

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-132846

(P2005-132846A)

(43) 公開日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 P 37/02	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 37/02</b>	A 6 1 K 37/02	
// <b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2004-368543 (P2004-368543)	(71) 出願人	503224769
(22) 出願日	平成16年12月20日 (2004.12.20)		スチヒティング カソリーケ ユニバーシ
(62) 分割の表示	特願2002-552012 (P2002-552012)		テット
原出願日	平成13年12月21日 (2001.12.21)		オランダ国 ネイメヘン 6500 ハー
(31) 優先権主張番号	00128143.5		パー ヘルート フローテプライン 10
(32) 優先日	平成12年12月21日 (2000.12.21)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	01200944.5	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成13年3月13日 (2001.3.13)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓およびリンパ節中の類洞内皮細胞上において、新規な ICAM-3 結合レセプターの結合活性を調節するための方法

(57) 【要約】

【課題】

動物における免疫応答を調節するために、肝臓およびリンパ節中の類洞内皮細胞の表面に位置する C 型レクチンに結合する化合物の提供。

【解決手段】

化合物の使用であって、該化合物は、動物（特にヒトまたは別の哺乳動物）における免疫応答を調節、特に減少させるための組成物の調製において、洞様内皮層の表面上で C 型レクチンに結合する、使用であって、1つの実施形態において、上記洞様内皮層が肝臓洞様内皮細胞（LSEC）によって構成され、また別の実施形態において、上記洞様内皮層がリンパ節洞様域によって構成される、使用。

。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

化合物の使用であって、該化合物は、動物（特にヒトまたは別の哺乳動物）における免疫応答を調節、特に減少させるための組成物の調製において、洞様内皮層の表面上でC型レクチンに結合する、使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、動物における免疫応答を調節するために、肝臓およびリンパ節中の類洞内皮細胞の表面に位置するC型レクチンに結合する化合物の使用に関する。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

分子DC-SIGNは、近年、ICAM-3への高親和性結合を介してDCと休止T細胞との間の相互作用を媒介し、その結果、一次免疫応答の開始を促進する、DC特異的接着レセプターとして同定された。DC-SIGNは、以前に報告されたII型膜関連C型レクチンと同一であると示され(Geijtenbeek, T. B.ら、2000、Cell 100:575~585)、このII型膜関連C型レクチンは、CD4非依存的様式でHIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120に結合する。DC-SIGNの親和性は、HIV-1 gp120に対するCD4の親和性を超え(Curtis, B. M.ら、1992、Proc Natl Acad Sci USA 89:8356-8360)、そして、HIV-1の捕捉に関して、DC-SIGNはDC自身へのウイルス侵入を促進しそうではなく、むしろtransでのT細胞の感染を増強する(Geijtenbeek, T. B.ら、2000、Cell 100:587-597)。DC-SIGN関連HIV-1は、恐らく、DCによる末梢からリンパ器官へのHIV-1の輸送の間、ウイルスの感染潜在力に寄与して、長期間わたって感染を残存させる。

20

## 【0003】

Yokoyama-kobayashiら(1999、Gene 228:161-167)による、II型膜タンパク質をコードするcDNAクローンについての以前の研究の結果としては、現在はDC-SIGNとして既知の分子をコードするcDNAと相同であるが同一ではない部分的クローンの同定を示した。推定タンパク質生成物は、細胞質ドメイン中に28アミノ酸の欠失を含み、そして、DC-SIGNをコードするcDNAに関するC型レクチンドメインの全体が欠如していた。

30

## 【0004】

さらに最近、Soilleuxら、(2000、J Immunol 165:2937-2942)は、関連する遺伝子の全長cDNA配列について記述し、これをSoilleuxらはDC-DIGNRと呼んだ。DC-SIGNおよびDC-SIGNRのゲノム構成が比較され、これは、高度の類似性を示した。胎盤、子宮内膜および刺激されたKG1細胞(骨髄系DCと表現型的に類似する細胞株)における2つの遺伝子の同時発現は、DC-SIGNRの発現が子宮内膜および刺激されたKG1細胞の両方において非常に低度ではあるが、観察された。

40

## 【0005】

本発明を導いた研究において、DC-SIGNR遺伝子が、単球誘導樹状細胞ではなく、2つの組織(肝臓およびリンパ節)中でのみ顕著に高レベルで発現されるということを知り、現在見出した。レセプターは「L-SIGN」と名称を変更された、なぜなら、このレセプターは、肝臓/リンパ節特異的ICAM-3捕獲非インテグリンであるからである。

## 【0006】

相同なヒトC型レクチンDC-SIGNおよびL-SIGNは、新しい遺伝子複製の生成物でありそうである。対応するタンパク質は、完全に同一のリガンド特異性を共有しないとしても、同一のドメイン構成および重複を共有する。この分子の最も多様な領域は、その細胞質の尾部中に生じる。

50

## 【0007】

DC-SIGNについての遺伝子とL-SIGNについての遺伝子との間の別の明確な差異は、L-SIGNのエキソン4における反復多型であり、これは、DC-SIGNにおいては保存される(表1)。L-SIGNのネックドメインは、3~9の反復を含み得る一方、DC-SIGNは、試験されたCaucasianの間で常に7個の反復からなる。6つの反復を含むL-SIGN分子または7つの反復を含むL-SIGN分子の間で、リガンド結合においても、HIV-1捕捉および増強実験においても差異は観察されなかった。

## 【0008】

SIGN遺伝子は、それらの進化的歴史を超えて、配列および機能的類似性を保持するが、それらの組織区分を決定する調節エレメントが特有の経路に沿って進化するということが、現在は、本発明に基づいて、驚くほど見出された。mRNA発現のNorthern分析は、単球誘導DCにおいておよびDCが存在する組織において、DC-SIGNの発現を明らかに示したが、DCにおいてL-SIGNの発現は、検出不可能であった(図2)。さらに、L-SIGNは、L-SIGNに対して特異的な抗体を使用して、単球誘導DC上で検出されなかった(図3C)。従って、リンパ節中の特有の細胞型は、両方のSIGN分子でなく一方のSIGN分子を発現すること：L-SIGNは、肝臓中で存在する場合は、内皮細胞によって発現される一方、DC-SIGNはリンパ節のT細胞領域におけるDCによって発現されるということが見出された。発現パターンにおけるこの差異は、配列相同性に基づいて予測され得なかった。

10

20

## 【0009】

肝臓洞様毛細血管は、内皮内層に接着する在住マクロファージの存在によって特徴付けられる特定の毛細血管である。LSEC白血球の相互作用(これは、細胞表面上での接着分子の発現を必要とする)は、肝臓中の末梢免疫サーベイランスの中心的機構を構成する。マンノースレセプターならびに他の同時刺激レセプター(MHCクラスII、CD80およびCD86)は、LSEC上で発現されること、およびリンパ器官中においてDCに類似の様式で、循環からの多くの潜在的抗原性タンパク質のクリアランスを媒介することが知られている。

## 【発明の開示】

## 【課題を解決するための手段】

30

## 【0010】

本発明者らは、L-SIGNがLSEC上のレセプターのこの分類に適合するということを確立した、なぜならその組織部位およびリガンド結合特性は、抗原クリアランスにおいて、ならびにLSEC白血球接着において、このレセプターに対する生理学的役割に強く関係しているからである。アポトーシス細胞上のICAM-3の高発現は、これらの細胞が肝臓中でL-SIGN発現細胞によって捕捉され、続いて除去される手段である。

## 【0011】

DC-SIGNのように、L-SIGNは、HIV-1感染を増強する膜関連レクチンである。肝臓洞様毛細血管におけるL-SIGNの発現は、LSEC(通過する白血球と頻りに接触する)が血液からHIV-1を捕獲し、そして、T細胞のtrans感染を促進するというを示す。

40

## 【0012】

さらに、LSEC自身は、HIV-1感染に対して感受性であり得る。従って、L-SIGNがこれらの細胞の感染を促進し、その結果、肝臓洞様毛細血管を通過するT白血球を与えるような新しいウイルスの生成のためのレザバーを樹立することが、可能となる。

## 【0013】

上記の知見に基づいて、本発明は、動物(特に、ヒトまたは別の哺乳動物)中の免疫応答を調節する(特に減少させる)ための組成物の調製における、洞様毛細血管内皮層の細胞表面上のC型レクチンに結合する化合物の使用に関する。洞様毛細血管内皮層の細胞表面上のC型レクチンは、特にL-SIGNである。

50

## 【0014】

洞様毛細血管内皮層の細胞は、肝臓洞様毛細血管内皮の細胞（LSEC）またはリンパ節の洞様毛細血管領域の細胞のいずれかによって構成される。

## 【0015】

本発明の組成物は、洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）とICAM-2および/またはICAM-3を発現する細胞（特にT細胞）との間の1つ以上の相互作用を調節する（特に減少させる）ために使用され得る。より特に、この組成物は、洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）とICAM-2および/またはICAM-3を発現する細胞（特にT細胞）との間で、特に、LSECの表面上のC型レクチンとT細胞の表面上のICAMレセプター（特にT細胞の表面上のICAM-2レセプターまたはICAM-3レセプター）との間での接着を調節する（特に減少させる）ために使用される。

10

## 【0016】

本発明に従って調製される組成物は、耐性誘導、免疫治療、免疫抑制、自己免疫疾患の処置、および/またはアレルギーの処置に関して、特異的抗体に対する免疫応答を予防または阻害するために、適用される。

## 【0017】

さらなるその局面に従って、本発明は、洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）のHIV感染を阻害するため（特に、HIV表面タンパク質（すなわちgp120）の洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）の表面への接着により、HIVの上記細胞への侵入を阻害するため）の、組成物の調製における、洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）の表面上のC型レクチンに結合するか、または結合し得る化合物の使用に関する。

20

## 【0018】

本発明はさらに、洞様毛細血管内皮層の細胞（それ自身を感染させ得るかまたはさせ得ない）（特に、LSEC）由来のHIVの非感染T細胞への移動を阻害するための組成物の調製において、洞様毛細血管内皮層細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合するか、または結合し得る化合物の使用に関する。

## 【0019】

あるいは、本発明は、調節するための組成物の調製において、（特に、上記抗原に対する動物（特に、ヒトまたは他の哺乳動物）における免疫応答を生成、増大、および/または促進する際に、）以下の組合せの使用を提供する：1）洞様内皮層細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合し、そしてそれに付着する化合物；2）抗原またはそのフラグメントもしくは一部。好ましくは、この抗原は、C型レクチンに結合し得る化合物に共有結合されるか、または、融合され得る。この抗原は、例えば、この抗原もしくは感染症に対するワクチンで使用されるような抗原を含むか、または発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を生成するために使用され得る癌抗原から、選択される。

30

## 【0020】

洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合し得る化合物は、好ましくは、以下からなる群から選択される：マンノース炭水化物（例えば、マンナンおよびD-マンノース）；フコース炭水化物（例えば、L-フコース）；植物レクチン（例えば、コンカナバリンA）；抗生物質（例えば、パラジミンA）；糖（例えば、N-アセチル-D-グルコサミンおよびガラクトース）；タンパク質（例えば、gp120およびそのアナログまたはフラグメント）；および洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面で発現されるようなC型レクチンに対して特異的な抗体、またはその一部、フラグメントもしくはエピトープ。

40

## 【0021】

洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面のC型レクチンは、好ましくは、図7のアミノ酸配列を有するタンパク質、またはその天然の変異体もしくは等価物である。

## 【0022】

あるいは、洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面のC型レクチンに結合

50

し得る化合物は、モノクローナル抗体、好ましくは、図7のアミノ酸配列を有するC型レクチンに対して特異的であるモノクローナル抗体、またはその天然の変異体もしくは等価物；および/またはその一部、フラグメントもしくはエピトープである。

【0023】

そのさらなる局面に従って、本発明は、抗体、好ましくは、図7のアミノ酸配列を有するC型レクチンに対して特異的であるモノクローナル抗体、またはその天然の変異体もしくは等価物；および/または、その一部、フラグメントまたはエピトープに関する。この抗体は、好ましくはAZN-D3であり、これは、実施例中に記載の方法によって取得可能である。

【0024】

本発明はさらに、少なくとも1つのこのような抗体、ならびに少なくとも1つのキャリア、賦形剤、アジュバントおよび/または処方物に関する。

【0025】

本発明の別の局面は、以下の組合せに関する：1) 洞様毛細血管内皮層の細胞(特にLSEC)の表面上のC型レクチンに結合し、；そしてそれに付着する化合物；2) 抗原またはそのフラグメントもしくは一部。好ましくは、この抗原は、C型レクチンに結合し得る化合物に共有結合されるか、またはこれと融合される。

【0026】

本発明に従う組合せにおいて、抗原は、例えば、この抗原、もしくは感染症に対するワクチンで使用されるような抗原を含むか、または発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を生成するために使用され得る癌抗原から、選択される。

【0027】

洞様毛細血管内皮層の細胞(特に、LSEC)の表面上のC型レクチンに結合し得る化合物は、好ましくは、以下からなる群から選択される：マンノース炭水化物(例えば、マンナンおよびD-マンノース)；フコース炭水化物(例えば、L-フコース)；植物レクチン(例えば、コンカナバリンA)；抗生物質(例えば、プラジマイシンA)；糖(例えば、N-アセチル-D-グルコサミンおよびガラクトース)；タンパク質(例えば、gp120およびそのアナログまたはフラグメント)；および洞様毛細血管内皮層の細胞(特に、LSEC)の表面で発現されるようなC型レクチンに対して特異的な抗体、またはその一部、フラグメントまたはエピトープ。

【0028】

本発明の抗体はさらに、生物学的サンプルにおける洞様内皮層の細胞(特に、LSEC)の検出、ならびに生物学的サンプルまたは培養培地からの洞様内皮層の細胞(特に、LSEC)の単離、調製および/または精製において、使用され得る。

【0029】

あるいは、このような抗体は、C型レクチン(特に、図7のアミノ酸配列を有するC型レクチンまたはその天然変異体もしくは等価物)；および/または生物学的サンプル中のその一部、フラグメントまたはエピトープの、存在および/または発現を決定するためのアッセイにおける用途を見出し得る。

【0030】

さらに、本発明は、生物学的サンプルまたは培養培地から洞様内皮層の細胞(特に、LSEC)を生成、単離および/または精製するための方法に関連し、以下の工程：

a) 生物学的サンプルまたは上記細胞を含む培養培地を、本発明に従う抗体と接触させる工程；

b) 上記抗体に結合する細胞を、上記抗体に結合しない細胞、必要に応じて、サンプルまたは培地の任意のさらなる成分から分離する工程；

を包含し、そして、必要に応じて、さらに以下の工程：

c) 上記抗体由来の抗体に結合する細胞を分離する工程、を包含する。

【0031】

好ましくは、この抗体は、カラムもしくはマトリクスに、(常)磁性ビーズに、または

10

20

30

40

50

同様の固体支持体に連結される。試験される生物学的サンプルは、生物学的流体（例えば、血液、血漿またはリンパ液）であり得る。

【 0 0 3 2 】

最後に、本発明は、上記の方法を介して取得される洞様内皮層の細胞（例えば、LSEC）を提供する。

（項目1） 化合物の使用であって、該化合物は、動物（特にヒトまたは別の哺乳動物）における免疫応答を調節、特に減少させるための組成物の調製において、洞様内皮層の表面上でC型レクチンに結合する、使用。

（項目2） 項目1に記載の使用であって、前記洞様内皮層が肝臓洞様内皮細胞（LSEC）によって構成される、使用。

（項目3） 項目1に記載の使用であって、前記洞様内皮層がリンパ節洞様域によって構成される、使用。

（項目4） 項目1および/または項目2に記載の使用であって、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）と、ICAM-2またはICAM-3を発現する細胞（特にT細胞）との間の1種類以上の相互作用を調節、特に減少させるための組成物の調製における、使用。

（項目5） 項目1および/または項目2および/または項目4に記載の使用であって、洞様内皮層の細胞（特にLSEC）と、ICAM-2またはICAM-3を発現する細胞（特にT細胞）との間の接着、特に、LSECの表面上のC型レクチンと、ICAM-2またはICAM-3を発現させる細胞（特にT細胞）の表面上のICAMレセプター（特に、T細胞の表面上のICAM-2またはICAM-3レセプター）との間の接着を調節、特に減少させるための組成物の調製における、使用。

（項目6） 項目1～項目5のいずれか1項に記載の使用であって、耐性の誘導、免疫治療、免疫抑制、自己免疫性疾患の処置、および/またはアレルギーの処置のための、特定の抗原に対する免疫応答を防止または阻害するための組成物の調製における、使用。

（項目7） 化合物の使用であって、該化合物は、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合するかまたは結合し得、該使用は、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面へのHIV表面タンパク質（例えば、gp120）の接着を阻害し、それによって該細胞へのHIVの進入を阻害するための組成物の調製における、使用。

（項目8） 化合物の使用であって、該化合物は、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合するかまたは結合し得、該使用は、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）から非感染T細胞へのHIVの移動を阻害するための組成物の調製における、使用。

（項目9） 併用の使用であって、該併用は、1）洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合し、そしてC型レクチンに付着する化合物、および2）抗原あるいはフラグメントまたはそれらの一部の併用であり、該使用は、動物（特に、ヒトまたは他の哺乳動物）における、該抗原に対する免疫応答を調節、特に発生、増大および/または促進するための組成物の調製における、使用。

（項目10） 項目9に記載の使用であって、前記抗原が、前記C型レクチンに結合し得る化合物に共有結合されているか、または縮合されている、使用。

（項目11） 項目9または項目10に記載の使用であって、前記抗原が癌抗原から選択され、該抗原は、該抗原を含有するかまたは発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を発生するために用いられ得るか、または感染症に対するワクチンにおいて用いられる抗原である、使用。

（項目12） 項目1～項目11のいずれか1項に記載の使用であって、前記化合物が、洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合し得、該化合物は、マンノース炭水化物（例えば、マンナン、D-マンノース）、フコース炭水化物（例えば、L-フコース）、植物レクチン（例えば、コンカナバリンA）、抗生物質（例えば、ブラディマイシンA）、糖（例えば、N-アセチル-D-グルコサミンおよびガラクトース）、タンパク質（例えば、gp120およびそれらのアナログまたはフラグメント）、な

10

20

30

40

50

らびに、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上において発現されるようなC型レクチンに対して指向される抗体、あるいはその一部、フラグメントまたはエピトープからなる群より選択される、使用。

（項目13） 項目1～項目11のいずれか1項に記載の使用であって、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上の前記C型レクチンが、図7のアミノ酸配列を有するタンパク質、あるいはその天然改変体または等価物である、使用。

（項目14） 項目12または項目13に記載の使用であって、前記化合物が、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上のC型レクチンに結合し得、該化合物は、モノクローナル抗体（好ましくは、図7のアミノ酸配列を有するC型レクチンに対して指向されるモノクローナル抗体またはその天然改変体もしくは等価物）、ならびに/あるいはその一部、フラグメントまたはエピトープである、使用。

10

（項目15） 図7のアミノ酸配列を有するC型レクチンに対して指向される、抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）またはその天然改変体もしくは等価物、および/あるいはその一部、フラグメントまたはエピトープ。

（項目16） 項目15に記載の抗体であって、A Z N - D 3である、抗体。

（項目17） 薬学的組成物であって、該組成物は、項目15または項目16に記載の少なくとも1つの抗体、ならびに少なくとも1つのキャリア、賦形剤、アジュバント、および/または処方剤を含有する、組成物。

（項目18） 併用であって、1)洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上のC型レクチンに結合し、そしてC型レクチンに付着する化合物、および2)抗原あるいはそのフラグメントまたは一部、の併用。

20

（項目19） 項目18に記載の併用であって、前記抗原が、前記C型レクチンに結合し得る化合物に共有結合されているか、または縮合されている、併用。

（項目20） 項目18または項目19に記載の併用であって、前記抗原が癌抗原から選択され、該癌抗原が、該抗原を含有もしくは発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を発生するために用いられ得るか、または感染症に対するワクチンにおいて用いられるような抗原である、併用。

（項目21） 項目18～項目20のいずれか1項に記載の併用であって、前記化合物が、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上のC型レクチンに結合し得、該化合物は、マンノース炭水化物（例えば、マンナンおよびD-マンノース）、フコース炭水化物（例えば、L-フコース）、植物レクチン（例えば、コンカナバリンA）、抗生物質（例えば、プラディマイシンA）、糖（例えば、N-アセチル-D-グルコサミンおよびガラクトース）、タンパク質（例えば、gp120およびそのアナログまたはフラグメント）、ならびに、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の表面上において発現されるようなC型レクチンに対して指向された抗生物質、あるいはその一部、フラグメント、またはエピトープから

30

なる群より選択される、併用。

（項目22） 項目15または項目16に記載の抗体の使用であって、生物学的サンプルにおける、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の検出における、使用。

（項目23） 項目15または項目16に記載の抗体の使用であって、生物学的サンプルあるいは培養培地に由来する、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）の単離、調製および/または精製における、使用。

40

（項目24） 項目15または項目16に記載の抗体の使用であって、生物学的サンプルにおけるC型レクチン（特に、図6のアミノ酸配列を有するC型レクチンまたはその天然改変体もしくは等価物）、ならびに/あるいはその一部、フラグメントまたはエピトープの、存在および/または発現を決定するためのアッセイにおける、使用。

（項目25） 生物学的サンプルまたは培養培地に由来する、洞様内皮層の細胞（特に、L S E C）を作製、単離および/または精製する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 該細胞を含有する生物学的サンプルまたは培養培地を、項目15または項目16に記載の抗体と接触させる工程；

50

b) 該抗体に結合しない細胞から、そして必要に応じて、該サンプルまたは該培地のさらなる任意の成分から、該抗体に結合する細胞を分離する工程；

を包含しそして必要に応じて、以下の工程：

c) 該抗体から、該抗体に結合する細胞を分離する工程、をさらに包含する、方法。

(項目26) 項目25に記載の方法であって、該抗体がカラムまたはマトリクス、(パラ)磁性ビーズあるいは類似の固形支持体に付着している、方法。

(項目27) 項目25または項目26に記載の方法であって、前記生物学的サンプルが、生物学的流体(例えば、血液、血漿またはリンパ液)である、方法。

(項目28) 項目25または項目26の方法によって得られる、洞様内皮層の細胞(特に、LSEC)。

本発明はさらに、続く実施例(そしてこれは、以下の図表に対して言及する)において、例示される。

#### 【実施例】

#### 【0033】

(材料および方法)

(1. DC-SIGN cDNAおよびLD2 cDNAの特徴付け)

全DC-SIGN cDNA配列およびL-SIGN cDNA配列を、それぞれ、登録番号AF290886およびAF290887でGenBankに提出した。L-SIGN cDNA配列は、エキソン4中に6つの繰り返しを含む改変体を表す。転写物の5'末端および3'末端(DC-SIGN mRNAの3'末端を除く)を、5'RACE (Clontech, Palo Alto, CA)によって決定した。DC-SIGN mRNAの3'末端の長さを、ノーザン分析データ(転写物サイズ)、ならびに1.3kbのDC-SIGN cDNA配列(Curtis, B.M.ら, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:8356~8360)に特異的な順方向プライマーおよびDC-SIGNの断言的な3'末端の下流にマッピングされたいくつかのGenBank EST(例えば、AI472111、AA454170)に特異的な逆方向プライマーを用いたRT-PCRデータに基づいて見積もられる。L-SIGNの全コード配列(nt 39~1184、GenBank AF290887)を含むcDNAフラグメントを、ヒト胎盤mRNA(Clontech)から増幅し、そして発現ベクターpcDNA3.1/V5-His/TOPO(pcDNA3-L-SIGN)およびpCDM8(pCDM8-L-SIGN)中にクローン化した。

#### 【0034】

(2. 放射性ハイブリッド(RH)マッピング)

DC-SIGN特異的プライマーおよびL-SIGN特異的プライマーを用いたPCRベースのRHマッピングを、Genebridge 4RHパネル(Research Genetics, Huntsville, AL)を用いて実行した。PCRの結果を、Sangerセンターの遺伝子マップサーバー(<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rhserver>)に提出した。遺伝子に連結されるマーカーの染色体位置を、GenAtlasデータベース(<http://web.cit2.fr/GENATLAS>)およびMarshfield Clinic(Marshfield, WI, <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>)によって提供されるヒト第19染色体の遺伝子マップを検索することによって決定した。

#### 【0035】

(3. L-SIGNおよびDC-SIGNエキソン4の遺伝子型分析)

エキソン4中の繰り返し領域を、以下のプライマー対を用いて増幅した：

1) L-SIGNについて、L28、TGTC CAAGGTCCCCAGCTCC、およびL32、GA ACTCACCA AATGCAGTCTTCAAATC；

2) DC-SIGNについて、DL27、TGTC CAAGGTCCCCAGCTCC、およびDI4R、CCCCGTGTCTCTCATTTTCA CAG。

サイクルの条件は以下のとおりである：94 で5秒間、および68 で1分間。対立遺伝子を、アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって区別した。

【0036】

(4. ノーザンプロット分析)

培養されたヒト未熟DC由来の総RNA(以下を参照のこと)を、Trizol(Life Technologies, Rockville, MD)を用いて単離した。10 µgの単離したRNAを、1%アガロースゲル上で電気泳動し、記載されるように(Chomczynski, P. 1992. Anal Biochem 201:134~139)、Hybond-XL(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)に移し、そして2つのヒト多組織ノーザンプロット(Clontech)と共にノーザン分析に使用した。3つのプローブを、経時的にプロットにハイブリダイズさせた：

10

- 1) L-SIGN特異的プローブ(nt 100~183, GenBank AF290887)、
- 2) DC-SIGNおよびL-SIGNの両方を認識するプローブ(nt 1~1233, GenBank AF290886)、ならびに
- 3) アクチンコントロールプローブ(Clontech)。

【0037】

ハイブリダイゼーション手順を、製造者の仕様書(Clontech)に沿って実行した。

20

【0038】

(5. 抗体)

抗DC-SIGN mAb AZN-D1およびAZN-D2を、前述した(Geijtenbeek, T.B.ら、2000b, Cell 100:575~585)。mAb AZN-D3を、DC-SIGNおよびL-SIGNの両方を染色する能力について、THP-1-DC-SIGN細胞(Geijtenbeek, T.B.ら、2000a, Cell 100:587~597)で、免疫化したBALB/cマウスのハイブリドーマの上清をスクリーニングすることによって得た。抗DC-SIGN mAb AZN-D2はまた、K562-L-SIGN細胞の染色によって最初に測定されたように(データは示されていない)、L-SIGNと交差反応する。抗L-SIGNウサギ抗血清を、2つのL-SIGN特異的ペプチド、PTTSGIRLFPRDおよびWNDNRCDVDNYWを用いて免疫化することによって作製した(Veritas, Inc. Laboratories, Rockville, MD)。

30

【0039】

(6. 細胞)

DCを、500 U/ml IL4および800 U/ml GM-CSF(Schering-Plough, Brussels, Belgium)の存在下で単球から培養した(Sallusto, F., およびA. Lanzavecchia. 1994. J Exp Med 179:1109~1118; Romani, N.ら, 1994, J Exp Med 180:83~93)。7日目に、細胞は、高レベルのMHCクラスIおよびII、M2(CD11b)、X2(CD11c)、DC-SIGNおよびICAM-1、中低度のレベルのLFA-1およびCD86、ならびに低レベルのCD14、を、フローサイトメトリーによって測定されるように発現した。L-SIGNを発現する適切なK562トランスフェクト体(K562-L-SIGN)を、電気穿孔法によるpCDM8-L-SIGNプラスミドおよびpGK-neoベクターとのK562の同時トランスフェクトによって作製した(Lub, M.ら、1997, Mol Biol Cell 8:719~728)。適切なK562-DC-SIGNトランスフェクト体を、pRc/CMV-DC-SIGN(2)を用いて同様の様式で作製した。THP-1-DC-SIGN細胞を、前述した(Geijtenbeek, T.B.ら、2000b, Cell 100:575~585)。

40

50

## 【0040】

適切なTHP-1-L-SIGNトランスフェクト体を、pcDNA3-L-SIGNを用いたTHP-1細胞の電気穿孔法、G418耐性についての選択、およびmAb AZN-D3を用いたL-SIGN発現についての陽性選別によって作製した。全ての細胞株を、示されたような特異的サイトカインまたは抗生物質要求物に加えて10%ウシ胎児血清を補充されたRPMI培地中で維持した。K562およびTHP-1は、単球細胞株である。

## 【0041】

HEK293Tは、SV-40大T抗原の単一の温度感受性対立遺伝子を含むヒト胚性腎臓細胞である。GHOST細胞は、ヒト骨肉腫細胞由来のHIV-指示細胞である(Cecilia, D.ら、1998, J Virol 72:6988~6996)。Hut/CCR5細胞は、CCR5で安定に形質導入される形質転換されたヒトT細胞株Hut78である。

10

## (7. 蛍光ビーズ接着アッセイ)

カルボキシレート修飾TransFluorSpheres(488/645nm、1.0 $\mu$ m; Molecular Probes, Eugene, OR)を、ICAM-1について前述したように、ICAM-3でコートした(Geijtenbeek, T.B.ら、1999, Blood 94:754~764)。蛍光ビーズを、以下のようにM向性HIV-1<sub>MN</sub>エンベローブ糖タンパク質gp120でコートした: ストレプトアビジンでコートした蛍光ビーズを、ビオチン化F(ab')<sub>2</sub>フラグメントウサギ抗ヒツジIgG(6 $\mu$ g/ml; Jackson Immunoresearch)でインキュベートし、続いてヒツジ抗gp120抗体D7324(Aalto Bio Reagents Ltd, Dublin, Ireland)と共に4で一晚インキュベートした。このビーズを洗浄し、そして250ng/mlの精製したHIV-1 gp120(NIH AIDS Research and Reference Reagent Programを介してImmunodiagnosics, Incによって提供される)と共に4で一晚インキュベートした。

20

## 【0042】

蛍光ビーズ接着アッセイを、Geijtenbeekら(1999, 前出)によって記載されるように実行した。手短には、細胞を、5 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞/mlの最終濃度で接着緩衝液(20mM Tris-HCl(pH8.0)、150mM NaCl、1mM CaCl<sub>2</sub>、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.5% BSA)に再懸濁した。50,000の細胞を、mAb(20 $\mu$ g/ml)と共に室温で10分間プレインキュベートした。リガンドでコーティングした蛍光ビーズ(20ビーズ/細胞)を添加し、そしてその懸濁物を、37で30分間インキュベートした。接着を、FACScan(Becton Dickinson, Oxnard, CA)上でフローサイトメトリーを用いて、蛍光ビーズに結合した細胞のパーセントを測定することによって、決定した。

30

## 【0043】

(8. 1次ヒト肝臓洞様毛細血管内皮細胞(LSEC)におけるL-SIGNの検出)  
肝臓組織を、書面による同意を受けた後に、肝臓手術を受けた患者から入手した。1次ヒト肝臓細胞の単離を、前述のように行った(Hegenbarth, S.ら、2000, Hum Gene Ther 11:481~486)。細胞を、Williams E培地を補充されたコラーゲンI型コーティング組織培養プレート上で培養した(Hild, M.ら、1998, J Virol 72:2600~2606)。単離の後日、肝臓細胞を、Texas-Red標識オボアルブミン(10 $\mu$ g/ml)(Molecular Probes, Leiden, Netherlands)と共に2時間インキュベートし、そして穏やかなトリプシン処理によってマトリクスから分離した。細胞を、ウサギ抗-L-SIGN抗血清、続いてヤギ-抗ウサギIg FITC(Dianova, Hamburg, Germany)で染色し、そしてCellQuestソフトウェアを用いてFACScan(Becton Dickinson, Heidelberg, Ge

40

50

r many) で分析した。オボアルブミン摂取は、共焦点顕微鏡を用いた、内皮細胞特異的マーカー (アセチル化 LDL) とオボアルブミン陽性細胞との共染色によって立証されるように、LSEC のみの特徴であり、Kupffer 細胞の特徴ではない。

#### 【0044】

(9. HIV-1 感染アッセイ)

感染アッセイを、以前に記載されるように (Geijtenbeek, 2000a、前出; Geijtenbeek 2000b、前出) 行った。偽型 HIV-1 ストックを、ホタルルシフェラーゼリポーター遺伝子を含むプロウイルスベクタープラスミド NL-Luc-E<sup>-</sup>R<sup>-</sup> (Connor, R. I. ら、1995、Virology 206: 935-944)、および、ADA または JRFL いずれかの gp160 エンベロープ 10  
についての発現プラスミドを有する、HEK293T 細胞のカルシウム-リン酸トランスフェクションによって産生した。ウイルス性ストックを、GHOST CXC4/CCR5 細胞および 293T-CD4-CCR5 細胞に対する限界希釈によって評価した。

#### 【0045】

HIV-1 細胞捕捉アッセイにおいて、THP-1 トランスフェクト体 (250,000 細胞) を発現する DC-SIGN または L-SIGN を、偽型 HIV-1 (標的細胞濃度に関して約 0.1 の感染多重度) とともに、0.5 ml の総体積で 3 時間プレインキュベートして、ウイルスを細胞吸収させた。3 時間のインキュベーションの後、2 容積の PBS で細胞を洗浄し、そして、1 ml の細胞培養培地中の 10 µg/ml のポリブレンの存在下で、Hut/CCR5 標的 (100,000 細胞) とともに THP-1 トランスフェクト体 20  
を共培養した。3 日後に細胞溶解物を得、そしてルシフェラーゼ活性について分析した。

#### 【0046】

対照的に、最適以下のウイルス濃度 (代表的には、0.05 m.o.i. 未満) を用いて、洗浄工程なしで HIV-1 増強アッセイを行った。簡単に述べると、DC-SIGN または L-SIGN トランスフェクト体 (50,000 細胞) を、同一のウイルス濃度 (偽型 HIV-1 または複製コンピテント M 指向性株 HIV-1<sub>JR-CSF</sub>) でインキュベートし、そして 2 時間後、活性化された T 細胞 (100,000 細胞) を添加した。数日後に細胞溶解物を得、そしてルシフェラーゼ活性または p24 抗原レベルのいずれかについて分析した。IL-2 (10 U/ml) および PHA (10 µg/ml) の存在下で 30  
2 日間、T 細胞を培養することによって、T 細胞を活性化した。

#### 【0047】

(10. 免疫組織化学的分析)

以前に記載されたように (Geijtenbeek, 2000b、前出)、組織凍結切片の染色を行った。組織の凍結切片 (8 µ) を、100% アセトン中で固定し (10 分間)、PBS で洗浄し、そして 1 次抗体 (10 µg/ml) とともに 37 °C で 60 分間インキュベートした。洗浄後、ABC-PO/ABC-AP Vectastain キット (Vector Laboratories、Burlingame、CA) を用いて、製造業者のプロトコルに従って最終的な染色を行った。ヘマトキシリンを用いて、核の染色 40  
を行った。

#### 【0048】

(結果)

(1. DC-SIGN および L-SIGN のゲノムマップ)

ヒト BAC クローン CTD-2102F19 配列 (現在、GenBank (AC008812) において利用可能である) (図 1) からの情報を用いて、DC-SIGN/L-SIGN 遺伝子座の細密なマップを決定した。DC-SIGN および L-SIGN は、15.7 kb 離れて、ヘッドを向かい合わせた (head to head) 方向で位置付けられる。RH マッピングは、DC-SIGN および L-SIGN が、よりテロメア方向に位置付けられた DC-SIGH を有するマーカー D19S912 (11.1 を超えるロッドスコア値) の近くの染色体 19p13.2-3 に位置付けられていることを示した。 50

RHデータと一致して、D19S912マーカーは、BAC配列におけるL-SIGNに対して、約37kb動原体方向の距離で見出される。

【0049】

(2. L-SIGNのエキソン4における多型性)

DC-SIGNおよびL-SIGNの両方のエキソン4は、23アミノ酸の繰り返し単位をコードする69bpの反復を含有する。これらの反復は、糖質認識ドメインとSIGN分子の膜貫通ドメインとの間にネックを形成する。胎盤mRNAから単離されたL-SIGN cDNAクローンは、遺伝子のコード領域全体を含有したが、Soilleuxら(2000、前出)によって報告されたcDNAにおいて同定された7つの総反復と対照的に、エキソン4に対応する配列において6つのみの総反復しか存在しなかった。このことは、L-SIGNの反復領域が多型性であることを示した。350人の白人個体におけるエキソン4の分析は、反復の数(3~9の範囲にわたる)に基づく7つの対立遺伝子の存在が示し、これらの対立遺伝子のうちの最も共通するものは、7つの反復(表1)を含有する対立遺伝子であった。150人の白人におけるDC-SIGNエキソン4の分析からは、いかなる変動も示さなかった。

10

【0050】

(3. DC-SIGNおよびL-SIGNのノーザン分析)

L-SIGN mRNAは、コード領域全体にわたって、DC-SIGN mRNAに対して約90%の類似性を示すが、これらの遺伝子のエキソン2配列の間には53%のみの類似性しか存在しない。従って、エキソン2配列を用いて、ノーザン分析においてL-SIGN特異性であったプローブ(84nt)を産生した。このプローブは、肝臓およびリンパ節において、約1.9kb、2.6kbおよび4.2kbのサイズのmRNAにハイブリダイズし、そして胸腺において、弱い1.9kbのバンドが検出された(図2A)。この1.9kbのバンドは、リンパ節および胎児肝臓において顕著であり、L-SIGNの予測サイズに対応する。上側のバンド(このうちの1つ(2.6kb)は、成体肝臓において顕著である)は、選択的転写であるようであるが、RACE技術およびRT-PCR技術は、長さが変化する非翻訳領域の存在も、選択的スプライス変体の存在も示していない。

20

【0051】

DC-SIGNのコード領域全体を含有する1.2kbのフラグメント(このフラグメントは、DC-SIGN mRNAとL-SIGN mRNAとの両方を、それらの高い類似性に起因して認識する)を用いて、ノーザンプロットを再プローブした(図2B)。再び、肝臓、リンパ節および胎児肝臓において、L-SIGN転写を表すバンドが観察された。さらに、DC-SIGNを表す4.3kbの転写物を、単球由来DCおよびリンパ節において検出し、胎盤、脾臓、胸腺、およびおそらく肝臓において、より低い量で検出した。

30

【0052】

L-SIGN mRNAはまた、より高感度のRT-PCR技術を用いて、胎盤およびDCにおいて検出されたが、これらの組織における発現レベルはあまりにも低すぎて、ノーザンハイブリダイゼーションにより検出できない。同じ程度の感度で、DC-SIGN転写物とL-SIGN転写物の両方を認識するプローブは、明らかに、2つの遺伝子産物の示差的組織分布を示した：L-SIGNは主に肝臓およびリンパ節において転写され、それに対しDC-SIGNは、DCおよびDCに適應する組織において特異的に発現される(図2)。L-SIGN mRNAは、DC、末梢血リンパ球、または脾臓のいずれにおけるノーザン分析によっても検出されない(図2)。

40

【0053】

(4. L-SIGNは、ヒトLSECによって発現され、そしてDCによっては発現されない)

インビボでL-SIGN分子を発現する細胞を同定するために、1対の抗DC-SIGN mAb(このうちの一方(AZN-D3)はL-SIGNと交差反応し、それに対し

50

て他方 (A Z N - D 1) は、D C - S I G N 特異的であった) を用いて免疫組織化学的分析を行った (図 3 A)。ノーザン分析から推測されるように、肝臓組織の弱い染色が、D C - S I G N 特異的 m A b A Z N - D 1 を用いて観察され (図 3 B)、そしてこの抗体を用いて検出される希な細胞は、おそらく肝臓に存在する D C である。対照的に、m A b A Z N - D 3 は、肝臓の類洞に沿った細胞を明るく染色した (図 3 B)。

【 0 0 5 4 】

内皮細胞特異的マーカー C D 3 1 に対するモノクローナル抗体は、肝臓の連続切片において類似の染色パターンを呈し (データは示さず)、L - S I G N が L S E C によって発現されることを示した。この考察を支持するために、一次ヒト L S E C を、オブアルブミンの取り込み (これは、L S E C に特有の性質である) によって他の肝臓細胞と区別し、そして L - S I G N の発現について直接試験した。ポリクローナル抗 L - S I G N 抗体での L S E C の染色は、L - S I G N が、肝臓内のこれらの細胞によって排他的に発現されることを示した (図 3 C)。

10

【 0 0 5 5 】

A Z N - D 1 および A Z N - D 3 はともに、リンパ節を同程度によく染色した (データは示さず)。しかし本発明者らは、L - S I G N 特異的ポリクローナル抗体を用いて、L - S I G N が単球由来の D C によっては発現されないことを見出した (図 3 D)。このことは、ノーザン分析からの結論を支持する。D C - S I G N および L - S I G N は、リンパ節において、異なる型の細胞によって発現される。

【 0 0 5 6 】

( 5 . L - S I G N は、I C A M - 3 および H I V - 1 g p 1 2 0 を結合させる )  
I C A M - 3 および H I V - 1<sub>M N</sub> g p 1 2 0 はともに、Ca<sup>2+</sup> 依存様式で、高い親和性で D C - S I G N に結合することが示されている。フローサイトメトリーベースの接着アッセイ (G e i j t e n b e e k、1999、前出) を用いて、L - S I G N を用いてトランスフェクトされた K 5 6 2 細胞は、高い親和性で I C A M - 3 に結合することを示した (図 4 A)。この L - S I G N 媒介結合は、D C - S I G N / L - S I G N 特異的 m A b (A Z N - D 2 および A Z N - D 3)、マンナン、または E G T A によって阻害されたが、D C - S I G N 特異的 m A b (A Z N - D 1) によっては阻害されなかった。このことは、L - S I G N が I C A M - 3 に対して高い親和性を有する、マンノース結合 C 型レクチンとして機能することを実証する。L - S I G N はまた、H I V - 1<sub>M N</sub> g p 1 2 0 にも結合し得た (図 4 B)。偽性トランスフェクト細胞は、I C A M - 3 にも H I V - 1<sub>M N</sub> g p - 1 2 0 にも結合しなかった (データは示さず)。

20

30

【 0 0 5 7 】

( 6 . L - S I G N は H I V - 1 感染を増強する )  
H I V - 1 g p 1 2 0 への、L - S I G N の高親和性結合は、L - S I G N が感染性 H I V - 1 と結合し得、そしてイントランスでの標的細胞の感染を増強し得る可能性を挙げた。H I V - 1 感染におけるトランスレセプターとしての L - S I G N の役割を試験するために、D C - S I G N または L - S I G N のいずれかを発現する T H P - 1 細胞を、M 指向性 H I V - 1<sub>J R F L</sub> エンベローブ糖タンパク質で偽型化された、単回感染性 H I V - 1 ルシフェラーゼを用いてパルスし、洗浄して未結合のウイルスを除去し、そして H I V - 1 感染に対して許容的である標的細胞とともにインキュベートした。3日後に、感染を評価した。L - S I G N トランスフェクト化 T H P - 1 細胞および D C - S I G N トランスフェクト化 T H P - 1 細胞はともに、感染性 H I V - 1 を捕捉し、そしてウイルスを標的細胞に透過させたが、偽性トランスフェクト化 T H P - 1 細胞は透過させなかった (図 5 A)。

40

【 0 0 5 8 】

次に、L - S I G N が限界濃度の H I V - 1 を補足し得るか否か、および、感染を促進する許容細胞に対してウイルスが有効に存在するか否かを調査した。D C - S I G N あるいは L - S I G N、または偽性トランスフェクト化細胞を発現する H E K 2 9 3 T 細胞を、H I V - 1<sub>A D A</sub> エンベローブ糖タンパク質を用いて偽型化された、低力価の H I V -

50

ルシフェラーゼとともにインキュベートした。次いで、未洗浄の細胞を、活性化T細胞とともに共培養した。HIV-1でパルスされた、偽性トランスフェクト化HEK293T細胞から、標的細胞の最小感染を観察した(図5B)。しかし、L-SIGNを用いてトランスフェクトされたHEK293T細胞は、イントランスでのT細胞のHIV-1感染を増強した(図5B)。DC-SIGN媒介増強は、交差反応性AZN-D2抗体で阻害されたが、L-SIGNについては部分的な阻害が観察された。マンナンは、両方のSIGN分子による増強を有効に阻害した。

#### 【0059】

T細胞のHIV-1感染を増強するL-SIGNの能力を評価するための類似の実験を、複製コンピテントウイルスを用いて行った。L-SIGN、DC-SIGNおよび空のベクターを用いてトランスフェクトされたK562細胞を、M指向性HIV-1<sub>JR-CSF</sub>株とともに、低ウイルス濃度で2時間インキュベートし、次いで、活性化T細胞とともに共培養した(図5C)。ウイルス複製は、偽性トランスフェクト化K562細胞を用いて、観察されなかったが、L-SIGNトランスフェクト体は、HIV-1を標的細胞に透過させ、ウイルス複製を生じた。DC-SIGN/L-SIGN特異的抗体であるAZN-D2を用いるHIV-1複製の殆ど完全な阻害は、HIV-1感染を増強するこれらのレセプターの特異性を示した。従って、肝臓内で、おそらくリンパ節内でも、L-SIGNを発現する非DC系列細胞はまた、HIV-1を捕捉し、リンパ球に透過させる能力を有する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0060】

【図1】DC-SIGN/L-SIGN遺伝子マップの略図。物理学的距離および遺伝子配向は、BACクローンCTD-2102F19(GenBank AC008812)から提供される配列に基づく。

【図2】DC-SIGNおよびL-SIGNのノーザンプロット分析。4.3kb(黒いヘッドを有する矢印)および1.9kb(白ぬきのヘッドを有する矢印)のサイズの位置は、左に記される。(A)L-SIGN特異的プローブとのハイブリダイゼーションは、肝臓、リンパ節における遺伝子の発現、および胸腺における遺伝子の弱い発現を示す。(B)両方の遺伝子を認識するプローブとのハイブリダイゼーション。4.3kbのバンドは、DC-SIGN mRNAを表す。L-SIGN特異的プローブ(図3A)を用いる肝臓およびリンパ節において明白な明るい上部のバンド(約4.2kb)は、プローブの特異性、強度パターン、およびサイズにおけるわずかな差異に起因してDC-SIGN mRNA(4.3kb)と異なる。(C)-アクチンcDNAコントロールプローブを用いたプロットの再プローブ化。

【図3A】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(A)抗体AZN-D1は、DC-SIGN特異的であるが、AZN-D3は、L-SIGNと交差反応する。適切なDC-SIGNおよびL-SIGN K562トランスフェクト体を、AZN-D1またはAZN-D3のいずれかで染色した。

【図3B】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(B)ヒト肝臓におけるDC-SIGNおよびL-SIGN発現の免疫組織化学的分析。一連の区分を、AZN-D1(DC-SIGN特異的)またはAZN-D3(DC-SIGNおよびL-SIGNの両方を検出する)のいずれかを用いて染色した。AZN-D1は、DC(矢印)であり得る細胞を余り染色しないが、AZN-D3は、シヌソイドを描く細胞を染色する。

【図3C】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(C)肝臓中のL-SIGNの発現は、LSECに制限される。単離の1日後、1次ヒト肝臓細胞を、蛍光色素標識オボアルブミンと共にインキュベートした。L-SIGN発現を、L-SIGN特異的ポリクローナル抗体を用いて間接的な免疫蛍光によって決定した。オボアルブミンを摂取した細胞(LSEC)およびオボアルブミンを摂取しなかった細胞(肝細胞および他のレジデント肝細胞)は、それぞれ実線および破線によって表

10

20

30

40

50

され、それぞれの細胞集団にゲーティングすることによって表される。  $2 \times 10^5$  細胞を分析した。

【図3D】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(D)L-SIGNは、単球由来のDCによって発現されない。GM-CSFおよびIL-4の存在下で単球から培養された、未熟DCは、FACSscan分析によって決定されるように、抗L-SIGNポリクローナル抗体で染色されない。実線は、抗L-SIGNポリクローナル血清を用いた染色を示すが、点線(実線の下に隠れる)は、ウサギ前免疫血清を用いた染色を表す。

【図4】L-SIGNは、ICAM-3(A)およびHIV-1 gp120(B)に結合する。K562-L-SIGN細胞およびK562-DC-SIGN細胞へのICAM-3およびgp120の接着を、蛍光ビーズ接着アッセイ(Geijtenbeek, T. B.ら、1999, Blood 94:754~764)を用いて測定した。y軸は、リガンドでコーティングされた蛍光ビーズと結合する細胞のパーセントを表す。L-SIGN交差反応mAb AZN-D2(20  $\mu$ g/ml)およびAZN-D3(20  $\mu$ g/ml)は、DC-SIGN特異的mAb AZN-D1(20  $\mu$ g/ml)と対照的に、L-SIGNに対するICAM-3およびgp120の接着を阻害する。K562トランスフェクト体に対するICAM-3およびgp120両方の接着はまた、マンナン(20  $\mu$ g/ml)またはEGTA(5 mM)のいずれかによって阻害される。mockトランスフェクト体に対する両方のリガンドの接着は、5%未満であった。3つのうち1つの代表的な実験が示される(SD < 5%)。

【図5A】L-SIGNは、輸送中のT細胞を捕獲し、そしてT細胞とHIV-1との感染を増強する。(A)L-SIGNは、HIV-1を捕獲し、そしてこれを標的細胞へ伝達する。適切なDC-SIGNまたはL-SIGN発現THP-1トランスフェクト体を、HIV-1 luc/JRFLシュードビリオンと共にプレインキュベートして、ウイルスの捕獲を可能にした。細胞を洗浄し、そしてTHP-1トランスフェクト体を、Hut/CCR5標的細胞と共に同時培養した。細胞溶解物を、3日後に入手し、そしてルシフェラーゼ活性について分析した。用いられた各同時培養条件について、mock感染コントロールは、活性において一様に100計測数/秒未満であった。各データセットは、感染細胞の4つの別々のウェルの平均を表す。2つのうち1つの代表的な実験が示される。

【図5B】L-SIGNは、輸送中のT細胞を捕獲し、そしてT細胞とHIV-1との感染を増強する。(B)L-SIGNは、シュード型のHIV-1によってT細胞の感染を増強する。HEK293T細胞を、cDNAをコードするDC-SIGN、L-SIGNまたは空のベクターで過渡的にトランスフェクトした。コントロール細胞を、AZN-D2(20  $\mu$ g/ml)またはマンナン(20  $\mu$ g/ml)と共にプレインキュベートした。少量のシュード型HIV-1<sub>ADA</sub>を、前記のような活性化T細胞と一緒に添加した(Geijtenbeek, T. B.ら、2000, Cell 100:587~597)。感染性を、ルシフェラーゼ活性を測定することによって2日後に決定した。実行された2つのうち1つの代表的な実験が示される。各実験を、3連のウェルで実行した。

【図5C】L-SIGNは、輸送中のT細胞を捕獲し、そしてT細胞とHIV-1との感染を増強する。(C)L-SIGNは、複製コンピテントHIV-1によってT細胞の感染を増強する。L-SIGNおよびDC-SIGN両方の適切なK562トランスフェクト体を、低ウイルス濃度の複製コンピテントM向性株HIV-1<sub>JR-CSF</sub>(TCID<sub>50</sub> 100/ml)と共にインキュベートした。特異性を決定するために、細胞を、AZN-D2(20  $\mu$ g/ml)と共にプレインキュベートした。2時間後、活性化T細胞を、上記のように添加した(Geijtenbeek, T. B.ら、2000, Cell 100:575~585)。培養上清を、K562-T細胞同時培養の14日後に収集し、そしてHIV-1産生性をELISAを用いて測定してp24抗原レベルを決定した。コントロール実験において、同じ量のウイルスを、T細胞に直接添加した。3つのうち1つの代表的な実験が示される。各データセットは、感染細胞の3つの別々のウェルの平均を表す。

10

20

30

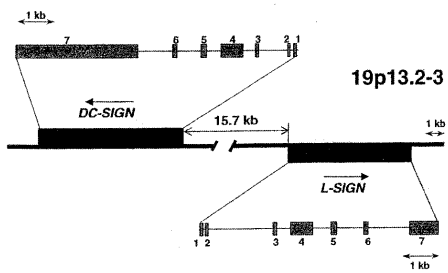
40

50

【図6】 L - S I G N のコード DNA 配列。  
【図7】 L - S I G N のアミノ酸配列。

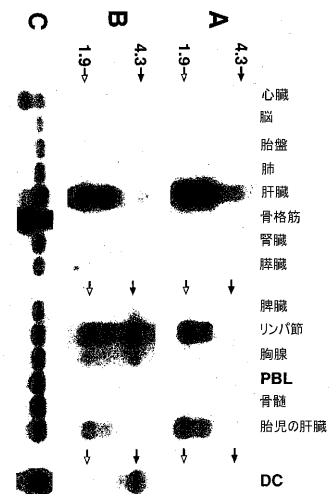
【図1】

Fig. 1



【図2】

Fig.2



【 図 3 A 】

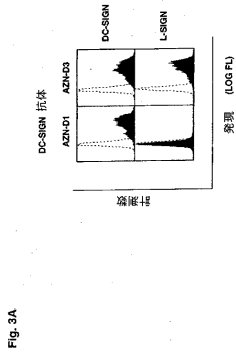


Fig. 3A

【 図 3 C 】

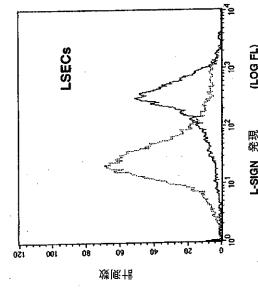


Fig.3C

【 図 3 D 】

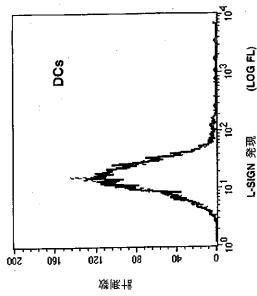
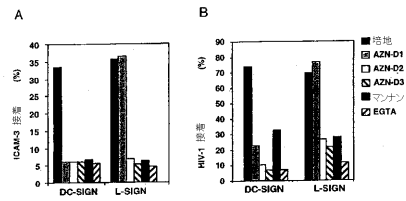


Fig. 3D

【 図 4 】

Fig. 4



【 図 5 A 】

【 図 5 B 】

Fig. 5A

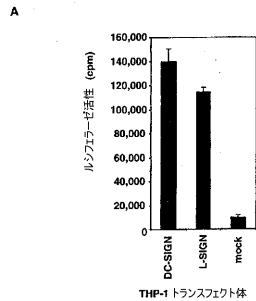
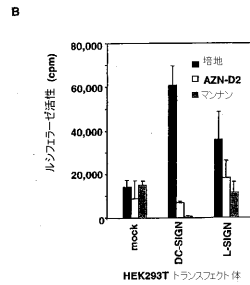


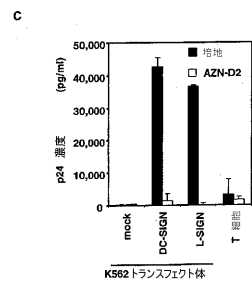
Fig. 5B



【 図 5 C 】

【 図 6 】

Fig. 5C



DNA sequence 1200 b.p. atggtgactcc... agagaggaatag linear

```

31/31
atg agt gac tcc aag gaa cca agg gta cag cag ggt etc ctg gaa gag gat cca aca
M S D S K E P R V Q Q L G L L E E D P T
51/21
acc agt ggc atc aga ctt ttt cca aga gac ttt caa ttc cag cag ata cat ggc cac aag
T S G I R L F P R D F Q F Q Q I N G H K
121/41
agc tct aca ggg tgt ctt ggc cat ggc gcc ctg gta ctg caa etc tcc ttc atg etc
S S T G C L G H G A L V L Q L L S F H L
181/61
tgg ggt ggt gtc ctg gta gcc aac ctt gtc caa gta tcc aag gtc gcc agc tcc cta agt
L A G V L V A N L V Q V S K V F S S L S
241/81
cag gaa caa tcc gag caa gac gca atc tac cag aac ctg acc cag ctt aca gct gca gta
Q S Q S E Q D A I V Q N L T Q S K A A V
301/101
ggc agt ctc tca gaa aac tcc aag ctg cag gaa atc tac cag gag ctg acc cag ctg aag
Q E L S E K S K L Q E L Y Q E L T Q L K
361/121
ggt gaa gta ggt gag ttp cca gag aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag gag ctg acc
A A V G E L P E K S K L Q E I Y Q E L T
421/141
cag ctg acc gag gct gca gta ggt gag ttp cca gag aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag
R L K A A V G E L P E R S K L Q E I Y Q
481/161
gag ctg acc cag ctg aag gct gca gta ggt gag ttp cca gag aaa tcc aag ctg cag gag
E L T Q L K A A V G E L P E K S R L Q E
541/181
atc tac cag gag ctg acc cag ctg aag gct gca gta ggt gag ttp cca gag aaa tcc aag
I Y Q E L T R L K A A V G E L P E K S E
601/201
ctg cag gag atc tac cag gag ctg acc cag ctg aag gct gca gta ggt gag ttp cca gag
L Q E I Y Q E L P O L K A A V G E
661/221
aaa tcc aag ctg cag gag atc tac cag gag ctg acc cag ctg aag gct gca gta ggt gag
K L Q E I Y Q E L P O L K A A V G E
721/241
tgg cca gac tcc aag cag cag caa atc tac cag gaa gaa ctg acc gat ttp aag act gca
L F D Q S K Q Q Q I Y Q E L T D L K T A
781/261
tct gaa ctg ctg tgc tgc ctc tgc acc aag gac tgg aca ttc ttc cca gaa aac tgc tac
F E R L C R H C P K D W T F P Q G N C Y
841/281
ttc atg tcc aac tcc cag cag aac tgg cac aac tcc gtc acc gcc tgc cag gaa gta agt
F N S N S Q R N W H R S V T A C Q E V R
901/301
gcc cag ctg gta atc aca act gct gag gag cag aac ttc cta cag ctg cag act tcc
R Q L V V I K T A E Q N F L Q L Q T S
961/321
agg agt aac ggc ttc tcc tgg atg gaa ctt tca gao cta aat cag gaa ggc aag tgg caa
F S N R F S M H G L S D L N Q E G T W Q
1021/341
tgg ctg gac gaa tcc ctg tca ccc agc ttc cag ggt tac tgg aac agt gga gaa ccc
W D G S P L S P S F Q R Y W N S G E F
1081/361
aac aat agc ggg aar gaa gac tgt gta ttt agt ggc agt ggc tgg aac gac aat cga
N N S G N E D C A E F S G S G W N D N R
1141/381
tgt gac gtt gac aat tac tgg atc tgc aaa aag ccc gca gcc tgc ttc aga gac gaa tgg
C D V D N Y W I C K R F A A C F R D B

```

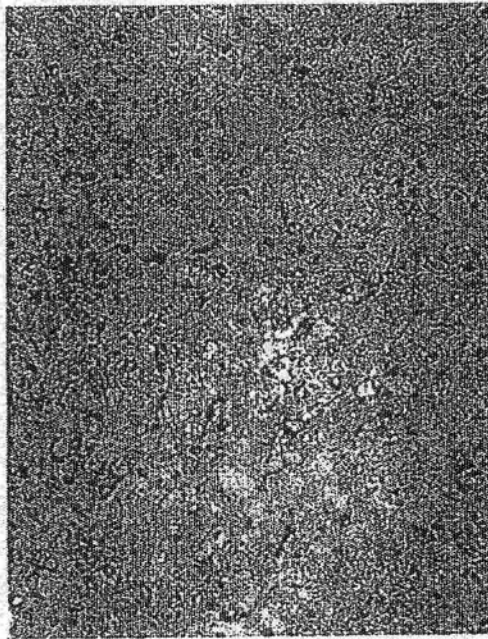
Fig. 6



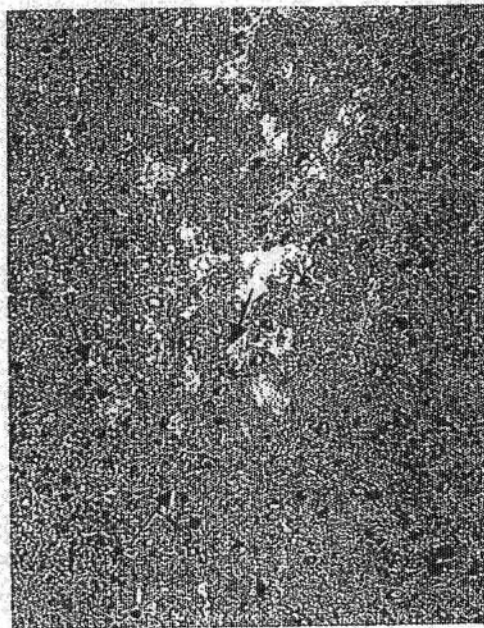
【 図 3 B 】

Fig.3B

AZN-D3



AZN-D1



---

フロントページの続き

- (72)発明者 カール グスタヴ フィグドー  
オランダ国 エヌエル - 5 2 1 1 ディーディー デン ボッシュ, ウェストワル 5 4
- (72)発明者 テウニス ベルナルド ハーマン ゲイジュテンピーク  
オランダ国 エヌエル - 6 5 3 6 ジーアール ニジュメゲン, ウィーゼンホフ 3 4 7 1
- (72)発明者 イヴェット ヴァン クーイク  
オランダ国 エヌエル - 6 8 1 3 ケイディー アーネム, ポッゲンピークストラート 5
- (72)発明者 ルアド トレンスマ  
オランダ国 エヌエル - 6 5 3 1 アールピー ニジュメゲン, ノイシュアンストラート 6
- Fターム(参考) 4B024 AA01 BA63 CA02 DA02 EA04 GA11 HA08  
4C084 AA02 AA17 BA01 BA08 BA22 NA14 ZB07

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005132846A5</a>	公开(公告)日	2005-11-04
申请号	JP2004368543	申请日	2004-12-20
申请(专利权)人(译)	Suchihitingu Kasorike 普遍乳木果小山		
[标]发明人	カールグスタヴフィグドー テウニスベルナルドハーマンゲイジュテンビーク イヴェットヴァンクーイク ルアドトレンスマ		
发明人	カール グスタヴ フィグドー テウニス ベルナルド ハーマン ゲイジュテンビーク イヴェット ヴァン クーイク ルアドトレンスマ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K38/095 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/21 A61K39/395 A61K45/00 A61P31/18 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N5/00 C12N5 /071 C12R1/91 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/21 A61K38/00 A61K39/12 A61K2039/505 A61K2039/6087 C07K14/7056 C07K16/2851 C12N5 /069 C12N2740/16134		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A61P37/02 A61K37/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4C084 /AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/NA14 4C084/ZB07		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	2000128143 2000-12-21 EP 2001200944 2001-03-13 EP		
其他公开文献	JP2005132846A		

#### 摘要(译)

要解决的问题：在肝脏和淋巴结的窦状内皮细胞表面获得与C型凝集素结合的化合物，以调节动物的免疫反应。解决方案：在制备用于调节，特别是降低动物（特别是人或其他哺乳动物）免疫应答的组合物时，使用与窦状内皮层表面上的C型凝集素结合的化合物提供。在一个实施方案中，窦状内皮层由肝窦内皮细胞（LSEC）构成，并且在另一个实施方案中，窦状内皮层由淋巴结窦状区构成。Ž