フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/715 (2006.01) C 0 7 K 14/715
A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02

(74)代理人

弁理士 村松 貞男

(74)代理人

弁理士 橋本 良郎

(74)代理人

弁理士 白根 俊郎

(72)発明者 オールアウェイ、グラハム・ピー

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 5 4 7、モヘガン・レイ7、ホートン・アベニュー 1 7
 7 8

(72)発明者 ドラジック、タットジャナ

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 5 3 0、ハーツデル、ハーバード・ドライブ 1 1 1

(72)発明者 リットウィン、バージニア・エム

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 3 0 6 6、ファイエットビル、バトンベール・ロード 5 8
 1

(72)発明者 マッドン、ポール・ジェイ

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 0 3 2、ニューヨーク、ヘイブン・アベニュー 6 0、ア
 パートメント 2 5シー

(72)発明者 ムーア、ジョン・ピー

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 0 2 1、ニューヨーク、イースト・シックスティースード
 ・ストリート 5 0 0、アパートメント 2 3シー

(72)発明者 トルコラ、アレクサンドラ

アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 0 0 1 6、ニューヨーク、ファースト・アベニュー 4 5 5
 、セブンス・フロアー、アロン・ダイヤモンド・エイズ・リサーチ・センター内

審査官 田中 公子

(56)参考文献 国際公開第95/016789 (WO, A1)

国際公開第94/022477 (WO, A1)

Biochemistry, 1996年 3月, Vol.35, p3362-3367

Science, 1996年 5月, Vol.272, p872-877

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

A61K 38/00

A61K 45/00

A61P 31/18

A61P 43/00

C07K 14/16

C07K 14/715

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

Science Direct

JSTPlus(JDreamII)