

(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2010-11856

(P2010-11856A)

(43) 公開日 平成22年1月21日(2010.1.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B O 2 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C O 8 5
審査請求 有 請求項の数 55 O L (全 72 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-200540 (P2009-200540)	(71) 出願人	501466628
(22) 出願日	平成21年8月31日 (2009. 8. 31)		プレジデント・アンド・フェローズ・オブ
(62) 分割の表示	特願2001-500765 (P2001-500765)		・ハーバード・カレッジ
原出願日	平成12年6月1日 (2000. 6. 1)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州0213
(31) 優先権主張番号	60/137, 085		8ケンブリッジ・クインシーストリート1
(32) 優先日	平成11年6月2日 (1999. 6. 2)	(74) 代理人	110000741
(33) 優先権主張国	米国 (US)		特許業務法人小田島特許事務所
		(72) 発明者	ローリー・エイチ・グリムシャー
			アメリカ合衆国マサチューセッツ州0216
			5ウエストニュートン・ハンプシャースト
			リート51
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 T - b e t 組成物およびその使用の方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 T - b e t をコードする単離された核酸分子、および単離された T - b e t タンパク質を提供する。

【解決手段】 マウス、ヒトの T - b e t をコードする核酸分子を単離し、それを用いてアンチセンス核酸分子、組換え発現ベクター、発現ベクターが導入された宿主細胞および T - b e t 導入遺伝子を有する非 - ヒトトランスジェニック動物を作製し、 T - b e t タンパク質、 T - b e t 融合タンパク質および抗 T - b e t 抗体も作製する。それらは、 T - b e t 組成物を使用する方法として、生物学的試料内の T - b e t 活性を検出するための方法、細胞内の T - b e t 活性を調節する方法、および T - b e t の活性を調節する薬剤を同定するための方法に使用される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に示される核酸分子の全鎖長相補体に対して 45 の 6 X S S C において、次いで 65 の 0 . 2 X S S C、0 . 1 % S D S における 1 回以上の洗浄を行うストリンジентな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子であって、かつ、DNA 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合するペプチドをコードし、さらに C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導する、上記核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 3 に示される核酸分子の全鎖長相補体に対して 45 の 6 X S S C において、次いで 65 の 0 . 2 X S S C、0 . 1 % S D S における 1 回以上の洗浄を行うストリンジентな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子であって、かつ、DNA 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合するペプチドをコードし、さらに C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導する、上記核酸分子。

10

【請求項 3】

全鎖長を通して配列番号 1 の少なくとも 700 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 90 % 同一のヌクレオチド配列有する単離された核酸分子であって、かつ、DNA 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合するペプチドをコードし、さらに C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導する、上記核酸分子。

【請求項 4】

全鎖長を通して配列番号 3 の少なくとも 500 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 90 % 同一のヌクレオチド配列有する単離された核酸分子であって、かつ、DNA 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合するペプチドをコードし、さらに C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導する、上記核酸分子。

20

【請求項 5】

配列番号 2 のアミノ酸配列に少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸分子であって、かつ、DNA 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合するペプチドをコードし、さらに C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導する、上記核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 4 のアミノ酸配列に少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸分子であって、かつ、DNA 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合するペプチドをコードし、さらに C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導する、上記核酸分子。

30

【請求項 7】

配列番号 1 の少なくとも 700 個の連続するヌクレオチド含んでなり、かつ、T - b o x をコードする単離された核酸分子、または配列番号 1 の少なくとも 700 個の連続するヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子。

【請求項 8】

配列番号 3 の少なくとも 600 個の連続するヌクレオチド含んでなり、かつ、T - b o x をコードする単離された核酸分子、または配列番号 3 の少なくとも 600 個の連続するヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子。

40

【請求項 9】

配列番号 1 の少なくとも 700 個の連続するヌクレオチドからなり、かつ、T - b o x をコードする単離された核酸分子、または配列番号 1 の少なくとも 700 個の連続するヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列からなる単離された核酸分子。

【請求項 10】

配列番号 3 の少なくとも 600 個の連続するヌクレオチドからなり、かつ、T - b o x をコードする単離された核酸分子、または配列番号 3 の少なくとも 600 個の連続するヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列からなる単離された核酸分子。

【請求項 11】

50

配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、検出可能な物質で標識されている単離された核酸分子。

【請求項 1 2】

配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、検出可能な物質で標識されている単離された核酸分子。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の核酸分子を含んでなるベクター。

【請求項 1 4】

構成的プロモーターを含んでなる請求項 1 3 記載のベクター。

【請求項 1 5】

誘導性プロモーターを含んでなる請求項 1 3 記載のベクター。

【請求項 1 6】

組織特異的調節エレメントを含んでなる請求項 1 3 記載のベクター。

【請求項 1 7】

請求項 5 または 6 記載の核酸分子であって、該ペプチドが I L - 2 の産生の阻害、並びに T h p 細胞および T h 2 細胞の T h 1 細胞への分化の誘導からなる群より選択される少なくとも一つの活性を有する、上記核酸分子。

【請求項 1 8】

配列番号 1 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項 1 9】

配列番号 3 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項 2 0】

配列番号 4 に示されるポリペプチドと全鎖長を通して少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドであって、かつ、D N A 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合し、さらに C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導する、上記ポリペプチド。

【請求項 2 1】

配列番号 2 に示されるポリペプチドと全鎖長を通して少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸を有する単離されたポリペプチドであって、かつ、D N A 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合し、さらに C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導する、上記ポリペプチド。

【請求項 2 2】

配列番号 1 に示されるポリヌクレオチドと全鎖長を通して少なくとも 9 0 % 同一のヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含んでなる核酸によりコードされた単離されたポリペプチドであって、かつ、該ヌクレオチド配列が D N A 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合し、さらに C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導するポリペプチドをコードする、上記ポリペプチド。

【請求項 2 3】

配列番号 3 に示されるポリヌクレオチドと全鎖長を通して少なくとも 9 0 % 同一のヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含んでなる核酸によりコードされた単離されたポリペプチドであって、かつ、該ヌクレオチド配列が D N A 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合し、さらに C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導するポリペプチドをコードする、上記ポリペプチド。

【請求項 2 4】

配列番号 1 の少なくとも 7 0 0 個の連続するヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子によりコードされている単離されたポリペプチドであって、かつ、該ヌクレオチド配列がコンセンサス T - B O X ドメインと結合しそして C D 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導する、上記ポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

配列番号3の少なくとも600個の連続するヌクレオチドを含んでなるヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子によりコードされている単離されたポリペプチドであって、かつ、該ヌクレオチド配列がコンセンサスT - BOXドメインと結合しそしてCD4 + 細胞におけるIFN - の産生を誘導する、上記ポリペプチド。

【請求項 26】

配列番号2に示されるアミノ酸配列を含んでなり、かつ、検出可能な物質で標識されている単離されたポリペプチド。

【請求項 27】

配列番号4に示されるアミノ酸配列を含んでなり、かつ、検出可能な物質で標識されている単離されたポリペプチド。

10

【請求項 28】

異種アミノ酸配列をさらに含んでなる請求項18または19記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 29】

請求項20または21記載のポリペプチドであって、IL - 2の産生の阻害、並びにThp細胞およびTh2細胞のTh1細胞への分化の誘導からなる群より選択される活性を有する、上記ポリペプチド。

【請求項 30】

配列番号2のアミノ酸配列のエピトープに特異的に結合する単離された抗体、またはその抗原結合性断片。

20

【請求項 31】

配列番号1の核酸分子によりコードされたタンパク質のエピトープに特異的に結合する単離された抗体、またはその抗原結合性断片。

【請求項 32】

配列番号2の全鎖長を通して少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドに特異的に結合し、かつ、DNA中のコンセンサスT - box部位に結合しそしてCD4 + 細胞においてIFN - を誘導し、さらに配列番号2に少なくとも90%同一性を有するポリペプチド部分に結合する単離された抗体、またはその抗原結合性断片。

【請求項 33】

配列番号2のアミノ酸配列に特異的に結合し、かつ、細胞内抗体である、単離された抗体、またはその抗原結合性断片。

30

【請求項 34】

配列番号4のアミノ酸配列のエピトープに特異的に結合する単離された抗体、またはその抗原結合性断片。

【請求項 35】

配列番号3の核酸分子によりコードされるタンパク質のエピトープに特異的に結合する抗体、またはその抗原結合性断片。

【請求項 36】

配列番号4の全鎖長を通して少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなり、かつ、DNA中のコンセンサスT - box部位に結合しそしてCD4 + 細胞におけるIFN - 産生を誘導するポリペプチドに特異的に結合し、さらに、配列番号4に少なくとも90%同一性を有するポリペプチド部分に結合する抗体、またはその抗原結合性断片。

40

【請求項 37】

配列番号4のアミノ酸配列に特異的に結合し、かつ、細胞内抗体である、単離された抗体、またはその抗原結合性断片。

【請求項 38】

キメラ抗体またはヒト化抗体である請求項31または35記載の抗体、または抗原結合性断片。

【請求項 39】

50

生物学的試料から配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの単離方法であって、生物学的試料を請求項30、31または34記載の抗体、またはその抗原結合性断片と、該抗体が試料中に存在するポリペプチドと結合して複合体を形成する条件下で接触せしめ、こうして生物学的試料からポリペプチドを単離する工程を含んでなる、上記方法。

【請求項40】

生物学的試料から配列番号4のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの検出方法であって、生物学的試料を請求項30、31または34記載の抗体、またはその抗原結合性断片と、該抗体が試料中に存在するポリペプチドと結合して複合体を形成する条件下で接触せしめ、こうして生物学的試料からポリペプチドを単離する工程を含んでなる、上記方法。

10

【請求項41】

生物学的試料から配列番号4のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの単離方法であって、生物学的試料を請求項30、31または34記載の抗体、またはその抗原結合性断片と、該抗体が試料中に存在するポリペプチドと結合して複合体を形成する条件下で接触せしめ、こうして生物学的試料からポリペプチドを単離する工程を含んでなる、上記方法。

【請求項42】

生物学的試料における配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの試験管内検出方法であって、生物学的試料と請求項31記載の抗体またはその抗原結合性断片を、試料中に存在するポリペプチドに該抗体が結合する条件下で接触させる工程、こうして試料中で形成されたポリペプチドと抗体複合体を検出する工程を含んでなる、上記方法。

20

【請求項43】

T - b e tタンパク質の活性を調節する化合物の同定方法であって、T - b e tタンパク質を含んでなる指標組成物を提供する工程であって、該T - b e tタンパク質が、配列番号1に示される核酸分子であって、DNA中のコンセンサスT - b o x部位に結合しそしてCD4+細胞におけるIFN- γ の産生を誘導するポリペプチドをコードする核酸分子の全鎖長相補体に対して、45'の6X' S S Cにて、次いで65'の0.2X S S C、0.1% S D Sでの1回以上の洗浄によるストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によりコードされるポリペプチドを含んでなる、工程、

30

試験化合物を指標組成物と接触させる工程、および

試験化合物の存在または非存在下で指標組成物中のT - b e tタンパク質の活性に対して試験化合物の効果を決定し、こうしてT - b e tタンパク質の活性を調節する化合物を同定する工程を含んでなる、上記方法。

【請求項44】

指標組成物がT - b e tタンパク質およびT - b e tタンパク質が結合するDNA分子を含んでなり、そして

T - b e tタンパク質の活性に対する試験化合物の効果が試験化合物の存在または非存在下で該DNA分子に対するT - b e tタンパク質の結合性を評価する、請求項43記載の方法。

40

【請求項45】

指標組成物がT - b e tタンパク質およびT - b e tタンパク質に対して応答性のレポーター遺伝子を含んでなり、そして

T - b e tタンパク質の活性に対する試験化合物の効果が試験化合物の存在または非存在下で該DNA分子に対するT - b e tタンパク質の結合性を評価する、請求項43記載の方法。

【請求項46】

非ヒト哺乳動物における免疫応答に対して試験化合物の効果を決定し、そして試験化合物の存在または非存在下での免疫応答に対する試験化合物の効果を決定することにより、免疫応答を調節する化合物を同定する工程をさらに含んでなる、請求項43記載の方法。

50

【請求項 47】

T - b e t タンパク質の活性を調節する薬剤と細胞を細胞内の T - b e t 活性が調節されるように接触させる工程を含んでなる細胞における T - b e t 活性の試験管内調節方法であって、該薬剤が、配列番号 4 のポリペプチドをコードする核酸分子、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列に対してアンチセンスである核酸分子、配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列に特異的に結合する細胞内抗体、またはそれらの組み合わせ物からなる群より選択される、上記方法。

【請求項 48】

T - b e t タンパク質の活性を調節する化合物の同定方法であって、T - b e t タンパク質を含んでなる指標組成物を提供する工程であって、該 T - b e t タンパク質が、配列番号 3 に示される核酸分子であって、DNA 中のコンセンサス T - b o x 部位に結合しそして CD 4 + 細胞における I F N - の産生を誘導するポリペプチドをコードする核酸分子の全鎖長相補体に対して、4 5 の 6 X S S C にて、次いで 6 5 の 0 . 2 X S S C、0 . 1 % S D S での 1 回以上の洗浄によるストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によりコードされるポリペプチドを含んでなる、工程、

試験化合物を指標組成物と接触させる工程、および

試験化合物の存在または非存在下で指標組成物中の T - b e t タンパク質の活性に対して試験化合物の効果を決定し、こうして T - b e t タンパク質の活性を調節する化合物を同定する工程を含んでなる、上記方法。

【請求項 49】

請求項 3 4 または 4 8 記載の方法であって、ポリペプチドが結合する DNA 分子がコンセンサス T - b o x 結合部位である、上記方法。

【請求項 50】

請求項 3 4 または 4 8 記載の方法であって、ポリペプチドが結合する DNA 分子が I L - 2 プロモーターを含んでなる、上記方法。

【請求項 51】

請求項 3 4 または 4 8 記載の方法であって、ポリペプチドが結合する DNA 分子が I F N - プロモーターである、上記方法。

【請求項 52】

レポーター遺伝子が T h 1 会合サイトカイン遺伝子である、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 53】

T h 1 会合サイトカイン遺伝子が I L - 2、I F N - 、および L T (リンホトキシン) からなる群より選択される、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 54】

T h 1 会合サイトカイン遺伝子が I F N - である、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 55】

レポーター遺伝子が、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびルシフェラーゼをコードする遺伝子からなる群より選択される、請求項 4 5 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

T h 1 細胞産生プログラムの開始および T h 2 細胞内の対立プログラムの抑制の両方によりナイーブ T ヘルパー前駆細胞 (T h p) 内で T h 1 表現型を促進するように、作用する新規の組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫系の細胞は、細胞外および細胞内シグナルに反応して遺伝子発現のパターンを変化させる。種々の細胞タイプにおいて一連の生物学的活性に影響するサイトカインまたはリ

10

20

30

40

50

ンホカインと名付けられたポリペプチドの群は、これらのシグナルの中で最も重要なものに属する。免疫系内の多数の細胞タイプがサイトカインを分泌するけれども、Tヘルパー（Th）リンパ球はこれらのポリペプチドの主要な供給源である。10年以上前に、Th細胞は、T細胞受容体連結（engagement）の際に2種の異なるサブセット、Th1およびTh2に分化し、これらの異なる機能性能力および独自のサイトカインプロフィールにより両者に定義されることが発見された（非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4）。Th1細胞は遅延タイプ過敏性反応およびマクロファージ活性化を媒介し、一方Th2細胞はB細胞を支援しそしてアレルギー反応に重要である（非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9）。Th1細胞が細胞-媒介免疫を指令し、一方Th2細胞が体液反応に関与するという証拠は、生物体が、病原に反応して細胞媒介または体液反応のいずれかを有する傾向があり、しかし両方ではないという観察に良く適合する。Thサブセット間のこれらの機能的な相違は、サイトカイン自体の活性により最も容易に説明できる。Th1細胞はIL-2、TNFおよびLTも産生するけれども、IFN- γ がTh1細胞の「特徴（signature）」サイトカインである。Th2の相当する「特徴」サイトカインはIL-4である。Th2細胞は、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10およびIL-13も分泌する。

10

【0003】

抗原に遭遇すると、ナイーブCD4-Tヘルパー前駆体（Thp）細胞は発生プログラムを開始し、最終的にはこれをTh1またはTh2系統に送る。極性化は抗原および同時刺激シグナル、すなわちThpが受ける「シグナル強さ」を操作して達成できるが（非特許文献10）、エフェクターTh細胞の最も強力な誘導物質は、疑いなくサイトカイン自体である。IL-4はTh2分化を促進しそして同時にTh1発生を遮断し、これはStat6信号伝達経路により媒介される作用である。従って、IL-4またはStat6を欠失するマウスは、Th2細胞を発生しない（非特許文献11；非特許文献12；非特許文献13；非特許文献14；非特許文献15）。反対に、IL-12、IL-18およびIFN- γ は、Th1細胞発生に重要なサイトカインである（非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18；非特許文献19；非特許文献20）。Stat1経路を介して作用するIFN- γ （非特許文献21）、およびStat4信号伝達経路を介して作用するIL-12（非特許文献22）は、一緒になってTh1細胞の分化を促進しそしてTh2系統へのコミットメントを遮断する（非特許文献23；非特許文献24）。IL-12またはStat4を欠失するマウスは、Th1細胞を持っていない（非特許文献25；非特許文献26；非特許文献27）。別の重要なTh1誘導サイトカインはIL-18であり、その受容体はIL-1受容体ファミリーに関連する（非特許文献28）。IL-18を欠失するマウスは、生体内Th1反応を欠き（非特許文献29）そしてIL-12およびIL-18の両者はIFN- γ 発現を調節する（非特許文献30；非特許文献31；非特許文献32）。従って、これらのサイトカイン自体はTh極性化を駆動する正および負のフィードバック系を形成する（非特許文献33；非特許文献34；非特許文献35；非特許文献36；非特許文献37；非特許文献38；非特許文献39；非特許文献40；非特許文献41；非特許文献42；非特許文献43）（総説は、非特許文献44；非特許文献45；非特許文献46）。

20

30

40

【0004】

最近数年間に、Th2細胞へのTh中の転移を制御する転写因子の同定に著しい進歩がなされ、これはIL-4産生を駆動するこのような因子の能力により証明され、下に概説されている（非特許文献47；非特許文献48）。3種の異なるタンパク質、すなわちc-Mafプロト腫瘍遺伝子、転写因子である活性化T細胞の核因子（NFAT）、および新規の核抗原であるNFAT-相互作用タンパク質45kD（NIP45）の産生が、非-T細胞に内因性IL-4産生能力を与えることが証明された（非特許文献49）。これらの因子およびその他、例えばGATA-3（非特許文献50）およびStat6は、明らかにIL-4の産生、従ってTh2細胞の発生を、生体外および生体内の両方で駆動できる。

50

【0005】

反対に、Th1分化の分子的基础はほとんど知られていない。例えば、その不在がTh1細胞生成を不能とする既知のわずかな因子は、Stat4（非特許文献51；非特許文献52）およびIRF-1（非特許文献53；非特許文献54）であり、これらはいずれもTh1特異性ではない。Stat4依存の様式でIL-12中に導入されるEtsファミリーメンバーERMは、最近Th1特異性であると報告されたが、しかしこれはTh1サイトカインの産生に影響しない（非特許文献55）。Stat4欠失マウス中のTh1細胞の不在は、Th1プログラムを駆動するIL-12の欠損の結果であり、一方、IRF-1欠失マウス中のTh1細胞の欠失は、IL-12遺伝子の転写制御における直接的作用によるものであるらしい（非特許文献56；非特許文献57）。しかし、このような推定Th1-特異性調節因子の上流にある信号伝達経路の一部は、解明され始めている。p38キナーゼは、このような信号伝達分子の一つであり、これはIFN- γ 産生をブーストする構成的活性化MAPキナーゼ・キナーゼ6（MKK-6）の能力により証明される。反対に、優性陰性（dominant negative）p38MAPキナーゼの過剰発現またはJnk2またはJnk1の標的破壊は、Th1反応を低下する（非特許文献58；非特許文献59；非特許文献60）。JNK信号伝達経路は、INF- γ 遺伝子の転写への直接作用によりTh発生に影響するであろうが、しかしこれは証明されていない。例えば、ATF-2およびAP-1転写因子は、両者共にJNKキナーゼの基質でありそしてこれらの因子ならびにNF- κ BおよびStat4タンパク質はIFN- γ プロモーター内の部位に結合することが知られている（非特許文献61；非特許文献62；非特許文献63；非特許文献64）。しかし、IFN- γ の産生は、ATF-2を欠失するマウスでは正常である。サイトカインはTh1およびTh2細胞の発生に重要であり、そして、これにより、免疫反応が主として細胞または体液的であるかの決定において重要なので、Th1および/またはTh2サイトカインの産生を調節するための組成物および方法は、免疫反応の調節において、甚大な利益であろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Paul and Seder, 1994, Cell 76, 241-251

【非特許文献2】Mosmann and Coffman, 1989, Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173

【非特許文献3】Mosmann et al., 1986, J. Immunol. 136, 2348-2357

【非特許文献4】Snapper and Paul, 1987, Science 236, 944-947)

【非特許文献5】Mosmann and Coffman, 1989, Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173

【非特許文献6】Paul and Seder, 1994, Cell 76, 241-251

【非特許文献7】Arthur and Mason, 1986, J. Exp. Med. 163, 774-786

【非特許文献8】Paliard et al., 1988, J. Immunol. 141, 849-855

【非特許文献9】Finkelman et al., 1988, J. Immunol. 141, 2335-2341)

【非特許文献10】Constant and Bottomly, 1997, Annu. Rev. Immunol. 15, 297-322

【非特許文献11】Kopf et al., 1993, Nature 362, 245-248

10

20

30

40

50

- 【非特許文献12】Kuhn et al. 1991, Science, 254, 707 - 710
- 【非特許文献13】Kaplan et al. 1996, Immunity 4, 313 - 319
- 【非特許文献14】Shimoda et al., 1996, Nature 380, 630 - 633
- 【非特許文献15】Takada et al., 1996, Nature 380, 627 - 630
- 【非特許文献16】Hsieh et al., 1993, Science 260, 547 - 549 10
- 【非特許文献17】Okamura et al., 1995, Nature 378, 88 - 91
- 【非特許文献18】Gu et al., 1997, Science 275, 206 - 209
- 【非特許文献19】Meraz et al., 1996, Cell 84, 431 - 442
- 【非特許文献20】Magram et al., 1996, Immunity 4, 471 - 481
- 【非特許文献21】Meraz et al., 1996, Cell 84, 431 - 442 20
- 【非特許文献22】Jacobson et al., 1995, J. Exp. Med. 181, 1755 - 61762
- 【非特許文献23】Szabo et al., 1995, Immunity 2, 665 - 675
- 【非特許文献24】Szabo et al., 1997, J. Exp. Med. 185: 817 - 825
- 【非特許文献25】Magram et al., 1996, Immunity 4, 471 - 481
- 【非特許文献26】Takada et al., 1996, Nature 380, 627 - 630 30
- 【非特許文献27】Shimoda et al., 1996, Nature 380, 630 - 633
- 【非特許文献28】Cerretti et al., 1992, Science 256, 97 - 100
- 【非特許文献29】Takeda et al., 1998, Immunity 8, 383 - 390
- 【非特許文献30】Barbulescu et al., 1998, Eur. J. Immunol., 27, 1098 - 1107
- 【非特許文献31】Robinson et al., 1997, Immunity 7, 571 - 581 40
- 【非特許文献32】Ahn et al., 1997, J. Immunol. 159, 2125 - 2131
- 【非特許文献33】Powrie and Coffman, 1993, Immunol. Today 14, 270 - 274
- 【非特許文献34】Scott, 1991, J. Immunol. 147, 3149
- 【非特許文献35】Maggie et al., 1992, J. Immunol. 148, 2142
- 【非特許文献36】Paronchi et al., 1992, J. Immunol. 149, 2977
- 【非特許文献37】Fargeas et al., 1992, Eur. J. Immun 50

o l . 1 4 9 , 2 9 7 7

【非特許文献38】Menetti et al., 1993, J. Exp. Med. 177, 1199

【非特許文献39】Trinchieri, 1993, Immunol Today, 14, 335 - 338

【非特許文献40】Macatonia et al., 1993, Immunol. 5, 1119

【非特許文献41】Seder et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10188 - 10192

【非特許文献42】Wu et al., 1993, J. Immunol. 151, 1938 10

【非特許文献43】Hsieh et al., 1993, Science 260. 547 - 549

【非特許文献44】Seder and Paul, 1994, In Annual Review of Immunology, Vol. 12, 635 - 673

【非特許文献45】Paul and Seder, 1994, Cell 76, 241 - 251

【非特許文献46】O'Garra, 1998, Immunity 8, 275 - 283

【非特許文献47】Glimcher and Singh, 1999 Cell 96, 13 - 23 20

【非特許文献48】Szabo et al., 1997, Current Opinions in Immunology 9, 776 - 781

【非特許文献49】Hodge et al., 1996, Science 274, 1903 - 1905; Hoet al., 1998, J. Exp. Med. 188: 1859 - 1866

【非特許文献50】Zheng and Flavell, 1997, Cell 89, 587 - 596

【非特許文献51】Thierfelder et al., 1996, Nature 382, 171 - 174

【非特許文献52】Kaplan et al., 1996, Nature 382, 174 - 177) および IRF - 1 30

【非特許文献53】Lohoff et al., 1997, Immunity: 681 - 689

【非特許文献54】Taki et al., 1997, Immunity 6: 673 - 679

【非特許文献55】Ouyang et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 3888

【非特許文献56】Lohoff et al., 1997, Immunity 6, 681 - 689

【非特許文献57】Taki et al., 1997, Immunity 6: 673 - 679 40

【非特許文献58】Rincon et al., 1998, EMBO J. 17, 2817 - 2829

【非特許文献59】Yang et al., 1998, Imunity 9, 575 - 585

【非特許文献60】Dong et al., 1998, Science 282, 2092 - 2095

【非特許文献61】Zhang et al., 1998, Immunol. 161, 6105 - 6112

【非特許文献62】Ye et al., 1996, Mol. Cell. Biol. 16 50

: 4744

【非特許文献63】Barbulescu et al., 1997, Eur. J. Immunol. 27, 1098-1107

【非特許文献64】Sica et al., 1997, J. Biol. Chem. 272, 30412-30420

【発明の概要】

【0007】

本発明は、少なくともその一部分は、ナイーブTヘルパー前駆細胞(Thp)内でTh1表現型を促進するように、Th1細胞産生プログラムの開始およびTh2細胞内の対立プログラムの抑制の両方によって作用する新規の組成物の発見に基づく。具体的には、本発明は、T-betをコードする単離された核酸分子および単離されたT-betタンパク質を提供する。T-bet(Tbox expressed in T cell)は、創始メンバーがbrachyury遺伝子である転写因子のT-boxファミリーの新しいメンバーである。T-betは、胸腺細胞およびTh1細胞内で選択的に構成性発現される。T-betは、インターフェロン- γ 遺伝子をトランス活性化し、レトロウイルス的に形質導入された一次T細胞内でインターフェロン- γ 産生を誘導しそして極性化したTh2細胞をTH1経路内に転向することができる、最初のTh1特異性転写因子である。本発明は、これらの新規のT-bet組成物の使用方法も提供する。

10

【0008】

本発明の一つの態様は、T-betをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子に関する。好ましい態様では、核酸分子は、配列番号1または3のヌクレオチド配列を含んでなる。他の態様では、核酸分子は、配列番号1の少なくとも約700の連続したヌクレオチドまたは配列番号3の少なくとも500の連続したヌクレオチドを含んでなる。好ましい態様では、核酸分子は、配列番号1の少なくとも約700の連続したヌクレオチドと少なくとも70%のヌクレオチド一致または配列番号3の少なくとも500の連続したヌクレオチドと少なくとも70%のヌクレオチド一致を有する。

20

【0009】

T-betをコードする本発明の単離された核酸分子は、ベクター、例えば発現ベクター内に組み込むことができ、そしてこのベクターは宿主細胞内に導入できる。本発明は、適当な培地内で本発明の宿主細胞(T-bet発現ベクターを有する)をT-betタンパク質が産生されるまで培養することによるT-betタンパク質を産生する方法も提供する。この方法は、さらに培地または宿主細胞からT-betタンパク質の単離を含むことができる。

30

【0010】

本発明の別の態様は、単離されたT-betタンパク質に関する。好ましくは、T-betタンパク質は配列番号2または4のアミノ酸配列を含んでなる。他の態様では、タンパク質は少なくとも60%のアミノ酸一致、少なくとも70%のアミノ酸一致、さらに好ましくは少なくとも80%のアミノ酸一致、その上さらに好ましくは少なくとも90%のアミノ酸一致を配列番号1または3記載のアミノ酸配列と有する。

40

【0011】

T-bet以外のポリペプチドと操作可能に連結したT-betタンパク質を含んでなる融合タンパク質も本発明に包含され、さらにT-betタンパク質を特異的に結合する抗体も包含される。例えば、抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることができる。一つの態様では、抗体は検出可能な物質にカプリングしている。

【0012】

本発明の別の態様は、T-betタンパク質をコードする導入遺伝子を有する細胞を含む非-ヒトトランスジェニック動物に関する。

【0013】

本発明のさらに別の態様は、生物学的試料内のT-betの存在を検出するための方法に関する。この方法は、T-betの存在が生物学的試料中で検出されるT-bet活性

50

の指標を検出する能力がある薬剤と生物学的試料とを接触させることを含む。本発明は、細胞内の T - b e t 活性が調節されるように T - b e t 活性を調節する薬剤と生物学的試料とを接触させることを含んでなる細胞内の T - b e t 活性を調節するための方法も提供する。

【 0 0 1 4 】

本発明のさらに別の態様は、 T - b e t タンパク質の活性を調節する化合物を同定するための方法にも関する。このような方法は、一般に

T - b e t タンパク質を含んでなる指標組成物を調製し、
指標組成物を供試化合物と接触させ、そして

指標組成物内の T - b e t タンパク質の活性に対する供試化合物の作用を決定し、これにより T - b e t タンパク質の活性を調節する化合物を同定する

ことを含む。好ましい態様では、指標組成物は、 T - b e t タンパク質が結合しそして T - b e t タンパク質の活性に対する供試化合物の作用が供試化合物の存在または不在における DNA 分子への T - b e t タンパク質の結合を評価して決定される T - b e t タンパク質および DNA 分子を含んでなる。さらに他の態様では、指標組成物が T - b e t タンパク質および T - b e t タンパク質に反応するレポーター遺伝子を含んでなる細胞であり、そして T - b e t タンパク質の活性に対する供試化合物の作用を、供試化合物の存在および不在におけるレポーター遺伝子の発現を評価することにより決定する。さらに別の態様では、本方法は、免疫反応に対する供試化合物の作用を決定し、これにより免疫反応を調節する化合物を同定する段階をさらに含む。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 5 】

【 図 1 A 】 1 A はネズミおよびヒト T - b e t のヌクレオチド配列整列を示す。この整列は、 A L I G N プログラムを用いて作製された。

【 図 1 B 】 1 B は、 L i p m a n P e a r s o n タンパク質整列プログラムを用いて作製したネズミおよびヒト T - b e t のアミノ酸配列整列を示す。 T - b o x 配列を太字で示す。チロシンリン酸化部位は下線を付けた。核局在化部位は矢印で示す。

【 図 2 】 2 A および B は、 5 ' および 3 ' の両方に位置する機能的に重要なドメインを有する共通 T - b o x 部位に T - b e t が結合しトランス活性化することを示す。

【 図 3 A 】 3 A は、 T - b e t がダブルネガティブ胸腺細胞内で優先的に発現されることを示す。

【 図 3 B 】 パネル B は、 T h クローンの探索において、 T - b e t 発現が T h 1 細胞に限定されることを示す。

【 図 3 C 】 パネル C は、 T - b e t のウエスタンプロット分析を示す。

【 図 3 D 】 パネル D は、 T - b e t 発現の F A C S 分析を示す。

【 図 4 A 】 4 A は、 T - b e t 発現が、 N K および B 細胞内の I F N - 誘導と関連することを示す。

【 図 4 B 】 4 B は、 T - b e t 発現が、 N K および B 細胞内の I F N - 誘導と関連することを示す。

【 図 5 】 T - b e t が T h 細胞内の I F N - 遺伝子をトランス活性化することを示す。

【 図 6 】 T - b e t のレトロウイルス遺伝子形質導入が I F N - 産生を増加しそして I L - 2 産生を抑制することを示す。

【 図 7 】 T - b e t が、一次 T 細胞内で I F N - 産生を活性化しそして I L - 2 産生を抑制することを示す。

【 図 8 A 】 T - b e t が、発生中の T h 2 細胞内で I F N - 産生を誘発しそして I L - 2 産生を阻害することを示す。

【 図 8 B 】 T - b e t が、発生中の T h 2 細胞内で I F N - 産生を誘発しそして I L - 2 産生を阻害することを示す。

【 図 9 A 】 T - b e t が極性化 T h 2 細胞を T h 1 経路内に転向することを示す。 T h 偏向は、上記のように実行されそしてレトロウイルス感染は培養の 9 日目に行った。

【図9B】T - b e t が極性化T h 2細胞をT h 1経路内に転向することを示す。T h 偏向は、上記のように実行されそしてレトロウイルス感染は培養の9日目に行った。

【図9C】T - b e t が極性化T h 2細胞をT h 1経路内に転向することを示す。T h 偏向は、上記のように実行されそしてレトロウイルス感染は培養の9日目に行った。

【図9D】T - b e t が極性化T h 2細胞をT h 1経路内に転向することを示す。T h 偏向は、上記のように実行されそしてレトロウイルス感染は培養の9日目に行った。

【図10A】T - b e t が極性化T c 2細胞をT c 1経路内に転向することを示す。C D 8 + T細胞はM o F l oにより精製しそして上記のT h 2偏向条件で培養しそしてレトロウイルス形質導入は培養の8日目に行った。

【図10B】T - b e t が極性化T c 2細胞をT c 1経路内に転向することを示す。C D 8 + T細胞はM o F l oにより精製しそして上記のT h 2偏向条件で培養しそしてレトロウイルス形質導入は培養の8日目に行った。

【図10C】T - b e t が極性化T c 2細胞をT c 1経路内に転向することを示す。C D 8 + T細胞はM o F l oにより精製しそして上記のT h 2偏向条件で培養しそしてレトロウイルス形質導入は培養の8日目に行った。

【図10D】T - b e t が極性化T c 2細胞をT c 1経路内に転向することを示す。C D 8 + T細胞はM o F l oにより精製しそして上記のT h 2偏向条件で培養しそしてレトロウイルス形質導入は培養の8日目に行った。

【図11】T - b e t がチロシンリン酸化されていることを示す。

【図12】T - b e t 優性陰性変異体の活性を示す。

【図13】I L - 2プロモーターのT - b o x要素の変異体がI L - 2プロモーター活性を低下することを示す。

【0016】

< 発明の詳細な記述 >

本発明は、T - b e t 組成物、例えばT - b e t をコードする単離された核酸分子および単離されたT - b e t タンパク質、ならびにこれらの使用方法に関する。

【0017】

本発明をさらに容易に理解できるように、一部の用語を最初に定義する。

【0018】

本明細書中に使用される場合に、用語「T - b e t 分子」は、配列番号1および3に記載の核酸分子と構造的特徴を共有するT - b e t 核酸分子および配列番号2および4に記載のT - b e t タンパク質の特徴的な構造および機能的特徴を共有するT - b e t タンパク質を含む。T - b e t タンパク質は、タンパク質のT - b o xファミリーのメンバーでありそしてB r a n c h y u r y、T b x 1 - 6、T - b r a i n - 1 (T b r - 1) といくつかのアミノ酸配列相同を共有する。T - b o x タンパク質は、T - b o x 結合部位においてD N A に結合するT - b o x ドメインを含んでなる。さらにT - b e t タンパク質の構造および機能的特徴は以下に記載する。

【0019】

本明細書中に使用される場合に、用語「核酸分子」は、D N A 分子（例えばc D N A またはゲノムD N A）およびR N A 分子（例えばm R N A）を含むと考える。核酸分子は、一本鎖状または二本鎖状でもよいが、しかし好ましくは二本鎖状D N A である。

【0020】

本明細書中に使用される場合に、「単離された核酸分子」は、核酸が誘導された生物体のゲノムD N A 内の核酸に本来的に近接する遺伝子配列（すなわち、核酸が誘導された生物体のゲノムD N A 内の単離された核分子に対する遺伝子に近接して位置する遺伝子配列）を含まない核酸分子を呼ぶ。例えば、種々の態様において、単離されたT - b e t 核酸分子は、代表的には、核酸が誘導された細胞のゲノムD N A 内の核酸分子に本来的に近接するヌクレオチド配列の約10 k b 以下を含み、そしてさらに好ましくは、本来的に近接するヌクレオチド配列の約5 k b、4 k b、3 k b、2 k b、1 k b、0.5 k b または0.1 k b 以下を含む。しかし、「単離された」T - b e t 核酸分子は、ゲノムD N A 内

10

20

30

40

50

の T - b e t 配列に正常では近接しない他のヌクレオチド配列に連結してもよい（例えば、T - b e t ヌクレオチド配列はベクター配列に連結してもよい）。ある好ましい態様では、「単離された」核酸分子、例えば c D N A 分子は、他の細胞物質を含まなくてもよい。しかし、T - b e t 核酸分子が「単離された」と考えられるために他の細胞物質を含まないという必要はない（例えば、他の哺乳類から分離されそして細菌細胞内に挿入された T - b e t D N A 分子は、まだ「単離された」と考えられる）。

【0021】

本明細書中に使用される場合に、用語「高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」は、たがいに本質的な相同性（例えば代表的には70%相同以上）を有するヌクレオチド配列がたがいに安定してハイブリダイズされたままであるようなハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を記述することを意図する。高いストリンジェンシー条件の好ましいが制限的ではない例は、6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウムを含むハイブリダイゼーション緩衝液（SSC）中、温度約45で数時間から一晚ハイブリダイゼーションし、次いで0.2XSSC、0.1%SDSを含む洗浄緩衝液中、温度約50~65での1回またはそれ以上の洗浄である。

10

【0022】

用語「パーセント（%）一致」は、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の範囲内で使用された場合（例えば、一つのアミノ酸配列が他のアミノ酸配列にX%一致である場合）に、最適に配列される場合に2個の配列の間で共有する一致した残基の百分率を呼ぶ。2個のヌクレオチドまたはアミノ酸配列の一致百分率を決定するために、配列を最適比較の目的で整理する（例えば一つの配列を他の配列と最適に整理するために間隙を挿入してもよい）。次いで、相当する位置にある残基を比較しそして一方の配列内の位置が他の配列の相当する位置に相当して同じ残基で占められている場合に、分子はその位置で一致する。従って、2個の配列の間の一致百分率は、2個の配列が共有する一致した位置の数の関数である（すなわち、%一致 = (一致した位置の数 / 位置の全数) x 100）。

20

【0023】

当該技術分野で公知のコンピューターアルゴリズムは、2個のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を最適に整理しそして比較して、2個の配列間の一致百分率を決定するために使用できる。2個の配列の比較のために使用される数学アルゴリズムの好ましいが制限的ではない例は、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264 - 2268、変更はKarlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 10のNBLASTおよびXBLASTプログラム中に組み込まれている。比較のためにギャップ入りの整理を得るためには、ギャップ入りBLASTがAltschul et al., (1997) Nucleic Acids Research 25(17): 3389 - 3402に記載されている。BLASTおよびギャップ入りBLASTプログラムを使用する場合に、それぞれのプログラム（例えばXBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターが使用できる。http://www.ncbi.nlm.nih.gov 参照。例えば、本発明のヌクレオチド配列は、ギャップペナルティーをexistence 5およびextension 2に設定したデフォルトBlastinマトリックス1-3を使用してBLAST処理した。本発明のアミノ酸配列は、下記のデフォルト設定を用いてBLAST処理した：ギャップペナルティーをexistence 11およびextension 1に設定したBlosum62マトリックス。

30

40

【0024】

配列の比較のために使用した数学アルゴリズムの別の好ましい非限定的例は、Myers and Miller, CABIOS (1989)のアルゴリズムである。このアルゴリズムは、GCG配列整理ソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）内に組み込まれている。アミノ酸配列比較のためにALIGNプロ

50

グラムを用いる場合には、P A M 1 2 w e i g h t r e s i d u e t a b l e、g a p l e n g t h p e n a l t y 1 2 および g a p p e n a l t y 4 が使用できる。配列比較のために複数のプログラムを使用する場合には、最適の整列（例えば2個の配列間の最高の一致パーセント）を与えるプログラムが比較の目的で使用される。

【0025】

本明細書中に使用される場合に、「天然に存在する」核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド配列を有するRNAまたはDNA分子を呼ぶ（例えば天然タンパク質をコードする）。

【0026】

本明細書中に使用される場合に、「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的、例えば二本鎖cDNA分子のコーディング鎖に相補的、mRNA配列に相補的または遺伝子のコーディング鎖に相補的なヌクレオチド配列を含んでなる。従って、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合できる。

10

【0027】

本明細書中に使用される場合に、用語「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンを含んでなるヌクレオチド配列の領域を呼び、一方用語「非コード領域」は、アミノ酸に翻訳されないヌクレオチド配列の領域を呼ぶ（例えば5'および3'非翻訳領域）。

【0028】

本明細書中に使用される場合に、用語「ベクター」は、これが連結している他の核酸を輸送できる核酸分子を呼ぶ。ベクターの一つのタイプは、「プラスミド」であり、これはその中に別のDNAセグメントが連結してもよい環状二本鎖DNAループを呼ぶ。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、ここでは別のDNAセグメントはウイルスゲノム内に連結されてもよい。ある種のベクターは、これが導入された宿主細胞内で自律複製ができる（例えば複製の細菌起点を有する細菌ベクターおよびエピソーマル哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば非-エピソーマル哺乳類ベクター）は、宿主細胞内への導入の際に宿主細胞のゲノム内に組み込まれ、そしてこれにより宿主ゲノムと同時に複製される。さらに、一部のベクターは、これらが操作可能に連結している遺伝子の発現を指令できる。このようなベクターは、本明細書中では「組換え発現ベクター」または単に「発現ベクター」と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形である。本明細書中で、「プラスミド」および「ベクター」は交換可能に使用されるが、それはプラスミドがベクターの最も普通に使用される形であるからである。しかし、本発明は、同等の機能に役立つ発現ベクター、例えばウイルスベクター（例えば複製欠失レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルス）のような他の形も含むと考える。

20

30

【0029】

本明細書中に使用される場合に、用語「宿主細胞」は、本発明の核酸、例えば本発明の組換え発現ベクターが導入された細胞を呼ぶと考える。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中では交換可能に使用される。このような用語は、特定の細胞タイプを呼ぶだけでなく、このような細胞の後代または可能な後代も呼ぶと考える。ある種の変化は、突然変異または環境の影響により後続世代に起きるであろうから、このような後代は実際には親細胞と同等ではないが、しかし本明細書中に使用される用語の範囲内に含まれる。

40

【0030】

本明細書中に使用される場合に、「トランスジェニック動物」は、動物の1個またはそれ以上の細胞が「導入遺伝子」を含む非-ヒト動物、好ましくは哺乳類、さらに好ましくはマウスを呼ぶ。用語「導入遺伝子」は、これからトランスジェニック動物が発生しそして成熟動物のゲノム内に残る細胞のゲノム内に組み込まれる外因性DNAを呼び、例えばトランスジェニック動物の1個またはそれ以上の細胞タイプまたは組織内にコードされた遺伝子産物の発現を指令する。

【0031】

50

本明細書中に使用される場合に、「相同組換え動物」は、動物の発生に先立って、外因性遺伝子が、その中で外因性遺伝子と動物の細胞、例えば動物の胚細胞内に導入された外因性DNA分子との間の相同性組換えにより改変されているトランスジェニック非ヒト動物、好ましくは哺乳類、さらに好ましくはマウスのタイプを呼ぶ。

【0032】

本明細書中に使用される場合に、「単離されたタンパク質」は、細胞から単離されるかまたは組換えDNA技術により産生された場合に他のタンパク質、細胞物質および培地、または化学的に合成された場合に化学的前駆体または他の化学物質を本質的に含まないタンパク質を呼ぶ。

【0033】

本明細書中に使用される場合に、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち抗原に特異的に結合（免疫反応）する抗原結合部位を含む分子を含むと考え、例えばFabおよびF(ab')₂断片である。本明細書中に使用される場合に、用語「モノクローナル抗体」および「モノクローナル抗体組成物」は、抗原の特定のエピトープと免疫反応できる抗原結合部位の一種のみを含む抗体分子の集団を呼び、一方「ポリクローナル抗体」および「ポリクローナル抗体組成物」は、特定の抗原と相互作用可能な抗原結合部位の複数の種類を含む抗体分子の集団を呼ぶ。従って、モノクローナル抗体組成物は、代表的には、これが免疫反応する特定の抗原に対する単一結合親和性を示す。

【0034】

特定のタンパク質のアミノ酸配列と、タンパク質をコードできるヌクレオチド配列の間には既知で一定の相関があり、これは遺伝暗号により定義される（以下に記載する）。同様に、特定の核酸分子のヌクレオチド配列と、核酸分子によりコードされるアミノ酸配列の間にも遺伝暗号により規定される既知で一定の相関がある。

【0035】

遺伝暗号

アラニン (Ala, A)	CGA, GCC, GCG, GCT	
アルギニン (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT	
アスパラギン (Asn, N)	AAC, AAT	
アスパラギン酸 (Asp, D)	GAC, GAT	
システイン (Cys, C)	TGC, TGT	
グルタミン酸 (Glu, E)	GAA, GAG	
グルタミン (Gln, Q)	CAA, CAG	
グリシン (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT	
ヒスチジン (His, H)	CAC, CAT	
イソロイシン (Ile, I)	ATA, ATC, ATT	
ロイシン (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG	
リシン (Lys, K)	AAA, AAG	
メチオニン (Met, M)	ATG	
フェニルアラニン (Phe, F)	TTC, TTT	
プロリン (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT	
セリン (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT	
トレオニン (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT	
トリプトファン (Trp, V)	TGG	
チロシン (Tyr, Y)	TAC, TAT	
バリン (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT	
終止シグナル (末端)	TAA, TAG, TGA	

【0036】

遺伝暗号の重要で周知の特徴は、その重複性であり、これによりタンパク質を構成する大部分のアミノ酸に対して、1個を越えるコーディングヌクレオチドトリプレットを使用

10

20

30

40

50

してもよい（以上に記載）。従って、多数の異なるヌクレオチド配列が一つの与えられたアミノ酸配列に対してコードできる。このようなヌクレオチド配列は、機能的に等価と考えられ、それはこれらがすべての生物体内で同じアミノ酸配列の産生をもたらすからである（しかし、一部の生物体は、ある種の配列が他のものに対するより一層迅速に翻訳できる）。さらに、場合により、プリンまたはピリミジンのメチル化変種が、与えられたヌクレオチド配列内に見いだされてもよい。このようなメチル化は、トリヌクレオチドコドンと相当するアミノ酸との間のコーディング関係に影響しない。

【0037】

以上を考慮して、本発明の T - b e t タンパク質（またはそのいかなる部分でも）に対してコードする DNA または RNA 分子のヌクレオチド配列は、DNA または RNA 分子をアミノ酸配列に翻訳する遺伝暗号を用いて T - b e t アミノ酸配列を誘導するために使用できる。同様に、あらゆる T - b e t アミノ酸配列に対して、T - b e t タンパク質をコードできる相当するヌクレオチド配列が遺伝暗号から誘導できる（しかしその重複性により、これは与えられたアミノ酸配列に対して複数の核酸配列を生成する）。従って、T - b e t ヌクレオチド配列に関する本明細書中の記述および/または開示は、ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列の記述および/または開示とも考えられるべきである。同様に、本明細書中の T - b e t アミノ酸配列の記述および/または開示は、アミノ酸配列をコードできるすべての可能なヌクレオチド配列の記述および/または開示とも考えるべきである。

【0038】

Brachyury または T は、T - b o x と呼ばれる 200 アミノ酸 DNA 結合ドメインを共有する転写因子のファミリーの創始メンバーである（総説は、(Smith, 1997; Papaioannou, 1997; Meisler, 1997 中)。Brachyury（「短尾」のギリシャ語）突然変異は、短くて少しねじれた尾を持った異型接合変異動物内で、1927年に最初に記載された（Herrmann et al., 1990）。Brachyury T - b o x タンパク質のアミノ - 末端の半分（アミノ酸 1 ~ 229）は、配列特異性 DNA 結合活性を示すことが知られている T - b o x として知られる保存ドメインを含む（Kispert, A. & Herrmann, B. G. 1993, EMBO J. 12: 3211; Papapetrou, C., et al. 1997, FEBS Lett. 409: 201; Kispert, A., et al., 1995, EMBO J. 14: 4763）。C - 末端の半分は、トランス活性化および抑制ドメインの 2 対を含む。オルソログ種内の T - b o x 領域の間の配列の類似性は、99% と高くそして非オルソログ遺伝子間では 40 ~ 70% である。T - b o x 領域は最近 DNA と同時結晶化され、そしてタンパク質が DNA と大溝 (major groove) および小溝 (minor groove) 内の両方で接触する新規の配列特異性 DNA 認識構造を証明する（Mueller, C. W. & Herrmann, B. G., 1997, Nature 389, 884）。

【0039】

酵母ワンハイブリッド (yeast one hybrid) 法を、Th - 1 特異性転写因子を同定するために使用した。酵母細胞は、IL - 2 プロモーター - レポーター遺伝子構築物を発現するように作製されそして抗 - CD3 活性化 Th 1 細胞クローンから作製された cDNA ライブラリーを用いて形質転換された。IL - 2 プロモーターの検査は、NF B 部位の 5' - 240 - 220 丁度の優れた T - b o x 結合部位を明らかにした。後記の実施例に記載するように、T - b e t は IL - 2 プロモーターを結合する能力に基づいて酵母ワンハイブリッドスクリーニングアッセイで単離された。

【0040】

ネズミ (murine) T - b e t をコードするヌクレオチド配列を配列番号 3 に示す。ネズミ T - b e t は 530 アミノ酸タンパク質であり、その 190 アミノ酸の T - b o x ドメインは残基 136 - 326 に位置する。ネズミ T - b e t のアミノ酸配列を配列番号 4 に示す。ネズミ T - b e t 配列を本明細書中の記載のようにクローンした後、いまま

でどの既知のタンパク質をコードするか知られていなかった核酸断片から T - b e t のヒトオルソログの配列を編集できた。ヒト T - b e t のヌクレオチド配列を配列番号 1 に示す。ヒト T - b e t は、535 アミノ酸タンパク質で、その 190 アミノ酸 T - b o x ドメインは残基 138 - 327 に位置する。ヒト T - b e t 遺伝子は、染色体 17 に位置決定されている。タンパク質の T - b e t ファミリーの 2 メンバー (ヒトおよびマウス) のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を図 1 および配列番号 1 ~ 4 に示す。

【 0 0 4 1 】

本発明の T - b e t タンパク質は、T - b o x タンパク質と相同性を有する。B r a c h y u r y を含まないマウス中に 8 種の T - b o x 遺伝子が存在する。これらは、T b x 1 ~ 6、T - b r a i n - 1 (T b r - 1) およびいまや T - b e t を含み、それぞれ明確で通常は複雑な発現パターンを有する。例えば、T - b r a i n - 1 発現は、大部分が大脳皮質内の明確なドメインに限定される (B u l f o n e , A . e t a l . , 1 9 9 5 , N e u r o n 1 5 , 6 3) 。 T - b e t は T b r - 1 の配列に最も類似している。T - b o x の外で、本発明の T - b e t タンパク質は他の T - b o x タンパク質と一致性を有していない。

10

【 0 0 4 2 】

T - b e t は、T 細胞内のみで発現される T - b o x タンパク質であり、そして T b r - 1 に配列が最も類似している。他の種も B r a c h y u r y 様の遺伝子を発現する。このような脊椎動物種は、ゼノプス (X e n o p u s) 、ミノカサゴ (Z e b r a f i s h) 、ヒヨコおよびヒトであり (R a o , 1 9 9 4 ; H o r b a n d T h o m s e n , 1 9 9 7 ; C o n l o n e t a l . , 1 9 9 6 ; R y a n e t a l . , 1 9 9 6 ; S c h u l t e - M e r k e r e t a l . , 1 9 9 4 ; E d w a r d s e t a l . , 1 9 9 6 ; M o r r i s o n e t a l . , 1 9 9 6 ; L a w e t a l . , 1 9 9 5 ; C a m b e l l e t a l . , 1 9 9 8) ならびにさらに遠位の種、例えばナメクジウオ (a m p h i o x u s) 、ホヤ (a s c i d i a n s) 、キョク皮動物 (e c h i n o d e r m) 、C . エレガンス (C a e n o r h a b d i t i s e l e g a n s) 、ショウジョウバエ (d r o s o p h i l a) などの昆虫である (H o l l a n d e t a l . , 1 9 9 5) 。 これらの遺伝子は配列でも発現パターンでも保存されている。

20

【 0 0 4 3 】

T - b e t はチロシンリン酸化で唯一の T - b o x タンパク質として特異である。2 個の共通チロシンリン酸化部位がヒト T - b e t のアミノ酸 328 - 336 および 526 - 534 およびネズミ T - b e t の 327 - 335 および 521 - 529 に存在する。核局在化配列は、ヒト T - b e t のアミノ酸 498 - 501 およびネズミ T - b e t の 493 - 496 にも存在する。地図作製実験は、2 個のトランス活性化部位、すなわち T - b o x ドメインの一方は 5 ' 、他方は 3 ' に位置決定した。ここに記載したデータは、T - b e t が共通 T - b o x 部位に (生体外標的部選択により、5 ' - G G G A A T T T C A C A C C T A G G T G T G A A A T T C C C - 3 ' と決定) および I L - 2 プロモーター内の T - b o x 部位に結合することを証明する。T - b e t は胸腺内および末梢リンパ系内のみで発現する。末梢系において T - b e t は T h 1 細胞内のみで発現され、ここでこれは T c R 刺激および I L - 1 2 の両方に反応して誘導される。胸腺内において T - b e t のレベルは、D N および r a g 2 - / - 胸腺細胞内で最高である。

30

40

【 0 0 4 4 】

これらのデータは、新規の T - b o x ファミリーメンバーである T - b e t の組織特異性 I F N - 発現の原因となる選択的発現を証明する。T - b e t は、T h 1 内でのみ発現され T h 2 細胞内では発現されず、そして T 細胞受容体を介するシグナルの伝達に応じて前者内で誘導される。T - b e t の発現は、T h 1 細胞、N K 細胞および B 細胞中の I F N - 発現と相関し、そして T - b e t は I F N - 遺伝子の有力なトランス活性化剤である。最ももっともらしいのは、T - b e t を用いる T h p 、T h 1 および極性化 T h 2 および T c 2 細胞のレトロウイルス媒介形質導入が、I F N - 発現の印象的な誘導を

50

もたらずことである。これは、IL-2およびIL-4産生の両方の抑制により達成される。従って、T-betの機能は、IFN- γ 遺伝子転写の単なる制御を越えて延びる。T-betは極性化エフェクターTh2細胞および極性化Tc2細胞をそれぞれ対立する1およびTc1サブセットへ変換する。総合して考えると、これらのデータは、T-betがナイーブThp細胞からのTh1系統発生を開始する発生プログラムに参与し、そしてTh1発生プログラムの開始によりそしてTh2細胞内の対立プログラムを抑制することの両方により作用することを証明する。

【0045】

本発明の種々の態様をさらに詳細に以下の章に記述する。

【0046】

10

1. 単離された核酸分子

本発明の一つの態様は、T-betをコードする核酸分子の単離に関する。好ましい態様では、本発明の核酸分子は、配列番号1または配列番号3に記載のヌクレオチド配列を含んでなる。別の態様では、本発明の核酸分子は、配列番号1の連続したヌクレオチドを少なくとも約700個または配列番号3の連続したヌクレオチドを少なくとも約500個を含んでなる。好ましい態様では、本発明の核酸分子は、配列番号1の連続したヌクレオチド少なくとも約800、少なくとも約1000、少なくとも約1200、少なくとも約1400または少なくとも約1600個を含んでなる。別の好ましい態様では、本発明の核酸分子は、配列番号3の連続したヌクレオチド少なくとも約600、少なくとも約800、少なくとも約1000、少なくとも約1200または少なくとも約1400個を含んでなる。

20

【0047】

他の態様では、核酸分子は、配列番号1の連続したヌクレオチド少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約1000、少なくとも約1200、少なくとも約1400または少なくとも約1600個を含んでなる核酸分子と、少なくとも70%一致、さらに好ましくは80%一致、そしてその上さらに好ましくは90%ヌクレオチド一致を有する。別の態様では、核酸分子は、配列番号3の連続したヌクレオチド少なくとも約600、少なくとも約800、少なくとも約1000、少なくとも約1200または少なくとも約1400個を含んでなる核酸分子と、少なくとも70%一致、さらに好ましくは80%一致、そしてその上さらに好ましくは90%ヌクレオチド一致を有する。

30

【0048】

遺伝暗号の縮重により配列番号1または3とは異り、従って配列番号1または3によりコードされると同じT-betタンパク質をコードする核酸分子は、本発明に包含される。従って、別の態様では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0049】

さらに、T-betタンパク質をコードする核酸分子は、標準の分子生物学技術および本明細書中に提供する配列情報を用いて、他の起原から単離できる。例えばT-bet DNAは、ハイブリダイゼーションプローブとして配列番号1または3の全体または一部分、および標準ハイブリダイゼーション技術(例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)を用いてヒトゲノムDNAライブラリーから単離できる。さらに、T-bet遺伝子の全体または一部分を包含する核酸分子は、配列番号1または3の配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応により単離できる。例えばmRNAは細胞から単離でき(例えばChirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299のグアニジウム-チオシアナート抽出法により)、そしてcDNAは、逆転写酵素(例えば、Gibco/BRL, Bethesda, MDから入手できるMoloney MLV 逆転写酵素; またはSeikagaku America Inc.,

40

50

St. Petersburg, FLから入手できるAMV(逆転写酵素)を用いて調製できる。PCR増幅のための合成オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号1または3記載のヌクレオチド配列に基づいて設計できる。本発明の核酸は、cDNAまたはゲノムDNAを鋳型としておよび適当なオリゴヌクレオチドプライマーを用い、標準PCR増幅技術に従って増幅できる。このようにして増幅した核酸は、適当なベクター内にクローンできそしてDNA配列決定分析により特性試験ができる。さらに、T-betヌクレオチド配列に相当するオリゴヌクレオチドは、標準の合成技術、例えば自動化DNA合成装置により調製できる。

【0050】

配列番号1および3記載のT-betヌクレオチド配列に加えて、T-betのヌクレオチドまたはアミノ酸配列に小さい変化をもたらすDNA配列多型が集団内に存在してもよいことは当該技術分野の熟練者により認められる。このようなT-bet遺伝子内の遺伝多型は、自然の対立遺伝子変動により集団内の個体間に存在してもよい。このような自然の対立遺伝子変動は遺伝子のヌクレオチド配列内に代表的には1~2%の変動をもたらす。このようなヌクレオチド変動の結果でありそしてT-betの機能的活性を変更しないT-bet内のこのようなヌクレオチド変動およびその結果であるアミノ酸多型のいずれもまたすべてが、本発明の範囲内に入ると考える。

【0051】

本発明のT-bet DNAの天然対立遺伝子変種に相当する核酸分子は、ヒトDNA、またはその一部分を、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下の標準ハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとして、本明細書中に開示するT-bet核酸分子へのこれらの相同性に基づいて単離できる。従って、別の態様では、本発明の単離された核酸分子は、高ストリンジェンシー条件下で、配列番号1または3のヌクレオチド配列を含んでなる第二の核酸分子にハイブリダイズする。好ましくは、高ストリンジェンシー条件下で、配列番号1または3の配列にハイブリダイズする本発明の単離された核酸分子である。一つの態様では、このような核酸分子は、長さが少なくとも約700、800、900、1000、1200、1300、1400、1500または1600ヌクレオチドである。他の態様では、このような核酸分子は、配列番号1の連続したヌクレオチド少なくとも約700、800、900、1000、1200、1300、1400、1500または1600個、または配列番号3の連続したヌクレオチド少なくとも約500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、または1500個を含んでなる。好ましくは、単離された核酸分子は、T-bet核酸分子の天然に存在する対立遺伝子変種に相当する。

【0052】

集団内に存在してもよいT-bet配列の天然に存在する対立遺伝子変種に加えて、熟練者は、配列番号1または3のヌクレオチド配列内へ突然変異により小さい変化が導入され、これによりT-betタンパク質の機能的活性を変化することなくコードするタンパク質のアミノ酸配列内に変化をもたらしてもよいことをさらに認めるであろう。例えば、「非-必須」アミノ酸残基におけるアミノ酸置換に導くヌクレオチド置換は、配列番号1または3内で起きてもよい。「非-必須」アミノ酸残基は、T-betの機能的活性、例えばDNAと相互作用するその能力またはIFN-プロモーターからの転写を促進するその能力を変化することなく、T-betの野生型配列(例えば配列番号1または3の配列)から変化され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸は残基は、機能的活性のために必要である。

【0053】

従って、本発明の他の態様は、T-bet活性に必須でないアミノ酸残基内に変化を含むT-betタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなT-betタンパク質は、配列番号2または4からのアミノ酸配列とは異なるがしかしT-bet活性は保持する。T-betタンパク質の非-天然変種をコードする単離された核酸分子は、配列番号1または3のヌクレオチド配列内への1個またはそれ以上のヌクレオチド置換の導入、

10

20

30

40

50

付加または除去により創成され、例えば1個またはそれ以上のアミノ酸置換、付加または除去はコードされたタンパク質内への導入される。突然変異は、標準技術、例えば部位特異的突然変異誘発およびPCR-媒介変異誘発により配列番号1または3内に導入できる。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、1個またはそれ以上の非-必須アミノ酸残基に行われる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似した側鎖を有するアミノ酸残基により置換されることである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野では規定されており、これには塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β -分枝側鎖（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。従って、T - b e t 内の非-必須アミノ酸残基は、好ましくは同じ側鎖ファミリー内の他のアミノ酸残基により置換される。

【0054】

あるいは、別の態様では、突然変異は、T - b e t コード領域の全体または一部分に沿ってランダムに、例えば飽和変異誘発により導入でき、そしてもたらされた変異体は、機能的活性を保持している変異体を同定するために、DNAおよび/または活性転写体へ結合するその能力に関してスクリーニングできる。変異誘発に続き、コードされたT - b e t 変異タンパク質は宿主細胞内に組換え的に発現でき、そして変異タンパク質の機能的活性は、T - b e t 活性をアッセイするための当該技術分野で利用できるアッセイを用いて決定できる（例えばDNA中に存在するT - b o x 結合要素へ結合するタンパク質の能力の測定により、またはT細胞内のTh1またはTh2表現型を調節するタンパク質の能力を測定することによる）。

【0055】

本発明の別の態様は、T - b e t mRNAまたは遺伝子のコーディング鎖に対してアンチセンスである単離された核酸分子に関する。本発明のアンチセンス核酸は、全T - b e t コーディング鎖に対して、またはその一部分に対してのみ相補的であることができる。一つの態様では、アンチセンス核酸分子は、タンパク質のT - b e t ファミリーに独特であるかまたは特定の種からのT - b e t 配列に独特である、T - b e t をコードする核酸配列のコーディング鎖のコード領域に対してアンチセンスである。別の態様では、アンチセンス核酸分子は、タンパク質のT - b e t ファミリーに独特であるかまたは特定の種からのT - b e t 配列に独特である、T - b e t をコードするヌクレオチド配列のコーディング鎖の非コード領域に対してアンチセンスである。好ましい態様では、本発明のアンチセンス分子は、配列番号1の非コーディング鎖の連続したヌクレオチドを少なくとも約700個、さらに好ましくは、配列番号1の非コーディング鎖の連続したヌクレオチドの少なくとも800、1000、1200、1400、または1600個、または配列番号3の非コーディング鎖の連続したヌクレオチドを少なくとも約500個、さらに好ましくは、配列番号3の非コーディング鎖の連続したヌクレオチドを少なくとも600、800、1000、1200、または1400個を含んでなる。

【0056】

本明細書中で開示するT - b e t をコードするコーディング鎖配列（例えば配列番号1および3）を与えると、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickの塩基対規則に従って設計できる。アンチセンス核酸分子は、T - b e t mRNAの全コード領域に相補的であってもよく、あるいはT - b e t mRNAのコードまたは非コード領域の一部分のみにアンチセンスであるオリゴヌクレオチドであることもできる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T - b e t mRNAの翻訳開始部位の周囲の領域に相補的であってもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば長さ約15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチドであることができる。本発明のアンチセンス核酸は、当該技術分野では公知の方法を用いて化学合成および酵素連結

10

20

30

40

50

反応を用いて構築できる。例えば、アンチセンス核酸（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチドを用いて化学的に合成でき、または分子の生物学的安定性を増加するためまたはアンチセンスとセンス核酸の間に形成される二本鎖の物理的安定性を増加するために設計された種々の変性ヌクレオチド、例えばホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用できる。あるいは、アンチセンス核酸は、その中に核酸がアンチセンス方向にサブクローンされている発現ベクターを用いて生物学的に産生できる（すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、関係する標的核酸にアンチセンス方向であり、これは以下にさらに記述する）。

【0057】

他の態様では、本発明のアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、一本鎖核酸、例えばこれらが相補領域を有するmRNAを開裂できるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。T-bet-コード化核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示するT-bet遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計できる。例えば、テトラヒメナ（*Tetrahymena*）L-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位の塩基配列がT-betをコードするmRNA内の開裂される塩基配列に相補的であるものの中で構築できる。例えば、Cech et al., 米国特許（US）第4,987,071号およびCech et al., 米国特許（US）第5,116,742号参照。あるいは、T-bet mRNAは、RNA分子のプールからの特異性リボヌクレアーゼ活性を有する触媒生RNAを選択するために使用できる。例えば、Bartel, D. and Szostak, J. W., (1993) *Science* 261:1411-1418参照。

【0058】

本発明のさらに別の態様は、T-bet融合タンパク質をコードする単離された核酸分子に関する。非-T-betタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする第二ヌクレオチド配列に操作可能に連結するT-betタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする少なくとも1個の第一ヌクレオチド配列を含んでなるこのような核酸分子は、標準の組換えDNA技術により調製できる。T-bet融合タンパク質は、以下のサブセクションIII中にさらに記述される。

【0059】

III. 組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明の別の態様は、T-bet（またはその一部分）をコードする核酸を含むベクター、好ましくは組換え発現ベクターに関する。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内の核酸の発現に適する形にある本発明の核酸を含んでなり、これは、組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択され、発現される核酸配列に操作可能に連結する1個またはそれ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「操作可能に連結」とは、関係するヌクレオチド配列が、調節配列に対してヌクレオチド配列の発現を許容する様式で連結していることを意味すると考える（例えば、生体外転写/翻訳系内またはベクターが宿主細胞内に導入された場合の宿主細胞内）。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよびその他の発現制御要素（例えばポリアデニル化シグナル）を含む。このような調節配列は、例えばGoeddel: *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)中に記載されている。調節配列は、多くの種類の宿主細胞内のヌクレオチド配列の構成的発現を指令するものおよびある種の宿主細胞内のみでヌクレオチド配列の発現を指令するもの（例えば組織特異性調節配列）を含む。当該技術分野の熟練者は、発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどの因子に依存することを認めるであろう。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内に導入され、これにより本明細書に記載の核酸によりコードされる融合タンパク質またはペプチドを含むタンパク質またはペプチドを産生する（例えばT-betタンパク質、T-betタンパク質の変異形、T-bet融合タンパク質など）。

【0060】

本発明の組換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞中のT - b e tタンパク質の発現のために設計できる。例えば、T - b e tは、細菌細胞、例えば大腸菌、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用い）、酵母細胞または哺乳類細胞内に発現できる。適当な宿主細胞は、Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)中にさらに考察されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えばT7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて生体外で転写および翻訳してもよい。

【0061】

原核生物内のタンパク質の発現は、大腸菌内で、融合または非 - 融合タンパク質のいずれかの発現を指令する構成的または誘導的プロモーターを含むベクターを用いて最もしばしば行われる。融合ベクターは、その中にコードされるタンパク質に多数のアミノ酸を、通常は組換えタンパク質のアミノ末端に加える。このような融合ベクターは、1種またはそれ以上の目的に役立つことができる。1)組換えタンパク質の発現を増加するため、2)組換えタンパク質の溶解度を上昇するため、3)アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することにより組換えタンパク質の精製を支援するため、4)タンパク質の検出および/または精製を支援するためのエピトープタグを提供するため、および/または5)タンパク質の検出を支援するためのマーカーを提供するため(例えば - ガラクトシダーゼ融合を用いるカラーマーカー)。しばしば、融合発現ベクター中で、タンパク質分解開裂部位が融合部分の結合部に導入されそして融合タンパク質の精製の後に組換えタンパク質に融合部分から組換えタンパク質の分裂を可能とさせる。このような酵素、およびこれらの同起原の認識配列は、Xa因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターは、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) Gene 67: 31 - 40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA)およびpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ)を含み、これらはグルタチオンS - トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質、またはタンパク質Aを標的組換えタンパク質にそれぞれ融合する。組換えタンパク質は、真核細胞内にも上記と同じ目的で融合タンパク質として発現できる。

【0062】

適当な誘導可能な非 - 融合大腸菌発現ベクターの例は、pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69: 301 - 315)およびpET11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods In Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60 - 85)を含む。pTrcベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドtrp - lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依存する。pET11dベクターからの標的遺伝子発現は、同時発現したウイルスRNAポリメラーゼ(T7gn1)により媒介されるT7gn10 - lac融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、lac UV5プロモーターの転写制御下のT7gn1遺伝子を内包する常在性プロファージからの宿主系列BL21 (DE3)またはHMS174 (DE3)により提供される。

【0063】

大腸菌内の組換えタンパク質発現を最大化するための一つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解的に開裂することに損傷された能力を有する宿主細胞内のタンパク質を発現することである(Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119 - 128)。別の戦略は、それぞれのアミノ酸に対する個別のコドンが大腸菌内に優先的に使用されるものであるように、発現ベクター内に挿入される核酸の核酸配列を変更する

10

20

30

40

50

ことである (Wada et al., (1992) Nuc. Acids Res. 20: 2111 - 2118)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準のDNA合成技術により実行できる。

【0064】

別の態様では、T-bet発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母*S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*)内の発現のためのベクターの例は、pYepSec1 (Baldari et al., (1987) EMBO J. 6: 229 - 234)、pMFA (Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30: 933 - 943)、pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54: 113 - 123)およびpYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)を含む。

10

【0065】

あるいは、T-betはバキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞内に発現できる。培養した昆虫細胞 (例えばSf9細胞)内のタンパク質の発現のために利用できるバキュロウイルスベクターは、pAcシリーズ (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156 - 2165)およびpVLシリーズ (Lucklow, V. A., and Summers, M. D., (1989) Virology 170: 31 - 39)を含む。

【0066】

さらに別の態様では、本発明の核酸は、哺乳類発現ベクターを用いて哺乳類細胞内で発現される。哺乳類発現ベクターの例は、pMex-Neol.pCDM8 (Seed, B., (1987) Nature 329: 840およびpMT2PC (Kaufman et al., (1987) EMBO J. 6: 187 - 195)を含む。哺乳類細胞内に使用された場合に、発現ベクターの制御機能はしばしばウイルス調節要素により提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス40から誘導される。

20

【0067】

他の態様では、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞タイプ内に優先的に核酸の発現を指令する能力がある (例えば組織特異性調節要素が、核酸を発現するために使用される)。組織特異性調節要素は、当該技術分野で公知である。適当な組織特異性プロモーターの非制限的な例は、リンパ系特異性プロモーター (Calame and Eaton (1988) Adv. Immunol. 43: 235 - 275)、特にT細胞受容体 (Winoto and Baltimore (1989) EMBO J. 8: 729 - 733)および免疫グロブリン (Banerji et al., (1983) Cell 33: 729 - 740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33: 741 - 748)アルブミンプロモーター (肝臓特異性; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1: 268 - 277)、ニューロン特異性プロモーター (例えば神経フィラメントプロモーター; Byrne and Ruddie (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473 - 5477)、膵臓特異性プロモーター (Edlund et al., (1985) Science 230: 912 - 916)、および乳腺特異性プロモーター (例えば乳漿プロモーター、米国特許 (IS) 第4, 873, 316号および欧州特許出願公開第264, 166号)を含む。発生的に調節されるプロモーター、例えばネズミhoxプロモーター (Kessel and Guss (1990) Science 249: 374 - 379)および - フェタンパク質プロモーター (Campes and Tilghman (1989) Gene Dev. 3: 537 - 546)も包含される。

30

40

【0068】

さらに、哺乳類細胞に使用するための誘導性調節系が、当該技術分野に公知であり、例えば遺伝子発現が重金属イオンにより調節される系 (例えばMayo et al (1989) Cell 29: 99 - 108; Brinster et al (1982) Na

50

ture 296:39-42; Searle et al (1985) Mol. Cell Biol. 5:1480-1489 参照)、熱ショック(例えばNour et al., (1991) in Heat Shock Response, ed. Nour, L., CRC Boca Raton, FL pp167-220参照)、ホルモン(例えばLee et al., (1981) Nature 294, 228-232; Haynes et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2038-2042; Klock et al., (1987) Nature 329:734-736; Israel & Kaufman (1989) Nucl. Acids Res. 17:2589-2604; およびPCT 公開番号WO93/23431号参照)、FK506-関連分子(例えばPCT 公開番号WO94/18317号参照)またはテトラサイクリン(Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551; Gossen, M. et al., (1995) Science 268:1766-1769; PCT 公開番号 WO 94/29442号および PCT 公開番号WO96/01313号)がある。従って、別の態様では、本発明はT-bet DNAが誘導可能な真核プロモーターに操作可能に連結し、これにより真核細胞内のT-betタンパク質の発現を誘導可能に発現させる組換え発現ベクターを提供する。

【0069】

本発明は、さらにアンチセンス方向に発現ベクター内にクローンされた本発明のDNA分子を含んでなる組換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、T-bet mRNAにアンチセンスであるRNA分子の発現(DNA分子の転写による)を可能とする様式で調節配列に操作可能に連結している。アンチセンス方向にクローンされた核酸に操作可能に連結する調節配列は、種々の細胞タイプ内のアンチセンスRNA、例えばウイルスプロモーターおよび/またはエンハンサーの連続発現を指令するように選択でき、または調節配列は、構成的、組織特異的または細胞タイプ特異的なアンチセンスRNA発現を指令するように選択できる。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファジミド(phagemid)または弱毒化ウイルスの形であることができ、その中でアンチセンス核酸は高効率調節領域の制御下で産生され、その活性はベクターが導入される細胞タイプにより決定できる。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の調節の考察に関しては、Weintraub, H. et al., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1 (1) 1986 参照。

【0070】

本発明の別の態様は、本発明のベクター、好ましくは組換え発現ベクターが導入された組換え宿主細胞に関する。宿主細胞は、原核または真核細胞であることができる。例えば、T-betタンパク質は、細菌細胞、例えば大腸菌、昆虫細胞、酵母または哺乳類細胞(例えばチャニーズハムスター卵巣細胞(CHO)またはCOS細胞)内で発現されてもよい。その他の適当な宿主細胞は、当該技術分野の熟練者には公知である。ベクターDNAは、原核または真核細胞内に、慣用の形質転換またはトランスフェクション技術を利用して導入できる。本明細書中に使用する場合に、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、宿主細胞内への外来核酸(例えばDNA)を導入するための当該技術分野で認められた各種の技術を呼び、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクションまたはエレクトロポレーションを含む。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションする適当な方法は、Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))、およびその他の実験用マニュアル内に見いだすことができる。

【0071】

10

20

30

40

50

哺乳類細胞の安定なトランスフェクションのために、使用する発現ベクターおよびトランスフェクション技術に応じて、細胞の小さい部分だけがそのゲノム内に外来DNAを組み込んでよいことが知られている。これらの組込物を同定および選択するために、選択可能なマーカー（例えば抗体への抵抗性）をコードする遺伝子を一般に宿主細胞内に、関係する遺伝子と同時に導入する。好ましい選択可能なマーカーは、薬剤、例えばG418、ハイグロマイシンおよびメトトレキサートに抵抗性を与えるものを含む。選択可能なマーカーをコードする核酸は、T-betをコードするものと同じベクターで宿主細胞内に導入してもよくまたは別のベクターで導入してもよい。導入された核酸を用いて安定にトランスフェクションされた細胞は、薬剤選択により同定できる（例えば選択可能なマーカー遺伝子を組み込まれた細胞は生存し、一方他の細胞は死滅する）。

10

【0072】

培養物内の本発明の宿主細胞、例えば原核または真核宿主細胞は、T-betタンパク質を産生（即ち発現）するために使用できる。従って、本発明は、さらに本発明の宿主細胞を用いるT-betタンパク質発現のための方法も提供する。一つの態様では、この方法は、T-betが産生されるまで適当な培地内で本発明の宿主細胞（その中にT-betをコードする組換え発現ベクターが導入されている）を培養することを含んでなる。別の態様では、本発明方法は、さらに培地または宿主細胞からT-betを単離することを含んでなる。その本来の形で、T-betタンパク質は細胞内タンパク質であり、従って、組換えT-betタンパク質は組換え宿主細胞内で細胞内的に発現でき、次いで例えば宿主細胞を溶解、そして溶解物から組換えT-betタンパク質を回収して宿主細胞から単離される。あるいは、組換えT-betタンパク質は、非相同シグナル配列をタンパク質のアミノ末端に、タンパク質が宿主細胞から分泌されるように操作可能に連結して細胞外タンパク質として調製できる。この場合に、組換えT-betタンパク質は、細胞が培養された培地から回収できる。

20

【0073】

本発明のある種の宿主細胞は、非-ヒトトランスジェニック動物を作製するためにも使用できる。例えば、一つの態様では、本発明の宿主細胞は、T-betコード配列が導入された受精卵母細胞または胚幹細胞である。従って、このような宿主細胞は、外因性T-bet配列がそのゲノム内に導入された非-ヒトトランスジェニック動物または内因性T-bet配列が改変された相同組換え動物を創成するために使用できる。このような動物は、T-betの機能および/または活性の研究のためおよびT-bet活性のモジュレーターの同定または評価のために有用である。従って、本発明の別の態様は、T-betタンパク質またはT-betタンパク質の一部をコードする導入遺伝子を有する細胞を含む非-ヒトトランスジェニック動物に関する。本発明のトランスジェニック動物に関する従属態様では、導入遺伝子は内因性T-betタンパク質をコードする内因性遺伝子を改変する（例えば内因性T-bet遺伝子が機能的に破壊または「ノックアウト」されたか、または内因性T-bet遺伝子のヌクレオチド配列が突然変異したかまたは内因性T-bet遺伝子の転写調節領域が改変された相同組換え動物）。

30

【0074】

本発明のトランスジェニック動物は、T-betをコードする核酸を受精した卵母細胞のオス前核内に、例えばマイクロ注入により導入し、そして卵母細胞を擬妊娠メス養育動物内に発生させて創成できる。配列番号1または3のT-betヌクレオチド配列は、導入遺伝子として非-ヒト動物のゲノム内に導入できる。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルも導入遺伝子内に含めて導入遺伝子の発現の効率を高くするために含めることができる。組織特異性調節配列は、T-bet導入遺伝子に操作可能に連結して、特定の細胞にT-betタンパク質の発現を指令することができる。胚操作およびマイクロ注入を介するトランスジェニック動物、特にマウスなどの動物を作製するための方法は、当該技術分野では慣用となっておりそして例えば、米国特許（US）第4,736,866号および第4,870,009号（共にLeder et al.）、米国特許（US）第4,873,191号（Wagner et al.）およびHogan, B., M

40

50

manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)に記載されている。同様の方法は、他のトランスジェニック動物の作製にも使用される。トランスジェニック創始 (founder) 動物は、そのゲノム内の T - bet 導入遺伝子の存在および / または動物の組織または細胞中の T - bet mRNA の発現に基づいて同定できる。次いで、トランスジェニック創始動物は、導入遺伝子を有する別の動物を育種するために使用できる。さらに、T - bet をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物にも育種できる。

【0075】

相同組換え動物を創成するために、欠失、付加または置換が導入され、これにより内因性 T - bet 遺伝子を改変、例えば機能性に破壊する T - bet 遺伝子の少なくとも一部分を含むベクターを調製する。一つの態様では、相同組換えの際に、内因性 T - bet 遺伝子が機能的に破壊される (すなわち機能性タンパク質をコードしなくなり、「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる) ように相同組換えベクターを設計する。あるいは、ベクターは、相同組換えの際に、内因性 T - bet 遺伝子が T - bet 遺伝子により置換されるように設計できる。相同組換えベクター中で、T - bet 遺伝子の改変部分は、T - bet 遺伝子の付加核酸によりその 5' および 3' 末端に近接し、相同組換えをベクターによりもたらされた外因性 T - bet 遺伝子と胚幹細胞内の内因性 T - bet 遺伝子との間に起こさせる。付加的な近接 T - bet 核酸は、内因性遺伝子との相同組換え成功のために十分な長さである。代表的には、数千塩基の近接 DNA (5' および 3' 末端の両方) がベクター内に含まれる (例えば相同組換えベクターの説明に関しては Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987) Cell 51:503 参照)。ベクターは胚幹細胞系列内に導入され (例えばエレクトロポレーションにより)、そして導入された T - bet 遺伝子が内因性 T - bet 遺伝子と相同的に組み換えられている細胞を選択する (例えば Liet al., (1992) Cell 69:915 参照)。次いで選択された細胞を動物 (例えばマウス) の胚盤胞内に注入して集合キメラを形成する (例えば Bradley, A. in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson ed. (IRL, Oxford, 1987) pp 113 - 152)。次いで、キメラ胚は、適当な疑妊娠雌養育動物内に移植され、そして胚を生育させる。生殖細胞内に相同組換え DNA を内包する後代は、動物のすべての細胞が導入遺伝子の生殖細胞系転移により相同組換え DNA を含む動物を育種するために使用できる。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築するための方法は、さらに Bradley, A. (1991) Current Opinion in Biotechnology 2:823 - 829 および PCT 国際公開番号 WO 90/11354 号 (Mouellec et al.); WO 91/01140 号 (Smithies et al.); WO 92/0968 号 (Zijlstra et al.; および WO 93/04169 号 (Berns et al.)) に記載されている。

【0076】

上記に加えて、熟練者は、相同組換えに対する当該技術分野で公知の別の方法が本発明に適用できることを認めるであろう。酵素支援部位特異性組込み系は、当該技術分野では公知でありそして第二の標的 DNA 分子内の所定の位置に DNA 分子を組み込むために適用できる。このような酵素支援組込み系の例は、Cre 組換え - lox 標的系 (例えば Baubonis, W. and Sauer, B. (1993) Nucl. Acids Res. 21:2025 - 2029; および Fukushima, S. and Sauer, B. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7905 - 7909 に記載) および FLPreコンビナーゼ - FRT 標的系 (例えば Dang, D. T. and Perrimon, N. (1992) Dev. Genet. 13:367 - 375; および Fiering, S. et al. (1993) Proc. Natl. Ac

10

20

30

40

50

ad. Sci. USA 90: 8469 - 8473に記載)を含む。テトラサイクリン調節誘導可能相同組換え系、例えばPCT公開番号WO 94 / 29442号およびPCT公開番号WO 96 / 01313号に記載のものも使用できる。

【0077】

別の態様では、トランスジェニック動物は、例えば、CD4エンハンサーを用いてT-betをすべてのT細胞内に発現するように作製できる(Zheng, W-P. & Flavell, R.A. 1997, Cell 89, 587)。最近の研究は、CD2エンハンサーも使用できることを示唆している。実際に、これはT細胞内の高レベルでの発現に一層強力であり、発現は多様ではなくそして導入遺伝子発現はコピー数依存性である(Zhumabekov, T. et al. 1995, J. Immunol. Meth. 185, 1331; Sharp, L.L. et al., 1997, Immunity 7, 609)。T-bet RNAの高レベル発現を有するマウス(導入遺伝子駆動T-bet RNAを内因性T-betと区別するためのプロンプとしてヒト成長ホルモンイントロンを使用)は、創始体の適当な数をスクリーニングして同定できる。

10

【0078】

別の方法では、ドミナントレプレッサートランスジェニックを創成できる。例えばドミナントレプレッサート-betは、T-betの融合を駆動して近位lckエンハンサーを用いて作製できる(Alberola-Ila, J. et al., 1996, J. Exp. Med. 184, 9)、そしてengrailedが作製できる(Taylor, D. 1996, Genes Dev. 10, 2732; Li, J., Thurman H. et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10885)。この構築物は、多量体化T-betレポーターのT-betトランス活性化を特異的に抑制しそしてNFAT依存性レポータートランス活性化に影響しない。

20

【0079】

あるいは、ヌル変異がES細胞内の標的変異誘発により発生できる(Ranger, A.M., et al., 1998, Nature 392, 186; Hodge, M.R., et al. 1996, Immunity 4: 1, 144; Grusby, M.J., et al., 1991, Science 253, 1417; Reimold, A.M., et al. Nature 379: 262; Kaplan, M.H., 1996, Immunity: 313; Kaplan, M.H., et al., 1996, Nature 382, 174; Smiley, S.T. et al., 1997, Science 275, 977)。例えば当該技術分野には公知の技術を用いて、ゲノムT-betクローンをゲノムライブラリーから単離し、イントロン-エキソン機構を調整し、そして第一エキソンおよびプロモーター配列の上流450bpを欠失するcre-loxベクター内の標的構築物を創成できる(下記参照)。この構築物は、ES細胞系統内にエレクトロポレートでき、そして二重薬剤抵抗性(例えばネオマイシン、ガンシクロビル)クローンがサザンブロット分析により同定できる。次いで、T-bet座内に相同組換えイベントを有するクローンを同定できそして3.5日のBALB/c妊娠マウスから得た胚盤胞内に注入した。次いでキメラマウスを作製し、そして野生型BALB/cマウスにかけ合わせて破壊されたT-bet遺伝子の生殖細胞系伝達を発生させた。

30

40

【0080】

他の態様では、RAG2-欠失胚盤胞内への移植(Chen, J., et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4528)またはcre-lox誘導可能な欠失方法が、免疫系内でT-betのみを欠失するマウス発生に使用できる。例えば、標的構築物は、cre-loxベクター内に作製できる。胚盤胞補足系をNFATc、胚致死表現型研究のために使用した(Ranger, A.M. et al., 1998, Immunity 8: 125)。この方法は、ES細胞内の両方の染色体上のT-bet遺伝子を破壊することを要求し、これは例えば、記載(Chen, J., et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 45

50

28) のようにして、変異ネオマイシン遺伝子を用いそしてES培養物内のG418の濃度を上昇することにより、またはcre-lox部位を有するneo遺伝子に近接して行うことができる。第二対立遺伝子を破壊するために、ネオマイシン遺伝子は、レコンビナーゼを用いてESクローンをトランスフェクションして欠失でき、次いでESクローンを同じ標的構築物を用いてトランスフェクションして両方の対立遺伝子上のT-bet欠失を有するクローンを選択できる。cre-レコンビナーゼを用いる第三のトランスフェクションは、所望の二重標的ES細胞を生成する。次いで、この二重標的ES細胞をRAG2胚盤胞細胞内に移植しそしてのようにして生成したキメラマウスのリンパ器官は転移したES細胞により完全にコロニー化される。これは、T-betの不在が致死を招きかねない他の臓器形質転換への影響を及ぼすことなく、リンパ系の細胞へのT-betの不在の影響の評価を可能とする。

10

【0081】

cre-lox系を用いる条件的除去法も使用できる。要約すると、除去すべきエキソンに近接するイントロン領域内にlox組換え配列を位置させた標的構築物を作製する。次いで、この構築物をES細胞中にトランスフェクションしそして変異マウスを上記のようにして作製する。次いで得られた変異マウスを、誘導可能なプロモーターにより駆動されるcreレコンビナーゼに対してトランスジェニックなマウスにかけ合わせる。creが発現されると、これは、T-bet遺伝子内に導入されたlox部位の間の組換えを誘導し、従って遺伝子機能を有効に破壊する。この方法の主要な特徴は、遺伝子破壊が、creレコンビナーゼを活性化することにより意のままに成熟動物内に導入できることである。

20

【0082】

組織特異性プロモーターは、免疫系以外の臓器内の異状を避けるために使用できる。cre発現性導入遺伝子は、誘導可能プロモーターにより駆動されてもよい。数種の誘導可能系がcre-lox組換え戦略にいまでは使用され、最も一般的にはテトラサイクリンおよびエクジソン系である。組織特異性誘導可能プロモーターは、T-betヌルマウス内に胚的致死性がある場合に使用できる。

【0083】

別の方法は、調節されたT-bet遺伝子を内包するトランスジェニックマウスの作製である(例えばテトラサイクリン・オフプロモーターの使用、例えばSt-Onge, et al, 1996, Nuc. Acid Res. 24, 3875-3877)次いでこのトランスジェニックをT-bet欠失マウスへ養育する。この方法は、正常なT-bet機能を有するマウスの創成を可能とする。テトラサイクリンは成熟マウスに投与でき、末梢T細胞内にT-bet機能の破壊を誘導し、次いでT-bet欠失の効果は時間経過により試験できる。投与の反復サイクル、次いで薬剤(テトラサイクリン)の除去は、T-bet遺伝子のオンおよびオフを意のままに変更できるようにする。

30

【0084】

III. 単離されたT-betタンパク質および抗T-bet抗体

本発明の別の態様は、単離されたT-betタンパク質に関する。好ましくは、T-betタンパク質は、配列番号1または3によりコードされるアミノ酸配列を含んでなる。別の好ましい態様では、タンパク質は配列番号2または4のアミノ酸配列を含んでなる。別の態様では、タンパク質は配列番号2または4記載のアミノ酸配列と、少なくとも60%のアミノ酸一致、さらに好ましくは70%のアミノ酸一致、さらに好ましくは80%のアミノ酸一致、その上さらに好ましくは90%または95%のアミノ酸一致を有する。

40

【0085】

別の態様では、本発明は、T-betタンパク質の単離された部分を提供する。例えば、本発明は、さらにT-boxドメインを含むT-betのアミノ末端部分を包含する。種々の態様において、このアミノ末端部分は、ヒトT-betの少なくともアミノ酸138-327またはマウスT-betの少なくともアミノ酸137-326を包含する。本発明により提供される別の単離されたT-betの部分は、チロシンリン酸化部位を包含

50

する部分である。この部分は、少なくともヒト T - b e t のアミノ酸 3 2 4 - 3 6 6 および / または 5 2 3 - 5 3 4 またはネズミ T - b e t のアミノ酸 3 2 3 - 3 3 5 または 5 1 8 - 5 2 9 を包含する。本明細書で提供するさらに別の T - b e t の単離された部分は、ヒト T - b e t のアミノ酸 4 9 8 - 5 0 1 またはネズミ T - b e t の 4 9 3 - 3 9 6 内に記載の核局在化配列を包含する部分である。

【 0 0 8 6 】

本発明の T - b e t タンパク質は、好ましくは組換え DNA 技術により産生される。例えば、タンパク質をコードする核酸分子を発現ベクター内にクローンし（以上に記載）、発現ベクターを宿主細胞内に導入し（以上に記載）そして T - b e t タンパク質を宿主細胞内に発現させる。次いで、標準のタンパク質精製技術を用いる適当な精製手順により T - b e t タンパク質を細胞から単離できる。組換え発現の別の方法では、T - b e t ポリペプチドを標準のペプチド合成技術を用いて化学的に合成できる。さらに、例えば抗 T - b e t 抗体を用いる免疫沈降により、ナイーブ T - b e t タンパク質を細胞から分離する（例えば T 細胞から）。

10

【 0 0 8 7 】

本発明は、T - b e t 融合タンパク質も提供する。本明細書に使用する場合に、T - b e t 「融合タンパク質」は、T - b e t 以外のポリペプチドに操作可能に連結した T - b e t ポリペプチドを含んでなる。「T - b e t ポリペプチド」は、T - b e t タンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチド、または T - b e t タンパク質の独特のそのペプチド断片を呼び、ここで、「T - b e t 以外のポリペプチド」は、他のタンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドを呼ぶ。融合タンパク質内で、用語「操作可能に連結」は、T - b e t ポリペプチドおよび他のポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すと考える。他のポリペプチドは、T - b e t ポリペプチドの N - 末端または C - 末端に融合してもよい。例えば、一つの態様では、融合タンパク質は、T - b e t 配列が G S T 配列の C - 末端に融合している G S T - T - b e t 融合タンパク質である。別の態様では、融合タンパク質は、T - b e t ヌクレオチド配列がベクター、例えば p C E P 4 - H A ベクター内に挿入された T - b e t - H A 融合タンパク質であり（H e r r s c h e r , R . F . e t a l . , (1 9 9 5) G e n e s D e v . 9 : 3 0 6 7 - 3 0 8 2 ）、T - b e t 配列はインフルエンザ・ヘマグルチニン・エピトープタグにインフレームで融合している。このような融合タンパク質は、組換え T - b e t の精製を容易にすることができる。

20

30

【 0 0 8 8 】

好ましくは、本発明の T - b e t 融合タンパク質は、標準の組換え DNA 技術により産生される。例えば、種々のポリペプチド配列をコードする DNA 断片を慣用の方法に従い、例えば結合のための平滑終止または段階的（s t a g e r e d）終止末端、適当な末端を得るための制限酵素消化、希望しない結合を避けるための適当なアルカリ性ホスファターゼ処置としての付着末端の充填、および酵素結合を用いてインフレームで一緒に結合する。別の態様では、融合遺伝子は、自動化 DNA 合成装置を含む慣用の技術により合成できる。あるいは、遺伝子断片の PCR 増幅は、2 この連続断片の間の相補的オーバーハングを発生させるアンカープライマーを用いて行うことができ、これはその後アニールしそして再度増幅してキメラ遺伝子配列を作製できる（例えば C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , e d s . A u s b e l e t a l . , J o h n W i l e y & S o n s , 1 9 9 2 参照）。さらに、すでに融合部分をコードした多数の発現ベクターが市販により入手可能である（例えば G S T ポリペプチドまたは H A エピトープタグ）。T - b e t コード核酸は、融合部分を T - b e t タンパク質にインフレームで連結するようにこのような発現ベクター内にクローンができる。

40

【 0 0 8 9 】

単離された T - b e t タンパク質またはその断片は、ポリクローナルおよびモノクローナル調製のための標準方法を用いて、T - b e t に特異的に結合する抗体を産生させるた

50

めの免疫原として使用できる。T - b e t タンパク質は、抗体産生に使用できる。例えば、ポリクローナル抗血清は、ラビット内で免疫原として全長組換え細菌産生 T - b e t を用いて産生できる。この同じ免疫原は、マウスを免疫化しそして免疫化されたマウスから脾臓細胞を取り出すことによる m A b を産生するために使用できる。T - b e t に対する免疫反応を備えたマウスからの脾臓細胞は、ミエローマ細胞、例えば S P 2 / O - A g 1 4 ミエローマに融合できる。後記の実施例に記載のように、この方法は、T - b e t に結合するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製するために使用された。

【 0 0 9 0 】

あるいは、T - b e t の抗原ペプチド断片は免疫原として使用できる。T - b e t の抗原ペプチド断片は、代表的には配列番号 2 または 4 記載のアミノ酸配列の少なくとも 8 アミノ酸残基を含んでなり、そしてペプチドに対して発生した抗体が T - b e t と特異性免疫複合体を形成するように T - b e t のエピトープを包含する。好ましくは、抗原ペプチドは少なくともアミノ酸残基 1 0 個を含んでなり、さらに好ましくは少なくともアミノ酸残基 1 5 個を含んでなり、その上さらに好ましくは少なくともアミノ酸残基 2 0 個を含んでなり、そして最も好ましくは少なくともアミノ酸残基 3 0 個を含んでなる。抗原ペプチドに包含される好ましいエピトープは、タンパク質の表面、例えば親水性領域上に位置し、そして T - b e t に独特である T - b e t の領域である。一つの態様では、このようなエピトープは、一つの種、例えばマウスまたはヒトからの T - b e t タンパク質に対して特異的であることができる（すなわち、種間では保存されない T - b e t の領域を有する抗原性ペプチドが免疫原として使用される。このような保存されない残基は、本明細書中に記載のような整列を用いて決定できる）。T - b e t タンパク質の標準疎水性分析は、親水性領域を同定するために行うことができる。

【 0 0 9 1 】

T - b e t 免疫原は、代表的には、適当な対象体（例えばラビット、ヤギ、マウスまたはその他の哺乳類）を免疫原を用いて免疫化して抗体を調製するために使用される。適当な免疫原調製物は、例えば、組換え的に発現した T - b e t タンパク質または化学的に合成した T - b e t ペプチドを含むことができる。調製物は、さらにアジュバント、例えばフロイントの完全または不完全アジュバント、または類似の免疫刺激性薬剤を含むことができる。免疫原性 T - b e t 調製物を用いる適当な対象体の免疫化は、ポリクローナル抗 T - b e t 抗体反応を誘発する。

【 0 0 9 2 】

従って、本発明の別の態様は、抗 T - b e t 抗体に関する。ポリクローナル抗 T - b e t 抗体は、上記のようにして、適当な対象体を T - b e t 免疫原を用いて免疫化して調製できる。免疫化された対象体中の抗 T - b e t 抗体力価は、標準技術、例えば免疫化 T - b e t を用いる酵素免疫測定法（E L I S A）により時間に対して測定できる。希望する場合には、T - b e t に対抗する抗体分子は、哺乳類から（例えば血液から）単離しそしてさらに周知の方法、例えばタンパク質 A クロマトグラフィーにより精製して I g G 画分を得ることができる。免疫化から適当な時間において、例えば抗 T - b e t 抗体力価が最高になった時点で、抗体産生細胞が対象体から得られそして標準の方法、例えば K o h l e r a n d M i l s t e i n (1 9 7 5 , N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7) により最初に記述されたハイブリドーマ技術（B r o w n e t a l (1 9 8 1) J . I m m u n o l . 1 2 7 : 5 3 9 - 4 6 ; B r o w e n e t a l . , (1 9 8 0) J . B i o l . C h e m . 2 5 5 : 4 9 8 0 - 8 3 ; Y e h e t a l . (1 9 7 6) P N A S 7 6 : 2 9 2 7 - 3 1 ; および Y e h e t a l . (1 9 8 2) I n t J . C a n c e r 2 9 : 2 6 9 - 7 5 も参照）、さらに最近ではヒト B 細胞ハイブリドーマ技術（K o z b o r e t a l . (1 9 8 3) I m m u n o l . T o d a y 4 : 7 2)、E B V - ハイブリドーマ技術（C o l e e t a l . (1 9 8 5)、M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d C a n c e r T h e r a p y , A l a n R . L i s s , I n c . p p 7 7 - 9 6）またはトリオーマ技術によりモノクローナル抗体を調製するために使用される。モノクローナル抗体ハイブリドーマ産生のための技術

10

20

30

40

50

は周知である（一般的には、R. H. Kenneth, in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp. New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54: 387 - 402; M. L. Gelfer et al. (1977) *Somatic Cell Genet.*, 3: 231 - 36 参照)。要約すると、不死細胞系統（代表的にはミエローマ）を、上記のようにしてT - bet 免疫原を用いて免疫化した哺乳類からのリンパ細胞（代表的には脾細胞）に融合させ、そして得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、T - bet に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定する。

10

【0093】

リンパ細胞よび不死細胞系統の融合に対して使用した周知の多数のプロトコールのいずれも、抗T - betモノクローナル抗体を産生する目的で適用できる（例えばG. Galfre et al., (1997) *Nature* 266: 55052; Gelfer et al., *Somatic Cell Genet.* 以上に引用; Lerner, *Yale J. Biol. Med.* 以上に引用、Kenneth, *Monoclonal antibodies*, 以上に引用も参照）。さらに、通常の技術者は、有用な多数のこのような方法の変形が存在することを認めるであろう。代表的には、不死細胞系統（例えばニエローマ細胞系統）は、リンパ細胞と同じ哺乳類種から誘導される。例えば、ネズミハイブリドーマは、本発明の免疫原調製物を用いて免疫化したマウスからのリンパ細胞を、不死化マウス細胞系統と融合して作製できる。好ましい不死細胞系統は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地（「HAT培地」）に感受性であるマウスミエローマ細胞系統である。多数のミエローマ細胞系統のいずれも、標準方法に従う融合相手として使用してもよく、例えばP3 - NS1 / 1 - Ag4 - 1、P3 - x63 - Ag8 . 653またはSp2 / O - Ag14ミエローマ系統である。これらのミエローマ系統は、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md) から入手できる。代表的には、HAT感受性マウスミエローマ細胞を、ポリエチレングリコール（「PEG」）を用いてマウス脾細胞に融合する。次いで、融合からもたらされたハイブリドーマ細胞を、非融合および非産生性に融合されたミエローマ細胞を殺すHAT培地を用いて選択する（非融合脾細胞は、これらが形質転換されていないので数日後に死滅する）。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば標準ELISA法を用いて、T - bet を結合する抗体に関してハイブリドーマ培養上清をスクリーニングして検出される。

20

30

【0094】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製する代わりに、モノクローナル抗T - bet抗体が、組換えコンビナトリアル（combinatorial）免疫グロブリンライブラリー（例えば抗体ファージ表示（display）ライブラリー）をT - betを用いてスクリーニングして、これによりT - bet を結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離することにより固定および単離できる。ファージ表示ライブラリーを作製およびスクリーニングするためのキットは、市場で入手できる（例えばPharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27 - 9400 - 1; およびStratagene SurfZAPTM Phage Display Kit、カタログ番号240612）。さらに、抗体表示ライブラリーの作製およびスクリーニングに使用するための特に適する方法および試薬の例は、例えば下記から見いだすことができる。Ladner et al.: 米国特許（US）第5, 223, 409号; Kang et al. 国際出願番号WO 92 / 18619号; Dower et al. 国際出願番号WO 91 / 17271号; Winter et al. 国際出願番号WO 92 / 20791号; Markland et al. 国際出願番号WO 92 / 15679号; Breitling et al. 国際出願番号WO 93 / 01288号; McCafferty et al. 国際出願番号WO

40

50

92/01047号; Garrard et al. 国際出願番号WO 92/09690号; Ladner et al. 国際出願番号WO 90/02809号; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse et al., (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *PNSA* 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbes et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982; および McCafferty et al. *Nature* (1990) 348:552-554.

【0095】

さらに、ヒトおよび非-ヒト部分を含んでなり、標準組換えDNA技術を用いて作製できる組換え抗T-bet抗体、例えばキメラ性および人体適応モノクローナル抗体は、本発明の範囲内である。このようなキメラ性および人体適応モノクローナル抗体は、当該技術分野で公知の組換えDNA技術により産生でき、例えば下記の方法を用いる。 Robinson et al. 国際出願番号PCT/US86/02269号; Akira et al. 欧州特許出願184,187号; Taniguchi M. 欧州特許出願172,496号; Morrison et al. 欧州特許出願173,494号; Neuberger et al. PCT出願 WO 86/01533号; Cabilly et al. 米国特許(US)4,816,567号; Cabilly et al. 欧州特許出願125,023号; Butter et al. (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu et al. (1987) *PNAS* 84:3439-3443; Liu et al. (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al. (1987) *PNAS* 84:214-218; Nishimura et al. (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-449; および Shaw et al. (1988) *J. Natl Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison S.L. *Science* 229:1202-1207; Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter 米国特許(US)5,225,539号; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534; および Beidler et al., (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

【0096】

抗T-bet抗体(例えばモノクローナル抗体)は、標準技術、例えばアフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降法によりT-betを単離するために使用できる。抗T-bet抗体は、細胞からの本来のT-betおよび宿主細胞内で発現された組換え産生T-betの精製を容易にすることができる。さらに、抗T-bet抗体は、T-betタンパク質を検出するために使用できる(例えば細胞溶解物または細胞上清中)。検出は、抗体を検出可能な物質にカプリング(物理的連結)すると容易になるであろう。従って、一つの態様では、本発明の抗T-bet抗体は、検出可能な物質により標識される。検出可能な物質の例は、種々の酵素、接合分子族、蛍光性物質、発光性物質および放射性物質を含む。適当な酵素の例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含む、適当な接合分子族複合体の例は、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含む。適当な蛍光性物質の例はウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシ

アナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン・フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンを含む、発光性物質の例は、ルミノールを含み、そして適当な放射性物質の例は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H を含む。

【0097】

本発明のさらに別の態様は、

(a) 動物を免疫原性 T - b e t タンパク質、または T - b e t タンパク質に独特なその免疫原部分を用いて免疫化し、そして

(b) T - b e t タンパク質に特異的に結合した動物抗体から単離することを含んでなる方法により得られる抗 T - b e t 抗体に関する。

【0098】

特異性抗 T - b e t 抗体の免疫化および回収の方法は、別途記載する。

【0099】

IV . 薬剤組成物

本発明の T - b e t モジュレーター（例えば、T - b e t 核酸分子、タンパク質、抗体、または T - b e t 活性のモジュレーターとして同定された化合物を含む T - b e t 阻害または刺激剤）は、投与に適する薬剤組成物内に組み込むことができる。このような組成物は、代表的には、調節剤および薬剂的に許容できるキャリアーを含んでなる。本明細書中に使用する場合に、用語「薬剂的に許容できるキャリアー」は、薬剤投与に適合するあらゆる溶剤、分散媒体、被覆、抗細菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むと考える。薬剂的に活性の物質に対するこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野では周知である。あらゆる慣用の媒体または薬剤が活性化合物と非適合である場合を除いて、組成物中でのこれらの使用を考える。補足的活性化合物を組成物内に混和してもよい。

【0100】

本発明の薬剤組成物は、意図するその投与経路に適合するように調剤される。例えば、非経口、皮内、または皮下適用のために使用される液剤または懸濁剤は、下記の成分を含むことができる：滅菌した希釈剤、例えば注射用の水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、ポリプロピレングリコールまたはその他の合成溶剤、抗細菌剤、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン、抗酸化剤、例えばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム、キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸、緩衝液、例えばアセテート、サイトレートまたはホスフェートおよび毒性の調節のための薬剤、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロース。pH は酸または塩基、例えば塩化水素酸または水酸化ナトリウムを用いて調整できる。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または反復使用の調剤バイアル内に収容してもよい。

【0101】

注射使用に適する薬剤組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液または滅菌した注射用液または分散液の即時調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与のために適するキャリアーは、生理食塩水、静菌水、クレモフォル E L ^{T M} (C r e m o p h o r E L . , B A S F , P a r s i p p a n y , N J) またはリン酸緩衝塩水 (P B S) を含む。すべての場合に、組成物は滅菌されそして容易な注射性となる範囲で液状でなければならない。これは製造および貯蔵の条件下で安定でなければならない。キャリアーは、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど）、および適合するこれらの混合物を含む溶剤または分散媒体であることができる。適当な液体状態は、例えばコーティング例えばレシチンの使用により、分散液の場合に要求される粒径の維持によりおよび界面活性剤の使用により維持できる。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどの使用により達成できる。多くの場合に、等張剤、例えば糖類、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化などを組成物内に含むと好ましい。注射用組成物の長時間の吸収は、吸収を遅延させる

10

20

30

40

50

薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物内に含めてもたすことができる。

【0102】

滅菌した注射用液剤は、適当な溶剤中の所要量の活性化合物を必要に応じて以上に列記した成分の1種または組み合わせを混和し、次いで濾過滅菌して調製できる。一般に、分散液は、塩基性分散媒体を含む滅菌ビヒクルおよび以上に列挙したもののから所要のその他成分中に活性化合物を混和して調製できる。滅菌注射用液剤の調製のための滅菌粉末の場合に、好ましい調製方法は、有効成分の粉末およびあらかじめ滅菌濾過したこれらの溶液からの追加の所望の成分が得られる真空乾燥および凍結乾燥である。

【0103】

経口組成物は、一般に不活性希釈剤または食用に適するキャリアーを含む。これらはゼラチンカプセル内に封入または錠剤内に圧縮されることができる。経口治療投与の目的で、活性化合物は賦形剤と混和しそして錠剤、トローチ、またはカプセルの形で使用される。経口組成物は、口内洗浄剤として使用するために液体キャリアーを使用して調製でき、その際、液体キャリアー内の化合物は経口で適用されそしてガラガラとしそして吐き出すかまたは呑み込む。薬剂的に適する結合剤、および/またはアジュバント物質を組成物の一部分として含むことができる。錠剤、ピル、カプセル、トローチ等は、下記の成分、または同様な性質の化合物のいずれも含むことができる：結合剤、例えばマイクロクリスタリンセルロース、トラガントガムまたはゼラチン、賦形剤、例えばデンプンまたはラクトース、崩壊剤、例えばアルギン酸、プリモゲル(Primogel)、またはトウモロコシデンプン、潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウムまたはステロート(Sterote)、滑り剤例えばコロイド状二酸化ケイ素、甘味剤例えばスクロースまたはサッカリン、または調味剤例えばペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ風味。

【0104】

一つの態様では、活性化合物は、化合物の体内からの早期の排出を防止するキャリアーを用いて、例えば移植およびマイクロカプセル投与系も含む制御放出調剤として調製される。生分解性、生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水酸、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ酪酸が使用できる。このような調剤の製造方法は、当該技術分野の熟練者には明らかである。材料はAlza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc から入手できる。リポソーム懸濁液(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染された細胞を標的としたリポソームを含む)も、薬剂的に許容できるキャリアーとして使用できる。これらは当該技術分野の熟練者には公知の方法、例えば米国特許(US)第4,522,811号に記載の方法に従って調製してもよい。

【0105】

V. 本発明の方法

本発明の別の態様は、本発明の種々のT-bet組成物を使用する方法に関する。例えば、本発明は、生物学的試料中のT-bet活性の存在を検出するための方法を提供する。この方法は、生物学的試料をT-bet活性検出可能な薬剤、例えばT-betタンパク質またはT-bet mRNAと、生物学的試料中のT-bet活性の存在を検出できるように接触させることを含む。

【0106】

T-bet mRNAを検出するための好ましい薬剤は、T-bet mRNAに特異的にハイブリダイズできる標識された核酸プローブである。核酸プローブは、例えば配列番号1または3のT-bet DNA、例えば長さが少なくとも約500、600、800、900、1000、1200、1400、または1600ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドでありそしてストリンジェント条件下でT-bet mRNAに特異的にハイブリダイズするものであることができる。

【0107】

T-betタンパク質を検出するための好ましい薬剤は、T-betタンパク質を結合

10

20

30

40

50

できる標識された抗体である。抗体は、ポリクローナル、またはさらに好ましくはモノクローナルであることができる。変化していない抗体、またはその断片（例えばFabまたはF(ab')₂）が使用できる。プローブまたは抗体に関連する用語「標識」は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリング（すなわち物理的に連結）することによるプローブまたは抗体の直接標識、ならびに直接標識された他の薬剤との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を包含すると考える。間接標識の例は、蛍光標識二次抗体を用いる一次抗体の検出および蛍光標識したストレプトアビジンを用いて検出できるようなビオチンを用いるDNAプローブの末端標識を含む。用語「生物学的試料」は、組織、細胞および生物学的液体を含むと考える。例えば、Tbet mRNAを検出するための技術は、ノーザンハイブリダイゼーションおよびin situ ハイブリダイゼーションを含む。Tbetタンパク質の検出のための技術は、酵素連結免疫吸着剤アッセイ（ELISA）、ウエスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光を含む。

10

【0108】

このようなアッセイは、発育不全により特徴付けられる症候群の検出に有用である。例えば、ヒトT-box遺伝子TBX5およびTBX3内（マウスTbx5およびTbx3のオルソログ）の突然変異が、それぞれ常染色体優性遺伝性疾患ホールト-オーラム（Holt-Ooram）症候群および尺骨-乳腺症候群の原因である（Bamshad, M. et al., 1997, Nature Genetics 16:311; Basson, C.T., et al., 1997, Nature Genetics 15:30; Li, Q.Y., et al., 1997, Nature Genetics 15:21; Spranger, S., et al., 1997, J. Med. Genet. 3:978）。これらの症候群は、発育不全により特徴付けられ、そしてそれぞれTbx5およびTbx3の発現のパターンにより予想される。ホールト-オーラム症候群は、心臓および上肢に影響し、一方尺骨-乳腺症候群は手足、アポクリン腺、歯および生殖器発育に影響する。両方の症候群も発育不全が特徴であり、そしてそれぞれTbx5およびTbx3の発現のパターンにより予想される。これらの患者内の突然変異は、T-box遺伝子のただ1個の対立遺伝子のみが関係し、従って、Tbx3およびTbx5のハプロタイプ不全（haploinsufficiency）は、がこれら2種の疾患を起こすと考えられる。最近、発生中のヒヨコ胚へのTbx4およびTbx5の供給が肢芽体を制御することが証明された（Rodriguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999）。これらの発見は、脊椎動物発生におけるこのファミリーの重要性を強調する。

20

30

【0109】

さらに、多くの種内でのT遺伝子相同性の存在は、中胚葉発生に関係するまだ未知の標的遺伝子の組を調節する転写因子としてのその機能に対する強い証拠を提供する。T-boxファミリーの最近の突出は、種々の発生過程におけるその明瞭な重要性から起きたものであり、ヒト疾患におけるT-box突然変異により最も劇的に例示される。胸腺幹細胞からの成熟T細胞およびナイーブ前駆体から分化したTh細胞の発生は、緊密に調節された発生過程として考えられている。TbetがTh1系統の発生に関係するというこの発見は、リンパ系におけるこの最新のT-boxファミリーメンバーの重要な役割を証明する。

40

【0110】

本発明は、さらに、Tbetタンパク質の活性を調節する化合物を同定するための方法を提供する。例えば、本発明は、

Tbetタンパク質を含んでなる指標組成物を調製し、
指標組成物を供試化合物と接触させ、そして

指標組成物内のTbetタンパク質の活性に対する供試化合物の作用を決定し、これによりTbetタンパク質の活性を調節する化合物を同定することを含んでなる、Tbetタンパク質の活性を調節する化合物を同定する方法を提供する。

【0111】

50

本発明のスクリーニング法の特定の態様は、DNAに結合する（例えばIL-2またはIFN-プロモーターに結合する能力）、および/または遺伝子発現を調節する（例えばTh1関連サイトカイン遺伝子の発現を、例えばIL-2遺伝子を抑制、IFN-遺伝子をトランス活性化して調節）および/または極性化合物Th2細胞をTh1経路に転向するためのT-betタンパク質の能力を利用する。

【0112】

本発明スクリーニングアッセイの好ましい態様では、指標組成物は指標細胞を含んでなりここで該指標細胞は、(i) T-betタンパク質および(ii) T-betタンパク質に反応するレポーター遺伝子を含んでなる。好ましくは、指標細胞は、

i) T-betをコードする組換え発現ベクター、および

ii) レポーター遺伝子に操作可能に連結したTh1-関連サイトカイン遺伝子の調節配列を含んでなるベクター

を含み、そして該方法は、

a) 指標細胞を供試化合物と接触させ、

b) 供試化合物の存在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルを決定し、そして

c) 供試化合物の存在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルを供試化合物の不在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルと比較し、これによりT-betの活性を調節する化合物を同定する

ことを含んでなる。

【0113】

別の好ましい態様では、指標組成物は、(i) T-betタンパク質、および(ii) T-betが結合するDNA分子の調製を含んでなり、そして該方法は、

a) 指標組成物を供試化合物と接触させ、

b) 供試化合物の存在下でのT-betタンパク質とDNA分子との相互作用の程度を決定し、そして

c) 供試化合物の存在下でのT-betとDNA分子との相互作用の程度を供試化合物の不在下でのT-betとDNA分子との相互作用の程度と比較し、これによりT-betの活性を調節する化合物を同定する

ことを含んでなる。

【0114】

好ましくは、T-betが結合するDNA分子は、T-box結合配列を含んでなる。

【0115】

別の好ましい態様では、本方法はT-betと相互作用するタンパク質を同定する。この態様では、

指標組成物は、指標細胞が

i) 転写調節配列に操作可能に連結したレポーター遺伝子、および

ii) 第一融合タンパク質をコードする第一キメラ遺伝子を含んでなり、該第一融合タンパク質はT-betを含む

指標細胞であり、

供試化合物は第二キメラ遺伝子のライブラリーを含んでなり、該ライブラリーは第二融合タンパク質をコードし、

レポーター遺伝子の発現は、第一融合タンパク質、第二融合タンパク質および転写調節配列の間の相互作用に感受性であり、そして

ここで指標組成物内のT-betに対する供試化合物の作用が、指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルを決定することにより決定され、これによりT-betと相互作用するタンパク質を含んでなる供試化合物を同定する。

【0116】

好ましい態様では、第二キメラ遺伝子のライブラリーは、Th2細胞からのcDNAライブラリーから調製される。

【0117】

本発明のスクリーニングアッセイの好ましい態様では、供試化合物が T - b e t の活性を調節すると同定された場合に、免疫反応に対する供試化合物の作用を次いで試験する。従って、本発明のスクリーニング法は、免疫反応に対する化合物の作用を決定し、これにより免疫反応を調節する化合物を同定することをさらに含んでなるおとができる。一つの態様では、免疫反応に対する化合物の作用は、T h 1 - 関連サイトカイン遺伝子、例えばインターフェロン - 遺伝子の発現に対する化合物の作用を決定して決定される。本明細書中に使用する場合に、用語「T h 1 - 関連サイトカイン」は、T h 2 細胞ではなくむしろ T h 1 細胞により優先的または独占的に産生されるサイトカインを呼ぶと考える。T h 1 - 関連サイトカインの例は、I F N - 、I L - 2、およびリンホトキシン (L T) を含む。別の態様では、免疫反応に対する関係する化合物の作用は、T ヘルパータイプ 1 (T h 1) または T ヘルパータイプ 2 (T h 2) 細胞の発現に対する化合物の作用を決定して決定される。

10

【0118】

指標細胞内の T - b e t の発現のために使用できる組換え発現ベクターは、当該技術分野では公知である (上記の考察参照) 。一つの態様では、発現ベクター内で、T - b e t コーディング配列は、指標細胞内の T - b e t の構成的発現を許容する調節配列に操作可能に連結する (例えばウイルス調節配列、例えばサイトメガロウイルスプロモーター / エンハンサーが使用できる) 。指標細胞内の T - b e t の構成的発現を許容する組換え発現ベクターの使用が、T - b e t の活性を促進または阻害する化合物の同定のために好ましい。別の態様では、発現ベクター内で、T - b e t コーディング配列は、内因性 T - b e t 遺伝子の調節配列に操作可能に連結する (すなわち内因性 T - b e t 遺伝子から誘導されたプロモーター調節領域) 。T - b e t 発現が内因性調節配列により制御される組換え発現ベクターの使用が、T - b e t の転写発現を促進または阻害する化合物の同定のために好ましい。

20

【0119】

T h 1 - 関連サイトカイン遺伝子が使用される方法 (例えばレポーター遺伝子として) において、好ましくは T h 1 - 関連サイトカインはインターフェロン - または I L - 2 である。例えば、I L - 2 プロモーターは、M F B 部位の 5 ' の - 2 4 0 ~ - 2 2 0 程度にある T - b o x 結合部位を明らかにする。下記の実施例に記載するように、T - b e t は、I L - 2 プロモーターに結合するその能力に基づいて酵母ワンハイブリッドスクリーニングアッセイで単離される。したがって、一つの態様では、本発明の方法は、近位 I L - 2 プロモーターのこの領域、最も好ましくは、I L - 2 プロモーターのヌクレオチド - 2 4 0 ~ - 2 2 0 を含むレポーター遺伝子構築物を利用する。

30

【0120】

種々のレポーター遺伝子が当該技術分野で公知でありそして本発明のスクリーニングアッセイでの使用に適合する。適合するレポーター遺伝子の例は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはルシフェラーゼをコードするものを含む。これらの遺伝子産物の活性を測定するための標準方法は、当該技術分野では公知である。

40

【0121】

種々の細胞タイプがスクリーニングアッセイにおける指標細胞としての使用に適合する。好ましくは、通常は T - b e t を発現しない細胞系統、例えば B 細胞または T h 2 細胞クローンが使用される。非リンパ細胞系統、例えば H e p G 2 ヘパトーマ細胞系統も指標細胞として使用できる。酵母細胞も指標細胞として使用できる。

【0122】

一つの態様では、供試化合物の存在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルは、供試化合物の不在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルよりも高くそして供試化合物は T - b e t の発現または活性を刺激する化合物として同定される。別の態様では、供試化合物の存在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルは、

50

供試化合物の不在下での指標細胞内のレポーター遺伝子の発現のレベルよりも低く、そして供試化合物は T - b e t の発現または活性を阻害する化合物として同定される。

【 0 1 2 3 】

レポーター遺伝子構築物の使用の代わりに、T - b e t の発現または活性を調節する化合物が他の「読み取り (r e a d - o u t) 」を用いて同定できる。例えば、指標細胞は T - b e t 発現ベクターを用いてトランスフェクションでき、供試化合物の存在および不在でインキュベーションされ、そして T h 1 - 関連サイトカイン産生は指標細胞内のサイトカイン m R N A (例えばインターフェロン - m R N A) または培地上清内へのサイトカイン分泌 (例えばインターフェロン -) を検出して評価できる。サイトカイン m R N A を検出するための標準方法、例えば逆転写 - ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) は

10

【 0 1 2 4 】

以上に記載のように、本発明は、T - b e t と相互作用するタンパク質 (例えば T h 1 細胞内のタンパク質) を同定するためのスクリーニングアッセイを提供する。

【 0 1 2 5 】

一つの態様では、このようなアッセイは、当該技術分野では公知のツーハイブリッドアッセイ (相互作用トラップアッセイとも呼ばれる) に基づいて設計できる (例えば F i e l d 米国特許 (U S) 第 5 , 2 8 3 , 1 7 3 号 ; Z e r v o s e t a l . (1 9 9 3) C e l l 7 2 : 2 2 3 - 2 3 2 ; M a d u r a e t a l . (1 9 9 3) J . B i o l . C h e m . 2 6 8 : 1 2 0 4 6 - 1 2 0 5 4 ; B a r t e l e t a l . (1 9 9 3) B i o t e c h n i q u e s 1 4 : 9 2 0 - 9 2 4 ; および I w a b u c h i e t a l . (1 9 9 3) O n c o g e n e 8 : 1 6 9 3 - 1 6 9 6 参照) 。 ツーハイブリッドアッセイは、一般に特定の標的タンパク質と相互作用するタンパク質を同定するために使用される。このアッセイは、機能性転写活性化物質を再構築する相互作用が可能なタンパク質を同定するために遺伝子融合を利用する。転写活性化物質は、DNA 結合ドメインおよび転写活性化ドメインから成り、ここで両方のドメインは標的配列から下流側の遺伝子を転写を活性化することを要求される (例えば G A L 4 に対する上流活性化物質配列 (U S A)) 。 標的「餌 (b a i t) 」タンパク質をコードする DNA 配列がこれらのドメインのいずれかに DNA 融合されそして配列のライブラリーは他のドメインに融合される。標的 - 融合タンパク質 (例えば標的 G A L 4 - 融合「餌」) に結合できる「魚 (f i s h) 」融合タンパク質 (融合ライブラリーから作製) は、一般に二つのドメイン (DNA 結合ドメインおよび転写活性化ドメイン) を標的配列から下流に挿入されたレポーター遺伝子の転写を活性化するために十分近位に持ってくる。従って「魚」タンパク質は、機能性転写活性化物質を再構築するその能力により同定できる (例えば機能性 G A L 4 トランス活性化物質) 。

20

30

【 0 1 2 6 】

この一般的なツー - ハイブリッド系は、標的 T - b e t 融合タンパク質 (例えば「餌」としての T - b e t / G A L 4 結合ドメイン融合物) の構築により T - b e t と相互作用する細胞 (例えば T h 1 細胞) 内のタンパク質および「魚」融合タンパク質の c D N A ライブラリー (例えば c D N A / G A L 4) 活性化ドメインライブラリー) の同定に適用でき、ここで c D N A ライブラリーは関係する細胞タイプ (例えば T h 1 細胞) の m R N A から調製でき、そしてこれらの構築物を、T - b e t に反応する調節配列 (例えば I L - 2 プロモーター配列、例えば以上に考察) に連結するレポーター遺伝子構築物も含む宿主細胞内に導入する。好ましくは、T - b e t のトランス活性化ドメイン (これは 5 ' および 3 ' の両方に位置する) は、「餌」構築物内に欠失するであろう。好ましい態様では、餌構築物は、T - b o x ドメインを含む。一つの態様では、チロシンリン酸化の少なくとも一つの部位も含まれる。優性陰性 T - b e t タンパク質も、相互作用に必要な T - b e t の部位をさらに定位するために相互作用物質のスクリーニングに使用できる。T - b e t と相互作用するタンパク質をコードする c D N A は、レポーター遺伝子構築物のトラン

40

50

ス活性化に基づいて同定できる。

【0127】

あるいは、「シングル-ハイブリッド」アッセイ、例えば Sieweke, M. H. et al. (1996) Cell 85: 49-60 記載のものは、T-bet と相互作用するタンパク質を同定するために使用できる。このアッセイは、上記のツーハイブリッド系の変形である。この系では、「餌」は、トランス活性化ドメインが除去された転写因子（例えばトランス活性化ドメインが除去された T-bet）であり、そして「魚」は、非融合 cDNA ライブラリーである（例えば Th1 細胞から調製した cDNA ライブラリー）。これらの構築物は、T-bet に反応する調節配列（例えば T-box 結合領域、例えば T-bet に反応する IL-2 プロモーターの領域）に連結されたレポーター遺伝子構築物も含む宿主細胞（例えば酵母細胞）内に導入される。T-bet と相互作用するタンパク質をコードする cDNA は、レポーター遺伝子構築物のトランス活性化に基づいて同定できる。

10

【0128】

別の態様では、T-bet 標的遺伝子を単離するための代表差異分析 (representational differential analysis) (RDA) およびマイクロチップ (microchip) DNA アレイ分析がある。例えば、PCR と組み合わせた差異ディスプレイまたは差し引き法 (RDA: 例えば Hubank, M. % Schatz, D. G., 1994, Nuc. Acid Res. 22, 5640-5648; Chang Y. et al., 1994, Science 266: 1865; von Stein O. D. et al., 1997, Nuc. Acid Res. 25. 2598; Lisitsyn, N. & Wigler, M., 1993, Science 259, 946 参照) は差し引きまた非差し引きプローブを用い、または最近では、DNA マイクロチップアレイハイブリダイゼーション (Welford et al., 1998, Nucl. Acid. Res. 15: 3059) が使用できる。このようなアッセイを行う場合に、種々の細胞、例えば正常細胞、T-bet を発現するように操作された細胞、または T-bet 欠失または T-bet 過剰発現のマウス（例えばトランスジェニック非-ヒト動物）からの細胞も使用できる。

20

【0129】

上記のように、本発明は、T-bet と T-box 結合領域（例えば IL-2 遺伝子調節領域）の相互作用を調節する化合物を同定するためのスクリーニングアッセイを提供する。DNA 結合タンパク質と標的 DNA 配列の相互作用を検出するアッセイは当該技術分野で公知である（例えば電気泳動移動度シフトアッセイ、DNA アーゼイフットプリントアッセイなど）。供試化合物の存在または不在におけるこのアッセイを行う場合に、これらのアッセイは、DNA 結合タンパク質とその標的 DNA 配列との相互作用を調節（例えば阻害または促進）する化合物を同定するために使用できる。

30

【0130】

一つの態様では、供試化合物の存在下での DNA 断片への T-bet の結合の量は、供試化合物の不在下での DNA 断片への T-bet の結合の量より大きく、その場合に供試化合物は T-bet の結合を促進する化合物として同定される。別の態様では、供試化合物の存在下での DNA 断片への T-bet の結合の量は、供試化合物の不在下での DNA 断片への T-bet の結合の量より小さく、その場合に供試化合物は T-bet の結合を阻害する化合物として同定される。

40

【0131】

本発明のさらの別の態様は、細胞内の T-bet 活性を調節方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、細胞内の T-bet 活性が調節されるように T-bet 活性を調節する薬剤と接触させることを含む。この薬剤は、細胞内の T-bet タンパク質の活性の調節により、または T-bet 遺伝子の転写または T-bet mRNA の翻訳の調節により作用してもよい。本明細書中に使用する場合に、用語「調節」は、T-bet 活性を阻害または低下および T-bet 活性を刺激または増進することを含むと考える。従って、一

50

つの態様では、薬剤は T - b e t 活性を阻害する。別の態様では、薬剤は T - b e t 活性を刺激する。

【 0 1 3 2 】

さらに別の態様では、本発明は、細胞による T ヘルパー - タイプ 2 および T ヘルパー - タイプ 1 サイトカインの量の調節のための方法を提供する。この方法は、細胞を、 T - b e t の活性を調節する薬剤と接触させることを含む。例えば、 T - b e t 活性を刺激する薬剤は、 T h 1 サイトカイン I F N - を上昇制御し、一方、これらの同じ薬剤は、 T h 2 サイトカイン I L - 4 を下降制御する。

【 0 1 3 3 】

別の態様では、本発明は細胞により産生されるサイトカインのパターンを調節するための方法を提供する。本方法は、細胞を T - b e t の活性を調節する薬剤と接触させることを含む。例えば、 T - b e t 活性を刺激する薬剤は、通常は I F N - を産生しない細胞内で I F N - 産生を誘導でき、そして I L - 4 産生を抑制できる。このような薬剤は、例えば T h 2 のサイトカイン分泌プロファイルを T h 1 細胞のものに転向するために使用できる。

【 0 1 3 4 】

A . 阻害剤

本発明の調節方法に従って、 T - b e t 活性は、細胞を阻害剤と接触させることにより細胞内で阻害される。本発明の阻害剤は、例えば T - b e t の発現または活性を阻害するように作用する細胞内結合分子であることができる。本明細書内に使用する場合に、用語「細胞内結合分子」は、タンパク質自体、タンパク質またはタンパク質をコードする核酸（例えば m R N A 分子に）またはタンパク質が通常相互作用する標的に（例えば T - b e t が結合する D N A 標的配列に）結合することによりタンパク質の発現または活性を阻害するように細胞内で作用する分子を含むと考える。細胞内結合分子の例は、以下にさらに詳細に記述するが、アンチセンス T - b e t 核酸分子（例えば T - b e t m R N A の翻訳を阻害する）、細胞内抗 T - b e t 抗体（例えば T - b e t タンパク質の活性を阻害）および T - b e t タンパク質の優性陰性変異体を含む。

【 0 1 3 5 】

一つの態様では、本発明の阻害剤は、 T - b e t をコードする遺伝子または該遺伝子の一部分に相補的なアンチセンス核酸分子、または該アンチセンス核酸分子をコードする組換え発現ベクターである。細胞内の特定のタンパク質の発現を下降制御するためのアンチセンス核酸の使用は、当該技術分野で周知である（例えば We i n t r a u b , H . e t a l . , 「遺伝子分析のための分子的道具としてのアンチセンス R N A 」 R e v i e w s - T r e n d s i n G e n e t i c s , V o l . 1 (1) 1 9 8 6 ; A s k a r i , F . K . a n d M c D o n n e l , W . M . (1 9 9 6) N . E n g . J . M e d . 3 3 4 : 3 1 6 - 3 1 8 ; B e n n e t t , M . R . a n d S c h w a r t z , S . M . (1 9 9 5) C i r c u l a t i o n 9 2 : 1 9 8 1 - 1 9 9 3 ; M e r c o l a , D . a n d C o h e n , J . S . (1 9 9 5) C a n c e r G e n e T h e r . 2 : 4 7 - 5 9 ; R o s s i , J . J . (1 9 9 5) B r . M e d . B u l l . 5 1 : 2 1 7 - 2 2 5 ; W a g n e r , R . W . (1 9 9 4) N a t u r e 3 7 2 : 3 3 3 - 3 3 5) 。アンチセンス核酸分子は、他の核酸分子（例えば m R N A 配列）のコーディング鎖に相補的であり、従って他の核酸分子のコーディング鎖に水素結合が可能であるヌクレオチド配列を含んでなる。 m R N A の配列に相補的なアンチセンス配列は、 m R N A のコード領域内に見られる配列、 m R N A の 5 ' または 3 ' 非翻訳領域またはコード領域と非翻訳領域とを架橋する領域（例えば 5 ' 非翻訳領域とコード領域との結合部分）に相補的であることができる。さらに、アンチセンス核酸は、 m R N A をコードする遺伝子の調節領域への配列、例えば転写開始配列または調節要素に相補的であることができる。好ましくは、アンチセンス核酸は、コーディング鎖上の開始コドンの前またはそれを含む領域または m R N A の 3 ' 非翻訳領域に相補的であるように設計される。細胞内で T - b e t タンパク質の発現を阻害するためのアンチセンス核酸は、 T - b e t タンパク質をコードする

10

20

30

40

50

核酸配列（例えば配列番号1または3）に基づいて設計し、WatsonおよびCrickの塩基対法則に従って構築できる。

【0136】

アンチセンス核酸は、種々の異なる形で存在できる。例えば、アンチセンス核酸は、T-bet遺伝子の一部分に対してのみ相補的であるオリゴヌクレオチドであることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当該技術分野では公知の化学合成法を用いて構築できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、天然に存在するヌクレオチドまたは分子の生物学的安定性を上昇するためまたはアンチセンスとセンス核酸の間に形成された二本鎖の物理的安定性を上昇させるために設計された種々の変性ヌクレオチドを用いて化学的に合成でき、例えばホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用

10

【0137】

あるいはアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクローンされた発現ベクターを用いて生物学的に産生できる（すなわち挿入された核酸から転写された核酸は、関係する標的核酸に対してアンチセンス方向となるであろう）。関係する細胞内のアンチセンスRNA分子の発現を指令し、アンチセンス方向にクローンされた核酸に操作可能に連結した調節配列が選択でき、例えば、アンチセンスRNAの発現を構成的、組織特異的または誘導可能に指令するプロモーターおよび/またはエンハンサーまたはその他の調節配列が選択できる。例えば、アンチセンスRNAの誘導可能な発現のために、誘導可能な真核調節系、例えばTet系（例えばGossen, M. and Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) Science 268: 1766-1769; PCT公開番号WO94/29442号およびPCT公開番号WO96/01313号に記載）が使用できる。アンチセンス発現ベクターは、組換え発現ベクターに関して以上に記載したようにして調製できるが、しかし、cDNA（またはそのタンパク質）はアンチセンス方向にベクター中にクローンされる。アンチセンス発現ベクターは、例えば組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形であることができる。アンチセンス発現ベクターは、標準のトランスフェクション技術、例えば組換え発現ベクター

20

30

【0138】

別の態様では、阻害剤として使用するためのアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、これらが相補領域を有する一本鎖核酸、例えばmRNAを開裂できるリボヌクレオチドを有する触媒性RNA分子である（リボザイムに関する総説としては、例えばOhkawa, J. et al. (1995) J. Biochem. 118: 251-258; Sigurdsson, S. T. and Eckstein, F. (1995) Trends Biotechnol. 13: 286-289; Rossi, J. J., (1995) Trends Biotechnol. 13: 301-306; Kiehn, M. et al. (1995) J. Mol. Med. 73: 65-71参照）。T-bet mRNAに特異性を有するリボザイムは、T-bet cDNAのヌクレオチド配列に基づいて設計できる。例えば、テトラヒメナL-19IVS RNAの誘導体は、活性部位の塩基配列が、T-bet mRNA内で開裂される塩基配列に相補的であるように構築できる。例えば米国特許（US）第4,987,071号および第5,116,742号（両方共にChech et al.）参照。あるいはT-bet mRNAは、RNA分子のプールから特異性リボヌクレオチド活性を有する触媒生RNAを選択するために使用できる。例えばBarthel, D. and Szostak, J. W. (1993) Science 261: 1411-1418参照。

40

【0139】

細胞内のT-betの発現および/または活性を阻害するために使用できる阻害剤の別

50

の種類は、T - b e t タンパク質に特異的な細胞内抗体である。細胞内のタンパク質機能を阻害するための細胞内抗体の使用は当該技術分野では公知である（例えば Carlson J. R. (1988) *Mol. Cell Biol.* 8: 2638 - 2646; Biocca S. et al. (1990) *EMBO J.* 9: 101 - 108; Werg e T. M. (1990) et al., *FEBS Letters* 274: 193 - 198; Carlson J. R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7427 - 7428; Marasco W. A. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7889 - 7893; Biocca S. et al. (1994) *Bio/Technology* 12: 396 - 399; Chen, S - Y. et al. (1994) *Human Gene Ther* 5: 595 - 601; Duan, L. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5075 - 5079; Chen, S - Y. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5932 - 5936; Beerli, R. R. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 23931 - 23936; Beerli, R. R. et al. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 666 - 672; M hashilkar, A. M. et al. (1995) *EMBO J.* 14: 1542 - 1551; Richardson, J. H. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3137 - 3141; PCT公開番号WO94/02610 (Marasco et al.); およびPCT公開番号WO95/03832 (Duan et al.) 参照)。

【0140】

細胞内抗体を用いてタンパク質活性を阻害するために、細胞内へのベクターの導入の際に、抗体鎖が細胞の細胞内コンパートメント内の機能性抗体として発現されるような形の抗体鎖をコードする組換え発現ベクターを調製する。本発明の阻害方法に従うT - b e t 活性の阻害のために、T - b e t タンパク質を特異的に結合する細胞内抗体を細胞の細胞質内に発現する。細胞内抗体発現ベクターを調製するために、関係する標的タンパク質、例えばT - b e t に対して特異的な抗体鎖をコードする抗体軽鎖および重鎖cDNAを、代表的にはT - b e t タンパク質に対して特異的なモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマから単離する。抗T - b e t モノクローナル抗体、または組換え抗 - T - b e t モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマは、上記のようにして産生できる。T - b e t タンパク質に対して特異的なモノクローナル抗体が同定されると（例えばハイブリドーマ誘導モノクローナル抗体またはコンビナトリアルライブラリーからの組換え抗体）、モノクローナル抗体の軽鎖および重鎖をコードするDNAは、標準の分子生物学技術により単離される。ハイブリドーマ誘導抗体に対して、軽鎖および重鎖DNAは、例えばPCR増幅またはcDNAライブラリースクリーニングにより得ることができる。例えばファージ表示ライブラリーからの組換え抗体に対して、軽鎖および重鎖をコードするDNAは、ライブラリースクリーニング過程の間に単離された表示パッケージ（例えばファージ）から回収できる。それからPCRプライマーまたはcDNAライブラリープローブが調製できる抗体軽鎖および重鎖遺伝子のヌクレオチド配列は、当該技術分野では公知である。例えば、多数のこのような配列は、Kab at, E. a. et al., (1990) 「免疫学で関係するタンパク質の配列」 (*Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91 - 3242*) および「Vbase」ヒト - 生殖細胞系配列データベースに公開されている。

【0141】

一旦入手されると、抗体軽鎖および重鎖配列は、標準方法を用いて組換え発現ベクター内にクローンされる。軽鎖および重鎖の細胞質発現を可能とするために、軽鎖および重鎖の疎水性リーダーをコードするヌクレオチド配列を除去する。細胞内抗体発現ベクターは

、種々の異なる形の中の一つとして細胞内抗体をコードできる。例えば、一つの態様では、ベクターは全長抗体が細胞内に発現されるように、全長抗体軽鎖および重鎖をコードする。別の態様では、ベクターは全長軽鎖はコードするがしかしFab断片が細胞内に発現されるように、重鎖のVH/CH1領域のみをコードする。最も好ましい態様では、一本鎖抗体(scFv)をコードし、ここで、軽鎖および重鎖の変動領域がフレキシブルなペプチドリンカー(例えば(Gly₄ Ser)₃)により連結されそして一本鎖分子として発現される。細胞内のT-bet活性を阻害するために、T-bet細胞内抗体をコードする発現ベクターを、以下に記載する標準トランスフェクション方法により細胞内に導入する。

【0142】

本発明の阻害剤のさらに別の形は、本明細書内で優性陰性阻害剤とも呼ばれるT-betの阻害形、例えばチロシンリン酸化部位が変異されているT-betの形、または例えばトランス活性化ドメインが除去されているT-betの変異形である。このような優性陰性T-betタンパク質は、T-betタンパク質をコードする組換え発現ベクターを用いて細胞内に発現でき、これは標準トランスフェクション法により細胞内に導入される。T-bet欠失チロシンリン酸化部位またはトランス活性化ドメインの変異形を発現するために、T-betのトランス活性化ドメインをコードするヌクレオチド配列を、標準組換えDNA技術を用いてT-betコード配列から変異または除去する。末端切除DNAを組換え発現ベクター内に挿入し、次いでこれを細胞内に導入し、細胞内でT-betの改変された形の発現を可能とする。

【0143】

T-betタンパク質の活性を阻害するために使用できる他の阻害剤は、T-bet活性を直接阻害するかまたはT-betと標的DNAまたは他のタンパク質との間の相互作用を阻害する化学化合物である。このような化合物は、このような化合物を選択するスクリーニングアッセイを用いて同定でき、以上に記載されている。

【0144】

B. 刺激剤

本発明の調節方法に従って、T-bet活性は刺激剤と細胞とを接触させて細胞内で刺激される。このような刺激剤の例は、活性T-betタンパク質および細胞内でのT-bet活性を上昇させるように細胞内に導入されるT-betをコードする核酸分子を含む。好ましい刺激剤は、T-betタンパク質をコードする核酸分子であり、ここで核酸分子は、細胞内の活性T-betタンパク質の発現のために適する形で細胞内に導入される。細胞内でT-betタンパク質を発現するために、代表的には、T-betをコードするDNAを、本明細書中に記載するように標準分子生物学技術を用いて最初に組換え発現ベクター内に導入する。T-betコードDNAは、例えばT-betヌクレオチド配列に基づくプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いる増幅により得ることができる。T-betコードDNAの単離または増幅に続いて、DNA断片を発現ベクター内に導入しそして本明細書中に記載する標準方法により標的細胞内にトランスフェクションする。

【0145】

T-betタンパク質の活性を刺激するために使用できる他の刺激剤は、細胞内のT-bet活性を刺激する化学化合物、例えばT-betタンパク質を直接刺激する化合物およびT-betと標的DNAまたは他のタンパク質との間の相互作用を促進する化合物である。このような化合物は、以上に詳細に記載したような化合物を選択するスクリーニングアッセイを用いて同定できる。

【0146】

本発明の調節方法は、生体外(例えば細胞を薬剤と一緒に培養するかまたは培地中の細胞内へ薬剤を導入することにより)、あるいは、生体内(例えば対象体に薬剤を投与するかまたは対象体の細胞内に薬剤を、例えば遺伝子治療により導入することにより)で行うことができる。生体外で調節方法を実施するために、細胞を対象体から標準方法により入

10

20

30

40

50

手しそして本発明の調節剤を用いて生体外でインキュベーション（すなわち培養）して細胞内の T - b e t 活性を調節できる。例えば、末梢血液単球（P B M C）を対象体から入手しそして密度勾配遠心分離、例えばフィコル/ハイパック（F i c o l l / H y p a q u e）により単離できる。特異性細胞集団は、標準法を用いて除去または濃縮できる。例えば、T細胞は、例えばT細胞表面マーカーに対する抗体を用いる正の選択、例えば細胞を特異性一次モノクローナル抗体（m A b）と一緒にインキュベーションし、次いで一次 m A b を結合する二次抗体を用いて被覆した磁気ビーズを用いて m A b を結合する細胞の単離により濃縮できる。特異性細胞集団は、標準方法による蛍光活性化細胞選別により単離できる。希望する場合には、本発明の調節剤を用いて生体外で処理された細胞は、対象体に再投与できる。対象体に投与するために、対象体に投与する前に細胞から培地内の残留薬剤を最初に除去することが好ましい。これは、例えば細胞のフィコル/ハイパック勾配遠心分離により行うことができる。細胞の生体外遺伝子モディフィケーションおよび引き続いての対象体への再投与のこれ以上の考察は、米国特許第 5 , 3 9 9 , 3 4 6 号（W . F . A n d e r s o n e t a l）参照。

10

【0147】

対象体内の生体内調節方法を実行するために、調節剤は、対象体の細胞内の T - b e t 活性が調節されるように対象体に投与できる。用語「対象体」は、免疫反応を誘発できる生体を含むと考える。好ましい対象体は哺乳類である。対象体の例は、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ヤギおよびヒツジである。

20

【0148】

核酸（T - b e t タンパク質、アンチセンス RNA、細胞内抗体または優性陰性阻害剤をコードする組換え発現ベクターを含む）を含んでなる刺激または阻害剤に対して、薬剤は、生体内の細胞内へ核酸（例えば DNA）を導入するための当該技術分野では公知の方法を用いて対象体の細胞内へ導入できる。このような方法の例は、非ウイルスおよびウイルス法を含み、下記を含む。

【0149】

直接注入：裸の DNA は、DNA を細胞内への直接注入して生体内細胞内に導入できる（例えば A c s a d i e t a l . (1 9 9 1) N a t u r e 3 3 2 : 8 1 5 - 8 1 8 ; W o l f f e t a l . (1 9 9 0) S c i e n c e 2 4 7 : 1 4 6 5 - 1 4 6 8 参照）。例えば DNA を細胞内へ生体内で注入するための投与装置（例えば「ジーンガン（g e n e g u n）」）が使用できる。このような装置は、市場で入手できる（例えば B i o R a d から）。

30

【0150】

カチオン性脂質：裸の DNA は、DNA をカチオン性脂質と複合するかまたは DNA をカチオン性リポソーム内にカプセル化して生体内細胞内に導入できる。適当なカチオン性脂質製剤の例は、N - { - 1 - (2 , 3 - ジオレオイルオキシ)プロピル} N , N , N - トリエチルアンモニウム・クロリド（D O T M A）および 1 , 2 - ミリスチルオキシ - プロピル - 3 - ジメチルヒドロキシエチルアンモニウム・プロミド（D M R I E）とジオレオイル・ホスファチジルエタノールアミン（D O P E）との 1 : 1 モル比を含む（例えば L o g a n , J . J . e t a l . (1 9 9 5) G e n e T h e r a p y 2 : 3 8 - 4 9 ; S a n H . e t a l . (1 9 9 3) H u m a n G e n e T h e r a p y 4 : 7 8 1 - 7 8 8 参照）。

40

【0151】

受容体 - 媒介 DNA 取り込み：裸の DNA は、DNA をカチオン、例えば細胞表面受容体に対するリガンドとカプリングするポリリシンに複合して生体内で細胞に導入することもできる（例えば W u , G a n d W u , C . H . (1 9 8 8) J . B i o l . C h e m . 2 6 3 : 1 4 6 2 1 ; W i l s o n e t a l . (1 9 9 2) J . B i o l . C h e m . 2 6 7 : 9 6 3 - 9 6 7 ; および米国特許（U S）第 5 , 1 6 6 , 3 2 0 号参照）DNA - リガンド複合体の受容体への結合は、受容体 - 媒介エンドサイトーシスにより DNA の取り込みを容易にする。本来的にエンドソームを破壊するアデノウイルスキャプシ

50

ドに連結し、これにより細胞質内へ物質を放出するDNA-リガンド複合体は、細胞内リソソームによる複合体の分解を回避するために使用できる(例えばCurie et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8850; Cristiano et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2122-2126参照)。

【0152】

レトロウイルス：欠損ウイルスは、遺伝子治療目的の遺伝子転移に使用するために特性が良く知られている(総説はMiller, A. D. (1990) Blood 76:271参照)。組換えレトロウイルスは、レトロウイルスゲノム内に組み込まれた関係するヌクレオチド配列を持って構築できる。さらに、レトロウイルスゲノムの一部分を除去してレトロウイルス複製欠損を与えることができる。次いで、複製欠損レトロウイルスをピリオン内にパッケージし、これは標準技術によりヘルパーウイルスの使用を通じて標的細胞を感染するために使用できる。組換えレトロウイルス作製およびこのウイルスを用いる生体外および生体内での細胞感染のためのプロトコルは、「分子生物学の最近のプロトコル」(Current Protocols in Molecular Biology, Ausbel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989)第9.10-9.14章およびその他の標準実験マニュアル中に見いだすことができる。適当なレトロウイルスの例は、pLJ、pZIP、pWEおよびpEMであって、これらは当該技術分野の熟練者には良く特性が知られている。適当なパッケージングウイルス系統の例は、Crip、Cre、2およびAmである。レトロウイルスは、種々の遺伝子を多数の異なる細胞タイプ、上皮細胞、内皮細胞、リンパ球、筋芽細胞、肝細胞、骨髄細胞を含めて、生体外または生体内で導入するために使用される(例えばEglitis, et al. (1985) Science 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; 米国特許(US)第4,868,116号; 米国特許(US)第4,980,286号; PCT出願WO89/07136; PCT出願WO89/02468; PCT出願WO89/05345; および PCT出願WO92/07573参照)。レトロウイルスゲノム(およびこれに挿入された外来核酸)を宿主ゲノム内に組み込んで安定に核酸を細胞内に導入するために、レトロウイルスベクターは、標的細胞分裂を必要とする。従って、標的細胞の複製を刺激する必要があるであろう。

【0153】

アデノウイルス：アデノウイルスのゲノムは、これが関係する遺伝子産物をコードしそして発現するがしかし正常な溶解ウイルスライフサイクル中で複製する能力に関しては不活性化されるように操作できる。例えばBerkner et al. (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld et al. (1991) Science 252:431-434; およびRosenfeld et al. (1992) Cell 68:143-155参照。アデノウイルス株Adタイプ5dl3

24 またはその他のアデノウイルスの株（例えば Ad 2、Ad 3、Ad 7 など）から誘導される適当なアデノウイルスベクターは、当該技術分野の熟練者には周知である。組換えアデノウイルスは、これらが有効な遺伝子伝達ビヒクルであるために細胞分裂を必要とせずそして気道外皮（Rosenfeld et al. (1992)、以上に引用）、内皮細胞（Lemarchand et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6482-6486）、肝細胞（Herz and Gerard (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2812-2816）、および筋肉細胞（Quantin et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2581-2584）を含む広範囲の種々の細胞タイプに感染するために使用できるという長所を有する。さらに、導入されたアデノウイルス DNA（およびその中に含まれる外来 DNA）は、宿主細胞のゲノム内に組み込まれないでエピソームとして残り、これにより、導入された DNA が宿主ゲノム内に組み込まれる状況（例えばレトロウイルス DNA）における挿入突然変異誘発の結果として起きる可能性がある問題を回避する。さらに、外来 DNA に対するアデノウイルスゲノムの保持能力は、他の遺伝子伝達ベクターと比較して大きい（8 kb まで）（Berkner et al., 以上に引用；Haj-Ahmand and Graham (1986) J. Virol. 57:267）。現在使用されている大部分の複製 - 欠損アデノウイルスベクターは、ウイルス E1 および E3 遺伝子の全体または一部分を欠損しているが、しかしレトロウイルス遺伝物質の 80% は保持している。

10

20

30

40

50

【0154】

アデノ関連ウイルス：アデノ関連ウイルス（AAV）は、有効な複製および生産的なライフサイクルのためのヘルパーウイルスとしてアデノウイルスまたはヘルペスウイルスのような他のウイルスを必要とする、天然に存在する欠損ウイルスである（概説として Muzyszka et al. Curr. Topics in Micro. and Immunol. (1992) 158:97-129 参照）。これはまたその DNA を複製しない細胞内に組込んでよく、そして安定な組込みを高い頻度で発現する数少ないウイルスの一つである（例えば Flotte et al. (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356；Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822-3828；および McLaughlin et al. (1989) J. Virol. 62:1963-1973 参照）。AAV の 300 塩基対しか含まないベクターをパッケージングできそして組込みができる。外来性 DNA に対するスペースは、約 4.5 kb に限られる。Tratschin et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5:3251-3260 により記載されたような AAV ベクターは、DNA を細胞内に導入するために使用できる。種々の核酸が AAV ベクターを用いて種々の細胞タイプ内に導入された（例えば Hermonat et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470；Tratschin et al. (1985) Mol. Cell Biol. 4:2072-2081；Wondisford et al. (1988) Mol. Endocrinol. 2:32-39；Tratschin et al. (1984) J. Virol. 51:611-619；および Flotte et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:3781-3790 参照）。

【0155】

特定の発現ベクター系の効力および細胞内に核酸を導入する方法は、当該技術分野で日常的に使用されている標準の方法により評価できる。例えば、細胞内に導入される DNA は、フィルターハイブリダイゼーション技術（例えばサザンブロッティング）で検出でき、そして導入された DNA の転写により産生された RNA は、例えばノーザンブロッティング、RNA ーゼ保護または逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により検出できる。遺伝子産物は、適当なアッセイ、例えば産生されたタンパク質の免疫学的検出、例えば特異性抗体を使用する方法により、または遺伝子産物の機能的活性の免疫学的検出により検出できる。

【0156】

好ましい態様では、T - b e tをコーディングするレトロウイルス発現ベクターを生体内細胞内でのT - b e tタンパク質発現に使用し、これにより生体内のT - b e tタンパク質活性を刺激する。このようなレトロウイルスベクターは、当該技術分野では公知の標準方法に従って調製できる（考察は上記参照）。

【0157】

調節剤、例えば化学的化合物は、対象体に薬剤組成物として投与できる。このような組成物は、代表的には調節剤および薬剤的に許容できるキャリアーを含んでなる。本明細書中に使用する場合に、用語「薬剤的に許容できるキャリアー」は、あらゆる溶剤、分散媒体、被覆、抗細菌および抗真菌薬剤、等張剤および吸収遅延剤等を含み、薬剤投与に適するものを考える。このような媒体および薬剤の薬剤的な活性物質のための使用は、当該技術分野では周知である。活性化合物と適合しないすべての慣用の媒体または薬剤を除いて、組成物中へのこれらの使用を考える。補足の活性化合物も組成物内に混和されることができる。薬剤組成物は、上記のIV項に記載のようにして調製できる。

10

【0158】

本明細書中に記載のTh1細胞の発生、およびTh2表現型の抑制における主要な調節剤としてのT - b e tの同定は、本発明の調節方法を用いて、種々の臨床状態における細胞サブセットの選択操作を可能とする。本発明の刺激方法（すなわちT - b e t活性を増進するための刺激剤を使用する方法）は、IFN - の産生と同時にTh1反応の促進およびIL - 2およびIL - 4両方の下降制御を同時に行い、従ってTh2反応の下降調節をもたらす。反対に、本発明の阻害方法（すなわちT - b e t活性を下降調節するための抑制剤を使用する方法）は、IFN - の産生の阻害と同時にTh1反応の下降制御およびTh2反応の促進をもたらす。従って、Th1反応が有益な疾患状態を治療するためには、Th1反応を促進し一方ではTh2反応を下降制御するように本発明の刺激方法を選択する。あるいは、Th2反応が有益な疾患状態を治療するためには、Th1反応を下降制御し一方ではTh2反応を促進するように本発明の阻害方法を選択する。疾患状態の治療への本発明の方法の適用は、病状の治癒、病状に関連する症状の種類および数の減少を長期または短期のいずれかでもたらすか（すなわち病状の改善）または単に対象体に一時的な有利な作用をもたらす。

20

【0159】

優勢なTh1またはTh2タイプの反応と関連する多数の疾患状態が同定され、これらの病状を患う個体内に存在する反応の種類と同定および調節の利益を受けるであろう。本発明の免疫調節的方法のこれらの疾患への適用をさらに以下に記載する。

30

【0160】

A. アレルギー

アレルギーは、IgGを通じて媒介され、その産生は、Th2細胞およびこれにより産生されるサイトカインの活性により調節される。アレルギー反応において、IL - 4がTh2細胞により産生され、これはIgE抗体の産生およびアレルギー反応を媒介する細胞、すなわちマスト細胞および好塩基球の活性化をさらに刺激する。IL - 4は、好酸球媒介炎症反応にも重要な役割を演じる。従って、本発明の刺激方法は、病原性IgG抗体の産生を下降制御する手段として、アレルギー患者におけるTh2関連サイトカイン、特にIL - 4の産生を阻害することができる。刺激剤は、対象体に直接投与してもよく、または細胞（例えばThp細胞またはTh2細胞）を対象体から入手し、刺激剤と生体外で接触させそして対象体に再投与してもよい。さらに、ある種の状態では、アレルゲンを刺激剤または刺激剤を用いて処置した細胞と一緒に対象体に同時投与して、アレルゲン特異性反応を阻害（すなわち脱感作）すると有益である。処置は、他のTh1 - 促進剤、例えばサイトカインIL - 12またはTh2 - 関連サイトカイン（例えば抗IL - 4抗体）に対する抗体を、Th1タイプ反応をさらに刺激するために十分な量でアレルギー対象体に投与してさらに促進してもよい。

40

【0161】

50

B. ガン

Th 2 - 促進サイトカインの発現は、ガン患者内で上昇すると報告されており（例えば Yamamura, M., et al. (1993) J. Clin. Invest. 91: 1005 - 1010; PISA, P., et al. (1992) Proc Natl. Acad. Sci. USA 89: 7708 - 7712）そして悪性疾患はしばしば疾患の経過の悪化に従ってTh 1タイプ反応からTh 2タイプ反応へのシフトが関連している。従って、本発明の刺激方法は、Th 1からTh 2へのシフトに対抗して作用する手段としてガン患者内のTh 2関連サイトカインの産生を阻害し、これにより患者内で起きているTh 1反応を促進し、疾患の経過を改善するために使用できる。刺激方法は、ガンを有する対象体への刺激剤の直接投与でも、または対象体から得た細胞（例えばTh pまたはTh 2細胞）の刺激剤を用いる生体外処置および引き続いての対象体への細胞の再送達のいずれでも可能である。処置は、他のTh 1促進剤、例えばサイトカインIL - 12またはTh 2 - 関連サイトカインへの抗体（例えば抗IL - 4抗体）を、レシピエントに、Th 1タイプ反応をさらに刺激するために十分な量で投与してさらに促進してもよい。

10

【0162】

C. 感染疾患

Th 2 - 促進サイトカインの発現は、HIV感染、肺炎、リューシマニア症、住血吸虫症、糸状線虫感染および腸管線虫感染を含む種々の感染疾患の間に増加すると報告されており（例えば Shearer, G. M. and Clerici, M. (1992) Prog. Chem. Immunol. 54: 21 - 43; Clerici, M. and Shearer, G. M. (1993) Immunology Today 14: 107 - 111; Fauci, A. S. (1988) Science 239: 617 - 623; Locksley, R. M. and Scott, P. (1992) Immunoparasitology Today 1: A58 - A61; Pearce, E. J. et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 159 - 166; Grzych, J. M., et al. (1991) J. Immunol. 141: 1322 - 1327; Kullberg, M. C., et al. (1992) J. Immunol. 148: 3264 - 3270; Bancroft, A. J. et al. (1993) J. Immunol. 150: 1395 - 1402; Pearlman, E. et al. (1993) Infect. Immun. 61: 1105 - 1112; Else, K. J., et al. (1994) J. Exp. Med. 179: 347 - 351参照）、そしてこのような感染疾患は、免疫反応におけるTh 1からTh 2へのシフトと関連もしている。従って、本発明の刺激方法は、感染疾患を有する対象体内に、Th 1からTh 2へのシフトに対抗する手段として使用して、Th 2関連サイトカインの産生を阻害して、これにより患者内の進行しているTh 1反応を促進し感染の経過を改善することができる。刺激方法は、感染疾患を有する対象体への阻害剤の直接投与または対象体から得た細胞（例えばTh pまたはTh 2細胞）の刺激剤を用いる生体外処置、その後の対象体への細胞の再投与のいずれかを含むことができる。処置は、他のTh 1促進剤、例えばサイトカインIL - 2またはTh 2関連サイトカインへの抗体（例えば抗IL - 4抗体）をレシピエントへ、Th 1タイプ反応をさらに刺激するために十分な量で投与してさらに促進してもよい。

20

30

40

【0163】

D. 自己免疫疾患

本発明の阻害方法は、Th 2タイプ機能不全と関連する自己免疫疾患の処置に治療的に使用できる。多数の自己免疫疾患は、自己の組織に対して反応性でありそして失陥の病理に関するサイトカインおよび自己抗体の産生を促進するT細胞の不適当な活性化の結果である。T - ヘルパー - タイプ反応の調節は、自己免疫疾患の経過に影響することができる。例えば、実験的なアレルギー性脳脊髄炎（EAE）において、疾患の誘導期間におけるIL - 4の投与によるTh 2 - タイプ反応の刺激は、自己免疫疾患の強度を低下する（Paul, W. E., et al. (1994) Cell 76: 241 - 251）。さらに、疾患から動物の回復は、Th 2 - タイプ反応の増加と関連することが示され、これは

50

Th2 特異性サイトカインの増加により証明される (Koury, S. J., et al. (1992) J. Exp. Med. 176: 1355 - 1364)。さらに、EAE 分泌を抑制できる T 細胞は、Th2 特異性サイトカインを分泌する (Chen, C., et al. (1994) Immunity 1: 147 - 154)。EAE における Th2 タイプ反応の刺激は、疾患に対する保護作用を有するので、多発性硬化症 (EAE がこれのモデルである) を有する対象体内の Th2 反応の刺激は、治療的に有益であるらしい。本発明の阻害方法は、このような低下を起こさせるために使用できる。

【0164】

同様に、マウス内のタイプ I 糖尿病における Th2 タイプ反応の刺激は、疾患に対する保護作用を与える。実際に、IL-4 (これは Th2 反応を促進する) を用いる NOD マウスの処置は、これらのマウス内に通常は発生するタイプ I 糖尿病の発症を防止または遅延する (Rapport, M. J., et al. (1993) J. Exp. Med. 178: 87 - 99)。従って、糖尿病を患っているかまたは疑いがある対象体内の Th2 反応の刺激は、疾患の作用を改善するかまたは疾患の発症を阻害するであろう。

10

【0165】

Th2 タイプ反応が有益であるさらに別の自己免疫疾患は、リウマチ様関節炎 (RA) である。研究から、リウマチ様関節炎を有する患者は滑膜組織中に優勢な Th1 細胞を有することが示された (Simon, A. K., et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5862 - 5866)。RA を有する対象体内で Th2 反応を刺激して、有害な Th1 反応が同時に下降調節され、これにより疾患の影響を改善することができる。

20

【0166】

従って、本発明の阻害方法は、Th2 タイプ反応が疾患の経過に有益である自己免疫疾患を患っているかまたは疑いがある対象体内に Th2 - 関連サイトカインの産生を刺激するために使用できる。この阻害方法は、対象体への阻害剤の直接投与または対象体から得た細胞 (例えば Thp、Th1 細胞、B 細胞、非リンパ細胞) の生体外処置およびその後の対象体への細胞の再投与のいずれかを含むことができる。処置は、さらに他の Th2 促進剤、例えば IL-4 自体または Th1 - 関連サイトカインに対する抗体を、Th2 タイプ反応をさらに刺激するために十分な量で対象体に投与して促進してもよい。

【0167】

Th2 反応が望ましい上記の自己免疫疾患とは反対に、別の自己免疫疾患は、Th1 - タイプ反応により改善されることもある。このような疾患は、本発明の刺激剤を用いて改善できる (ガンおよび感染疾患に対する上記のように)。この処置は、Th1 - 促進サイトカイン (例えば IFN-) を対象体に Th1 - タイプ反応をさらに刺激するために十分な量で投与してさらに促進してもよい。

30

【0168】

自己免疫疾患処置のための薬剤の効力は、ヒト疾患の上記の動物モデルで試験できる (例えば多発性硬化症のモデルとしての EAE および糖尿病のモデルとしての NOD マウス) かまたは別の良く特性が知られたヒト自己免疫疾患の動物モデルで試験できる。このような動物モデルは、エリテマトーデスに対するモデルとしての mrl/lpr/lpr マウス、リウマチ様関節炎に対するモデルとしてのネズミコラーゲン誘発関節炎、およびネズミ実験重症筋無力症を含む (Pauley, Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp 840 - 856 参照)。本発明の調節 (すなわち刺激または阻害) 剤を試験動物に投与し、そして試験動物内の疾患の経過を、使用した特定のモデルに対する標準方法により監視する。調節剤の有効性は、未処置動物 (または対象薬剤で処置した動物) と比較して、薬剤を用いて処置した動物内の疾患状態の改善により明らかとなる。

40

【0169】

本発明に従って処置してもよい自己免疫疾患および自己免疫成分を有する疾患の限定的でない例は、真性糖尿病、関節炎 (リウマチ様関節炎、若年性リウマチ性関節炎、骨関節

50

炎、乾癬性関節炎を含む)、多発性硬化症、重症筋無力症、全身エリテマトーデス、自己免疫甲状腺症、皮膚炎(アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎を含む)、乾癬、シェーングレン症候群、シェーングレン症候群に従属する乾性角結膜炎を含む、円形脱毛症、節足動物咬傷反応によるアレルギー反応、クローン疾患、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、結腸炎、ゼンソク、アレルギー性ゼンソク、皮膚エリテマトーデス、強皮症、膣炎、直腸炎、薬疹、らい病拮抗反応、血節性紅斑らい。自己免疫性ぶどう膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死出血性脳障害、特発性両側進行性感覚神経性難聴、再生不全性貧血、真性赤血球貧血、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ウエグナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スチーブンス-ジョンソン症候群、特発性スプルー、偏平舌癬、クローン症、重症眼障害、サルコイドーシス、初期両側肝硬変、後部ぶどう膜炎、および間質性肺繊維症を含む。

10

【0170】

E. 移植

移植片拒絶および移植片受容は、グラフトレシピエント内の特定のT細胞サブセット(例えばTh1またはTh2細胞)の作用にのみ帰することはできないけれども(考察に関しては、Dallen, M. J. (1995) *Curr. Opin. Immunol.* 7: 632-638参照)、多数の研究は、長期間の移植片持続における優勢なTh2反応または移植片拒絶における優勢なTh2反応を示している。例えば、移植片受容はTh2サイトカインパターンの産生に関連しおよび/または移植片拒絶はTh1サイトカインパターンの産生に関連する(例えばTakeuchi, T. et al. (1992) *Transplantation* 53: 1281-1291; Tzakis, A. G. et al., (1994) *J. Pediatr. Surg.* 29: 754-756; Thai, N. L. et al. (1995) *Transplantation* 59: 274-281参照)。さらに、Th2サイトカイン表現型を有する細胞の養子移入は、皮膚移植片持続を延長し(Maeda, H. et al. (1994) *Int. Immunol.* 6, 855-862)、そして移植片体宿主病を低下する(Fowler, D. H. et al. (1994) *Blood* 84: 3540-3549; Fowler, D. H. et al. (1994) *Prog. Clin. Biol. Res.* 389: 533-540)。さらに、Th2分化を促進するIL-4の投与は、心臓同種移植片持続を延長し(Levy, A. E. and Alexander, J. W. (1995) *Transplantation* 60: 405-406)、一方、Th1分化を促進する抗IL-10抗体と組み合わせたIL-12の投与は、皮膚同種移植片拒絶を増進する(Gorzynski, R. M. et al. (1995) *Transplantation* 60: 1337-1341)。

20

30

【0171】

従って、本発明の阻害方法は、移植レシピエント内にTh2-関連サイトカインの産生を刺激して移植片持続を延長することができる。この阻害方法は、固体臓器移植および骨髄移植(例えば移植片対宿主病を阻害する)の両方に使用できる。阻害方法は、移植レシピエントに対する阻害剤の直接投与でもまたは対象体から得た細胞(例えばThp、Th1細胞、B細胞、非リンパ細胞)の阻害剤を用いる生体外処置および引き続き対象体への細胞の再投与のいずれも含むことができる。処置は、さらに他のTh2促進剤、例えばIL-4自体またはTh1-関連サイトカインに対する抗体をレシピエントに、Th2タイプ反応をさらに阻害するために十分な量で投与してさらに促進できる。

40

【0172】

上記の疾患状態に加えて、本発明の調節方法は、他の目的にも有用である。例えば、本発明の刺激方法(すなわち刺激剤を用いる方法)は、Th1促進サイトカインの商業的産生のための生体外Th1促進サイトカイン(例えばインターフェロン-)の産生を刺激するために使用できる(例えば、細胞を生体外で刺激剤と接触させてインターフェロン-産生を刺激でき、そしてインターフェロン-は培養物上清から回収でき、必要な場合にはさらに精製し、そして商業使用のために包装する)。

50

【0173】

さらに、本発明の調節方法は、対象体内の関係する抗原に対するTh1またはTh2反応のいずれかを促進するワクチン接種に適用できる。すなわち、本発明の薬剤は、Th1反応またはTh2反応のいずれかのワクチンに対する免疫反応を指令するアジュバントとして役立つことができる。例えば、関係する抗原に対する抗体反応を促進するために（すなわちワクチン接種の目的で）、抗原および本発明の阻害剤を対象体に同時投与して対象体内の抗原に対するTh2反応を促進でき、それはTh2反応が有効なB細胞ヘルプを提供しそしてIgG1産生を促進するからである。あるいは、関係する抗原に対する細胞免疫反応を促進するために、抗原および本発明の刺激剤を対象体に同時投与して対象体内の抗原に対するTh1反応を促進でき、それはTh1反応が細胞媒介免疫反応（例えば遅延した過敏性反応）の発生を有利とするからである。関係する抗原および調節剤は、単一の薬剤組成物内に一緒に、または別々の組成物内に調剤できる。好ましい態様では、関係する抗原および調節剤は、対象体に同時に投与される。あるいは、ある状況では、抗原を最初に、次いで調節剤を投与するか、または逆が望ましいこともある（例えば、本来的にTh1反応を引き起こす抗原の場合には、最初に抗原を単独で投与して反応を刺激し、次いで阻害剤を単独または抗原のブーストと一緒に投与して免疫反応をTh2反応にシフトされると有益である）。

10

【0174】

本発明は、さらに下記の実施例で説明され、これらは限定的と解釈してはならない。この明細書中に引用したすべての引用文献、特許および公開特許の内容は、引用することにより編入される。さらに、本明細書中で言及した公開データベース内に寄託されたすべてのヌクレオチドおよび核酸配列も、引用することにより編入される。

20

【0175】

pJG4-5ベクターのEcoRI部位内にクローンされたマウスT-bet cDNAを含んでなる核酸分子は、American Type Culture Collection (Manassas, VA)に1999年11月9日付けで寄託され、そして寄託番号PTA-930が割り当てられた。PCR2.1-TOPOベクター内にクローンされたヒトT-bet cDNA（ヒトTh1クローンROT-10からのRNAから調製）含んでなる核酸は、American Type Culture Collection (Manassas, VA)に2000年1月28日付けで寄託され、そして寄託番号PTA-1339が割り当てられた。両方の寄託物はブダペスト条約の規定に準拠してなされた。

30

【0176】

実施例

下記の実験手順を実施例で使用した。

マウス、細胞系統、サイトカイン、抗体およびプラスミド

BALB/cマウスは、Jackson Laboratoriesから入手し、DO11.10TcR-トランスジェニックマウス (Jacobson, N.G., et al. 1995, J. Exp. Med. 181, 1755-1762)、およびMBP TcRトランスジェニックマウス (Lafaille, J.J., 1994, Cell 78, 399-408)が記載されている。マウスは5~6週齢で使用した。細胞系統 (line) および一次細胞は、10%ウシ胎児血清 (HyClone Laboratories)、グルタミン (2 mM)、ペニシリン (50 単位/ml)、ストレプトマイシン (50 µg/ml)、Hepes (100 mM) および -ME (50 µg) を補足したRPMI 1640を含む完全培地内で維持した。JurkatはヒトTh1リンパ腫、EL4はマウスTh0胸腺腫、NK3.3はヒトNK細胞系統 (Ye, J., 1995, J. Leuko. Biol. 58. 225-233; Kornbluth, J., 1982, J. Immunol. 129. 2831-2837)、YTはヒトNK細胞系統 (Yodoi, J., 1985, J. of Immunol. 134, 1623-1630)、AE7はマウスTh1クローン、D10はマウスTh2クローンそしてM12はB細胞リン

40

50

パ腫系統である。組換えIL-4はDNA Xから入手し、ヒトrIL-2はChiron Corp.から入手した。rIL-12はHoffman La Rocheから入手し、そしてrIL-18はPeprotech Inc.から購入した。モノクローナル抗IL-12、モノクローナル抗IFN- γ およびモノクローナル抗IL-4(11B11)も使用した(Ohara, J. and Paul, W. E., 1985, Nature 315, 333-336)。ラビット内で産生したT-betポリクローナル抗血清およびmAbは両方共に全長組換え細菌産生T-betに対して作製した。mAbは、マウスからの脾細胞をSP2/O-Ag14骨髓腫(myeloma)に融合して作製してIgG1サブタイプである。発現プラスミドは、c-Maf(pMex-maf)(Ho, I-C., et al., 1996, Cell 85, 973-983)、NFATp (Hodge, M. R., et al., 1996, Immunity 4, 1-20)およびp65を含んでおり、後の2者はpCDNAベクター内にクローンした。

10

【0177】

CD4+T細胞精製および生体外培養

CD4+T細胞は、リンパ節(LN)からPE-接合抗CD4(RM4-4)(Pharmingen)を用いるフローサイトメリーにより精製しそしてFACS(MoFlo, Becton Dickinson)を用いて純度98~99%まで選別した。生体外活性化のために、 2×10^6 / mlのCD4+細胞を完全培地内に再懸濁しそしてプレート結合 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CD3(2C11)および $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CD28(Pharmingen)を用いて3日間、100単位/mlのIL2の存在下で活性化した。次いで細胞を完全培地に1:4スプリットし、そして4日間、100単位/mlのIL2の存在下で培養した。一次刺激の7日後に、細胞を採取し、2回洗浄しそして $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ プレート結合抗CD3を用いて 1×10^6 細胞/mlで1、3および6時間再刺激した。Th1およびTh2分化培養のために、非-トランスジェニックまたはDO11.10 LNおよび脾細胞をプールし、 1×10^6 細胞/ml完全培地内に再懸濁しそしてTh1($10 \text{ mg}/\text{ml}$ 抗IL4[11B11]、 $10 \text{ ng}/\text{ml}$ rIL12)またはTh2($10 \text{ mg}/\text{ml}$ 抗IFN- γ 、 $10 \text{ ng}/\text{ml}$ IL4)条件下、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ プレート結合抗CD3を用いて培養した。細胞を3日目に、完全培地+100u/ml IL2を用いて1:4スプリットした。7日目に、細胞を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CD3を用いて4時間再刺激しそしてRNA調製のために採取した(Jacobson, N. G., et al., 1995, J. Exp. Med. 181, 1755-1762)。上清を24時間目に採取しサイトカインを試験した。

20

30

【0178】

ノーザンおよびウエスタンブロット分析

全RNAを休眠から単離しそしてTRIZOL試薬(Gibco/BRI)を用いて細胞を刺激しそしてそれぞれの試料 $10 \mu\text{g}$ を1.2%アガロース6%ホルムアルデヒドゲル上で分離し、 $20 \times$ SSC中のGenescreen膜(NEN)上に一晚移行し、そしてUV Stratalink(Stratagene)を用いて共有結合した。ブロットのハイブリダイゼーションは、32P:T-bet、 β -アクチンを用いて標識した下記のcDNAプローブを用いて記載(Hodge, M. R., et al., 1996, Immunity 4, 1-20)に従って42で行った。ウエスタンブロット分析のための核および細胞質抽出物をAE7、D10およびNK3.3細胞から調製した。核を記載(Dolmetsch, R. E., et al., 1997, Nature 386, 855-858)に従って単離した。抽出したタンパク質を8%PAGEにより分離し、次いでニトロセルロース膜にエレクトロトランスファーし、そしてT-betに特異性のmAbを用いてプローブし、次いでホースラディッシュペルオキシダーゼ-接合ヤギ抗マウスIgGによりプローブしそしてメーカー(Amersham)の指定に従って化学発光を促進した。

40

【0179】

一過性トランスフェクションアッセイ

50

EL4およびJurkat細胞を、5 μgレポータープラスミドおよび5 ~ 10 μg発現プラスミドを用いてトランスフェクション当たり0.4 ml RPMI中の細胞 5×10^6 個を用いるBioRadエレクトロポレーター(280 V、975 μF)を用いてトランスフェクションした。ルシフェラーゼアッセイは、24時間後に各試料の20%内でルシフェラーゼ活性を用い、指定に従って測定した(Promega)。IFN-レポータールシフェラーゼ構築物は、全ヒトIFN-遺伝子を含むプラスミドpB9から誘導した(P. Gray and D. V. Goeddel, 1982, Nature, 298: 859)。pGL2ルシフェラーゼ遺伝子をpB9-IL-2プロモーター-レポーター構築物の第一エキソン内に挿入した。IL-4プロモーター-レポーター構築物、IL-4Luc、は、ネズミIL-4遺伝子の807 bp上流を含む。

10

【0180】

レトロウイルス構築物および形質導入

GFP-RVピシストロン性ベクターは、Phoenix-Ecoパッケージング細胞系統(Kinoshita, S. et al. 1998, Cell, 95, 595-604)を有するとして記載されている(Ouyang, W. et al, 1998, Immunity 9: 745-755)。GFP-RVベクターは、脳筋炎ウイルス内部リボソーム入口配列(IRES)およびGFP対立遺伝子をMSCV2.2レトロウイルスベクター(Ouyang, W. et al, 1998, Immunity 9: 745-755)またはIL-2-MSCVベクター内に挿入して構築した。両方のベクターは2個のcDNA、T-betおよびGFPをコードするcDNAを、IRESを使用して同時に発現しそれぞれのmRNAの翻訳を個別に開始した。パッケージング細胞系統のトランスフェクションおよび一次T細胞のレトロウイルス形質導入は、本質的に記載の通りに行った(Ouyang, W. et al, 1998, Immunity 9: 745-755)。

20

【0181】

細胞内サイトカイン染色およびFACS分析

サイトカインの細胞内染色は記載の通りに行った(Ouyang, W. et al, 1998, Immunity 9: 745-755)。指定通りの種々の期間にわたってレトロウイルスを用いて感染した一次トランスジェニックまたは非-トランスジェニックT細胞をPMA(50 ng/ml)およびイオノマイシン(1 μM)を用いて2時間刺激し、そしてブレフェルジン(Brefeldin)A 10 μg/mlをさらに2時間で加えた。

30

【0182】

実施例1. 新規の転写因子、T-betのクローニング

IL-2プロモーターのTh1-特異性領域は良く定位されているので(Brombacher, F. et al., 1994, Int. Immunol. 6: 189-197; Rooney, J., et al., 1995, Mol. Cell. Biol. 15, 6299-6310; Lederer, J. A., et al. 1994, J. Immunol. 152, 77-86; Durand, D., et al. 1988, Mol. Cell Biol. 8, 1715-1724; Hoyos, B., et al. Science 244, 457-450)、IL-2プロモーターレポーターおよびOF6 Th1クローンから作製したcDNAライブラリーを用いる酵母ワンハイブリッド法を、Th1特異性転写因子を同定するために選択した。この方法を実証するために、IL-4プロモーターのTh2特異性領域を酵母内で発現しそしてc-Mafの導入によりトランス活性化され、数種の他の転写因子(例えばNFAT)ではされないことを実証した。c-Mafトランス活性化は、c-Maf反応要素(MARE)が変異した場合には起きなかった。従って、酵母ワンハイブリッド法を使用した。

40

【0183】

EGY48酵母株をIL-2プロモーター/ヒスチジン構築物を用いて安定に組み込みそして抗-CD3活性化Th1細胞クローン、OF6から作製したcDNAライブラリーを

50

用いて形質転換した。スクリーニングした 5.6×10^6 個のクローン中、488個が一次スクリーニングで陽性であった。二次スクリーニングで試験した210個のクローン中、72個がIL-2プロモーターに特異性であることが証明された。陽性クローンの数を減らすために、我々は酵母クローンcDNAを、Th1およびTh2細胞系統内で分化的に発現したcDNAとハイブリダイズした。これらのTh1-Th2およびTh2-Th1 cDNAをClontechPCR選択キットを用いて作製し、放射能標識しそして最初にパイロット実験に使用して最も強い陽性のクローン16個をスクリーニングした。これらのクローン16個の中で、8個がTh1(PL17)特異性cDNA産物プローブと陽性であり、Th2(D10)特異性cDNA産物プローブとはそうではなかった。代表差異分析(RDA、例えばLisitsyn, 1993, Science, 259: 946; O'Neill and Sinclair, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 2681; Hubank and Schatz, 1994, Nucleic Acids Res. 22: 5640; Welford et al. 1998 Nucleic Acids Res. 26: 3059)をTh1-Th2プローブを用いて16個の陽性クローンに関し、IL-2、IFN- およびIL-4に対するプローブの対照ハイブリダイゼーションを用いて行った。Th1およびTh2差し引きcDNAプローブの特異性は、それぞれIL-2およびIFN- 対IL-4の検出により証明された。

【0184】

制限酵素分析および配列決定データは、クローンのすべて8個が関連することを明らかにした。これらは5'および3'非翻訳領域内の差異に基づいて3群に分類され、これらの群のそれぞれは独立したcDNA分子を表す。これらのクローンの配列をNCBIジーンバンク配列データベースと比較すると、転写因子のT-boxファミリーとの相同性が得られた。図1は、T-betの核酸およびアミノ酸配列を示す。

【0185】

実施例2. T-betは、T-boxファミリーメンバーT-brainおよびエオメソデルミン(eomesodermin)と相同の領域を共有する

BrachyuryまたはTは、T-boxと呼ばれる200アミノ酸DNA結合ドメインを共有する転写因子のファミリーの創始メンバーである(総説はSmith, J. 1997, Current Opinion in Genetics & Development 7, 474-480; Papaioannou, and Silver, 1998, Bioassay, 20: 9; Meisler, M.H. 1997, Mammalian Genome 8, 799-800)。Brachyury(ギリシャ語で「短尾」)突然変異は、短くて少しねじれた尾を持った異型接合動物内で、1927年に最初に記載された(Herrmann, B.G., 1990, Nature 343, 617-622)。今ではBrachyuryを含まないマウス中の8種のT-box遺伝子が存在する。これらはTbx-6、T-brain-1(Tbr-1)およびいまではT-betを含み、それぞれ明確で通常は複雑な発現パターンを有する。転写因子のT-boxファミリーは、DNA結合ドメイン内のファミリーメンバーの相同性により定義される。T-bet DNA結合ドメイン(ネズミT-betの残基138-327)は、ネズミT-brainのT-boxドメインおよびゼノブスエオメソデルミンのT-boxドメインに最も類似し、従ってT-box遺伝子ファミリーのTbr-1サブファミリー内にT-betを位置させる。ネズミT-betタンパク質のヒト同族体は、マウスT-betに約88%一致する。図1Aは、Lipman-Pearsonタンパク質整列(Gap penalty設定4およびlength penalty設定12)を用いて誘導した。類似性指数は、86.6と算出された(Gap number 2, gap length 5およびconsensus length 535)。T-betは、T-boxファミリーメンバーのT-brainおよびエオメソデルミンを相同の領域を共有する。ネズミT-bet DNA結合ドメインは、ネズミT-brainのT-boxおよびゼノブスエオメソデルミンに最も類似している。3個のT-box領域間で約69%

のアミノ酸一致がある。T - b e t は T - b o x ドメインの外では他の T - b o x ファミリーメンバーと配列相同性を持っていない。

【 0 1 8 6 】

実施例 3 . T - b e t は共通 T - b o x 部位に結合してトランス活性化しそして 5 ' および 3 ' 領域の双方をマップする機能的に重要なドメインを有する

組換え T - b e t タンパク質は、I L - 2 プロモーター内の共通 T - b o x 部位および T - b e t 部位に結合し、そして抗 - C D 3 - 刺激 A E 7 T h 1 細胞からの核抽出物内に存在する複合体は、共通 (G G G A A T T T C A C A C C T A G G T G A A A T T C C) T - b o x オリゴヌクレオチドプローブに特異的に結合する。T 細胞内の T - b e t の活性を試験するために、下記の実験を行った。J u r k a t T h 1 細胞に T - b e t とルシフェラーゼレポーター構築物とを同時トランスフェクションした。図 2 A は、共通 T - b o x 部位の 4 コピーを有するかまたは有していない最少チミジンキナーゼ (T K) プロモーターを含むルシフェラーゼレポーター構築物の J u k a t 細胞内の基底レベル (中空棒) および P M A (5 0 n g / m l) プラスイオノマイシン (1 u M) 誘発 (黒棒) プロモーター活性を示す。それぞれのレポーター構築物は、図中に示すように、空の p C D N A ベクターまたは全長 T - b e t c D N A を含む p C D N A と同時トランスフェクションされた。示したデータは、3 回の独立した実験の代表である。図 2 B は、最少 T K プロモーターを含むルシフェラーゼレポーター構築物を用いて一時的にトランスフェクションした J u r k a t 細胞および棒グラフの左側に示した T - b e t c D N A の指定領域を含む多量体化した共通 T - b o x 部位および p C D N A ベクターを示す。ルシフェラーゼ活性は、感染の 2 4 時間後に測定した。実験を 3 回反復して同じ結果を得た。得られた基底レベル (中空棒) および P M A (5 0 n g / m l) プラスイオノマイシン (1 u M) 誘発 (黒棒) プロモーター活性は、T - b e t が T 細胞内で活性であり、そしてその活性が刺激によりさらに増加できることを証明した。

10

20

【 0 1 8 7 】

実施例 4 . T 細胞内の T - b e t 発現は T h 1 サブセットに限定されそして T c R を介して伝達されるシグナルにより調節される

T - b e t を T h 1 c D N A ライブラリーから単離しそして複数の臓器のノーザンブロット分析は、肺、胸腺および末梢リンパ器官内にのみ存在する T - b e t 転写物を明らかにした。

30

【 0 1 8 8 】

図 3 A は、T - b e t がダブルネガティブ (d o u b l e n e g a t i v e) (D N) 胸腺細胞内に優先的に発現し、ダブルポジティブ (D o u b l e p o s i t i v e) (D P) およびシングルポジティブ (s i n g l e p o s i t i v e) (S P) 細胞内では発現しないことを示す。培地またはプレート結合抗 C D 3 (2 C 1 1) を用いて 6 時間処理された T h 1 細胞クローン (A E 7 および D 1 . 1) または T h 2 クローン (D 1 0 および C D C 3 5) から単離された全細胞 R N A のノーザンブロット分析は、T h 1 クローン内のみで T - b e t 転写物が明らかになった。全細胞 R N A は、培地またはプレート結合抗 C D 3 (2 C 1 1) を用いて 6 時間処理された T h 1 細胞クローン (A E 7 および D 1 . 1) または T h 2 クローン (D 1 0 および C D C 3 5) から単離された。全 R N A は、培地または P M A (5 0 n g / m l) およびイオノマイシン (1 u M) を用いて 6 時間処理された M 1 2 (B 細胞リンパ腫) および E L 4 (T 細胞リンパ腫) から単離された。ノーザンブロット分析は、標準方法を用いてレーンあたりに全 R N A 1 0 u g を用いて行い、そして全長 T - b e t c D N A を用いてプローブした。T - b e t は、T h 1 クローン中に優先的に発現された。さらに、T - b e t 発現のレベルは、T c R を介して伝達されたシグナルにより増加し、これは抗 - C D 3 による T - b e t 転写物の誘導により証明された。T - b e t 転写物は、細胞を培地または P M A (5 0 n g / m l) およびイオノマイシン (1 u M) を用いて 6 時間処理した場合に、M 1 2 、 B 細胞リンパ腫内、T 細胞リンパ腫 J u r k a t 内または E L 4 、 T h 0 細胞胸腺腫内のいずれでも検出されなかった。

40

50

【0189】

一次T細胞中のT - b e tのタンパク質レベルを決定するために、D O 1 1 . 1 0 T c Rトランスジェニック脾細胞をTh 1またはTh 2極性化条件下で培養した。72時間後に、200 U / m l I L - 2を有する新しい培地内で細胞を3倍に拡大した。一次刺激から7日目に、核およびサイトゾル抽出物を、休息またはP M A / イオノマイシン活性化(1時間)バルクカルチャーD O 1 1 . 1 0 Th 1およびTh 2細胞から調製した。核抽出物も休息していたM 1 2、E L 4、J u r k a t、N K 3 . 3およびY T細胞から調製した。図3 Cに示すように、細胞系統中で、T - b e tタンパク質はY T細胞内のみ存在した。図3 Cは、T - b e tタンパク質がTh 1細胞およびNK細胞内のみ限定されていることを示す。ウエスタンブロット試験を、休息またはP M A / イオノマイシン活性化(1時間)したバルクカルチャーD O 1 1 . 1 0 Th 1およびTh 2細胞から上記のように調製した核およびサイトゾル抽出物に関して行った。要約すると、D O 1 1 . 1 0 テルトランスジェニック(t e r t r a n s g e n i c)脾細胞を、Th 1表現型発生を促進するためには10 ng / m l I L - 1 2および10 u g / m l 抗I L - 4(11 B 1 1)、Th 2表現型発生を促進するためには10 ng / m l I L - 4および10 u g / m l 抗I F N - の存在下で、 3×10^6 細胞 / m lのO V Aペプチド(323 - 339)を用いて活性化した。72時間後に、細胞を200 U / m l I L - 2を用いて新しい培地中で3倍に拡大した。一次刺激から7日目に、核およびサイトゾル抽出物を、休息またはP M A / イオノマイシン活性化(1時間)バルクカルチャーD O 1 1 . 1 0 Th 1およびTh 2細胞から調製した。核抽出物も休息していたM 1 2細胞、E L 4、J u r k a t、N K 3 . 3、およびY Tから調製した。核およびサイトゾル抽出物の30 u gをS D S - P A G E(8%ゲル)により分離し、ニトロセルロースへ移行し、そして抗T - b e t抗血清を用いてプローブした。一次T細胞中で、T - b e tタンパク質が、Th 1駆動T細胞内で選択的に発現され、Th 2経路では発現されず、これは上記のT細胞クローンおよび一次T細胞のノーザンブロット分析と一致する。

【0190】

T - b e tに特異的なモノクローナル抗体(m A b)は、F A C S分析によりT - b e tタンパク質の直接可視化を可能とした。図3 Dは、T - b e tが、活性化されたA E 7 Th 1細胞内でのF A C Sにより可視化できることを示す。D 1 0(Th 2)またはA E 7(Th 1)細胞を、培地またはイオノマイシン(1 u M)を加えたP M A(50 ng / m l)中で2時間および2 n Mモネムシンでさらに3時間用いて処理した。細胞をP B Sを用いて洗浄し、4%パラホルムアルデヒド中で固定し、0.5%サポニンを浸透させ、そして培地(破線)またはI g G 1アイソタイプ対照抗体(点線)またはアフィニティー精製した抗T - b e tモノクローナル抗体 3 D 1 0(実線)を用いて染色し次いでヤギ - マウスI g G 1 - P E染色した。F A C Sキャリバー(C a l i b u r)上のフローサイトメトリーを用いて細胞を分析した。マウスモノクローナル抗体は、細菌産生T - b e tに対して作製した。T - b e tタンパク質は、D 1 0細胞中では検出できず、非刺激A E 7細胞中には低いレベルで存在しそして刺激A E 7細胞中では増加したレベルで存在した。これらを総合すると、ここに詳細に記載した実験は、T細胞中で、T - b e tはTh 1細胞内で選択的に発現されこれ発現のレベルはT c Rに由来するシグナルにより調節されることを証明する。

【0191】

実施例5 . T - b e t発現はNKおよびB細胞中のI F N - 誘導と相関する

I L - 2プロモーター中のT - b o x部位への結合によりその単離と連結するT - b e tのTh 1限定発現は、T - b e tがI L - 2遺伝子の転写を活性化するのではないかと示唆する。しかし、2種のI L - 2産生細胞系統、J u r k a tおよびE I . 4がT - b e tを発現せず、一方、I F N - を産生するがI L - 2はしないNK細胞系統Y Tは、T - b e tを発現することは謎である。さらに、I L - 2プロモーター中の優れたT - b o x部位の存在にもかかわらず、予備的実験は、T - b e tによるI L - 2遺伝子のトランス活性化を証明しなかった。他のTh 1特異性サイトカインは、I F N - 、T N F

10

20

30

40

50

およびLTを含む。T-betの発現は、IFN- γ の発現と良く相関する。さらに、T-box部位は、ヒトIFN- γ 遺伝子の第三イントロン内に存在することが分かった。Th1特異性DNアーゼ過敏性部位がこの領域に位置決定されたので、このことは特に注目に値する。

【0192】

T-betがIFN- γ 遺伝子の発現を制御する可能性を試験するために、Th1細胞以外の細胞内でのT-betの発現およびIFN- γ の発現を測定した。IFN- γ は、天然キラー(NK)細胞内で低レベルで発現し、そしてIL-2およびIL-12を用いる処理で高レベルに誘導される(Kornbluth, J., et al. 1982, J. Immunol. 129:2831; Ye et al. 1995, J. Leuk. Biol. 58:225)。従って、NK3.3細胞系統を24時間、IL-2、IL-12およびIL-2+IL-12を用いて処理し、溶解物を調製しそして上記のようにT-bet mAbを用いてウエスタンブロット試験を行った。図4bは、T-betタンパク質の協力誘導およびNK3.3細胞内でのIFN- γ の分泌を示す。NK3.3細胞系統を24時間、NK細胞内でIFN- γ を誘導することが知られている試薬、IL-2、IL-12およびIL-2+IL-12を用いて処理し、溶解物を調製し、そして上記のようにT-bet mAbを用いてウエスタンブロット試験を行った。細胞から採取した上清上でELISAを行った。

10

【0193】

基底でIFN- γ を産生しないB細胞は、抗CD-40抗体およびIL-12およびIL-18の組み合わせを用いる処理により、大量のIFN- γ を産生するように駆動できる(Yoshimoto, T., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3948-3953)。精製したB細胞を72時間、抗-CD40 mAb、rIL-12およびrIL-18を用いて処理し、RNAを単離し、そして上記のようにT-bet cDNAを用いてノーザンブロットを行った。図4Aは、この試薬の組み合わせを用いて処理したB細胞内のT-bet mRNAの誘導を示し、そしてこれらの細胞内のIFN- γ 転写物の誘導を確認した。結論として、いずれの細胞タイプもT-betを構成的に発現しないが、NK3.3細胞およびB細胞の両者は、IFN- γ 産生もたらす条件下でそのように誘導できる。従って、T-betの発現のパターンは、IFN- γ 遺伝子の転写と良く相関する。

20

30

【0194】

実施例6. T-betはTh細胞内のIFN- γ 遺伝子をトランス活性化する

IFN- γ 遺伝子の調節領域に関してはこれまでほとんど知られていない。特に、組織特異性発現を指令する遺伝子の領域は生体外でも生体内でも同定されていない。上流配列の500bpまたは3kbを含むレポーター構築物がTh1およびTh2細胞内で発現されることが証明された(Young, H.A., 1994, J. of Immunol. 153:3606-3610)。IFN- γ プロモーターまたはイントロン中のATF-2、NF- κ B、AP-1およびStat4部位は、機能的に重要と考えられるが、しかし明らかに組織特異性発現には関与しない(Young, H.A., 1994, J. of Immunol. 153:3606-3610; Sica, A., 1997, J. Biol. Chem. 272, 30412-30420; Penix, L. 1993, J. Exp. Med. 178, 1483-1496; Penix, L.A., 1996, J. Biol. Chem. 271, 31964-31972)。同様に、Th1優先DNアーゼ過敏部位が第一および第三イントロンの両方の中で認められているが、これらのイントロン中に位置する関連cis要素は同定されていない(Young, H.A., 1994, J. of Immunol. 153:3603-3610; Agarwal, S. and Rao, A. 1998, Immunity 9, 765-775)。従って、全IFN- γ 遺伝子を含むレポーター構築物をこの研究に使用した。使用されたIFN- γ レポーター遺伝子は、上流配列3kb、3種すべてのイントロンを有する全コーディング配列、および下流の1.5kbを含む(Xu, X., et al. 1996, Science 273, 7

40

50

94 - 796)。

【0195】

JurkatヒトTh1リンパ腫およびマウスEL4 Th0胸腺腫(tymoma)内のIFN- γ 遺伝子の9kbを含むルシフェラーゼレポーター構築物の活性を試験した。それぞれのレポーター構築物(10ug)を空のpCDNAベクターまたは全長T-bet cDNA、c-Maf、NFATpまたはp65(10ug)を含むpCDNAを用いて同時トランスフェクションした。構築物は-400~-40 IL-2およびIL-4ルシフェラーゼレポーターも含む。

【0196】

IL-2およびIL-4を産生するがしかしIFN- γ は産生しないTh0マウスT細胞胸腺腫EL4を、T-bet cDNA発現プラスミドおよびIFN- γ ルシフェラーゼレポーターを用いてトランスフェクションした(図5)。T-bet発現プラスミドの導入は、空のベクター単独と比較して、IFN- γ 遺伝子の(約20~30倍)トランス活性化をもたらした。これは、2種の他の因子、すなわちTh2-特異性転写因子c-MafおよびTh-非-選択性転写因子MFATによるトランス活性化が存在しない場合と対照的である。興味あることには、NF- κ Bファミリーメンバーp65は、それ自体上のIFN- γ レポーターをトランス活性化しないけれども、T-betおよびp65の構築物は、共同作用活性化をもたらす。

10

【0197】

IL-2プロモーターの試験をTh1-特異性であると知られているプロモーターの領域を用いて行った(Lederer, J. A., et al. 1994, J. Immunol. 152, 77-86)。T-betは、IL-2プロモーターの活性を約10倍抑制した。これは特にPMAおよびイオノマイシンを用いるプロモーターの活性化の場合に著しい。前と同様に、IFN- γ 遺伝子の本質的なトランス活性化が認められた。T-bet活性は、IL-2およびIFN- γ 遺伝子に対して特異性であり、それはIL-4プロモーター(図5)またはTNF- α プロモーターのトランス活性化に対する作用が存在しないからである。これらのデータは、T-betがIFN- γ 遺伝子の転写を特異的に活性化し、そしてIL-2遺伝子の転写を抑制することを証明する。

20

【0198】

内因性遺伝子発現を試験するために、EL-4細胞を一時的にT-betまたは空ベクターを用いてトランスフェクションし、そしてIFN- γ 産生をELISAにより、PMA/イオノマイシンを用いる刺激の48時間後に測定した(図5)。上記のトランス活性化データと一致して、EL4細胞内のT-betのエピトープ性発現は測定可能なIFN- γ 産生に導き、一方対照ベクターを用いたトランスフェクションは検出可能なIFN- γ をもたらさなかった。

30

【0199】

実施例7. 一次Th細胞内へのT-betのレトロウイルス遺伝子媒介転移は、増加したIFN- γ 産生をもたらす

上記の実験は、IFN- γ 遺伝子の転写制御におけるT-betの重要な役割を強く主張する。

40

【0200】

ウシコラーゲン特異性Th0ハイブリッドを、T-bet GFPまたはGFPのみを含むレトロウイルス構築物を用い、TcR誘導可能IL-2プロモーターの制御下で形質導入した。形質導入した集団をGFP上で2回FACS選別し、休息し次いで抗CD3を用いて刺激しそして60時間後に上清を集め、ELISAによりサイトカイン産生を測定した(図6)。作用を受けなかった対照レトロウイルスベクターは、アンチセンスT-betを含んでいた。

【0201】

T-betがIFN- γ の組織特異性発現の原因であるかどうかをさらに試験するために、非-トランスジェニックおよびTcRトランスジェニックの両方の一次T細胞内に、

50

T - b e t のレトロウイルス遺伝子媒介転移を行った。T - b e t および G F P の両者を発現する 2 種の異なるピシストロン性レトロウイルスを使用した。第一は I L - 2 誘導可能プロモーターの制御下で T - b e t を発現し、そして第二は M S C V L T R の制御下で T - b e t を発現する。両方の構築物で類似した結果が得られた。

【 0 2 0 2 】

抗 C D 3 + 抗 C D 2 8 による一次活性化の 3 6 時間後に B A L B / c C D 4 T 細胞を感染し、7 日目に採取しそして細胞内 I F N - γ および I L - 2 染色を P M A およびイオノマイシン刺激の 5 時間後に、実験手順に記載の方法で行った。データは、C D 4 の発現に関してゲートを設けたイベントの G F P 発現 (F L 1) 対細胞内サイトカイン (F L 2) を示す二色プロットである。M B P T c R トランスジェニックマウスからの一次 T 細胞を 6 μ M の M B P (A c 1 - 1 1) を用いて刺激しそして感染は 1 日目に I L - 2 / G F P および I L - 2 / T - b e t / G F P を用いて行った。7 日目に、G F P 発現に関して細胞を選別し、1 日休息し、次いで P M A およびイオノマイシンを用いる刺激の 5 時間後に細胞内サイトカイン分析を行った。

10

【 0 2 0 3 】

ナイーブ M B P トランスジェニックまたは非 - トランスジェニック B A L B / c C D 4 T 細胞を、M B P 1 - 1 1 および抗 C D 3 を用い、非 - 極性化条件下で活性化し、そして一次活性化の 1 日目後にレトロウイルスを用いて記載 (O u y a n g , W . e t a l . , 1 9 9 8 , I m m u n i t y 9 : 7 4 5 - 7 5 5) のようにして感染させた。細胞を 7 日間培養し、次いで G F P 発現を測定して感染された細胞の割合を決定した。G F P 陽性細胞を選別しそしてサイトカイン産生を、P M A およびイオノマイシンを用いる刺激からさらに 4 時間後に細胞内染色により測定した。M B R - T c R トランスジェニックおよび非トランスジェニック T 細胞の T - b e t を用いる形質導入は、G F P 単独で形質導入した細胞と比較して I F N - γ を産生する細胞の数および細胞あたりに産生される I F N - γ の量の両方で印象的な増加をもたらした (図 7) 。

20

【 0 2 0 4 】

刺激の後の初期のナイーブ T h 1 細胞は大量の I L - 2 を産生し、次いでこれはエフェクターサイトカイン I F N - γ および I L - 4 により極性化 T h 細胞中に逐次置換される。極性化 T h 1 細胞は I L - 2 を産生するが、しかしナイーブ T h 1 よりも著しく少ない量である。極性化 T h 2 細胞は I L - 2 産生を遮断する。T - b e t 形質導入 T h 細胞は、G F P / R V 対照形質導入細胞よりいくらか少量の I L - 2 を産生し、これは我々が E L - 4 細胞内で観察した T - b e t による I L - 2 プロモータートランス活性化の抑制と一致する。T - b e t による I L - 2 の抑制は、ナイーブ前駆体細胞から完全に分化したエフェクター細胞への系統コミットメントの駆動における T - b e t に対する機能と一致する。

30

【 0 2 0 5 】

実施例 8 . T - b e t は、発生中の T h 2 細胞において I F N - γ を活性化しそして I L - 4 産生を抑制する。

上記の実験は、T - b e t が非偏向 (u n s k e w) T h 細胞を T h 1 経路へ指令できることを証明する。通常は T h 2 経路へ駆動する刺激がない場合でも T h 1 経路に沿って遺伝プログラムを指令するように T - b e t が T h 細胞を強制できることを試験した。図 8 の実験において、B A L B / c C D 4 + T 細胞を r I L - 4 ならびに I F N - γ および I L - 1 2 に対する抗体の存在下で抗 - C D 3 および抗 C D 2 8 を用いて活性化し、レトロウイルス感染を 3 6 時間後に行い、細胞を I L - 2 を用いて拡大し、G F P 陽性細胞を 7 日目に選別し、そして P A M + イオノマイシンを用いる刺激のさらに 4 時間後にサイトカイン産生を細胞内染色により測定した。G F P - R V 単独を用いる形質導入は、1 3 . 4 % I L - 4 産生細胞および 0 . 9 % I F N - γ 産生体を含む集団をもたらした (図 8) 。期待の通りに、T h 1 細胞は、この時点では完全には極性化されていない。T - b e t / G F P / R V の導入は、T h 1 の T h 1 経路への実質的なシフトを生み、これは T h 1 分化を阻害する条件下 (r I L - 4 および抗 I L - 1 2) でも I F N - γ を産生する多

40

50

数の細胞 (50%) および IL-4 を産生する細胞の数 (3.5%) の低下により証明された。従って、T-bet は、サイトカインにより送られる Th2 - 促進シグナルを克服して Th 細胞発生を Th1 経路内に駆動できる。

【0206】

実施例 9 . T - b e t は極性化 Th 2 細胞を Th 1 経路に転向する

Th1 および Th2 集団の可逆性が極性化条件下での長期刺激の後に失われることが証明された。可逆性は、一週間後に大部分が排除され、3週間後には完全に失われる (Murphy, E. et al., 1996, J. Exp. Med. 183, 901-913)。T-bet がすでに極性化された Th2 細胞の純粹の集団のコミットメントを転向できるかどうかを決定するために、CD4 + T 細胞を上記のように培養しそしてレトロウイルス遺伝子性質導入を増殖の9日目に行った。Th2 極性化条件下で9日間培養した Th 細胞中で、対照 GFP / RV 形質導入細胞は、実際的にすべて IL-4 および IL-5 産生体 (23% および 11%) であり、ほとんど検出できない IFN- γ 産生細胞 (6%) を伴っていた (図 9)。従って、期待の通りに、ほぼ完全な極性化が起きた。注目すべきは、これらの完全に極性化した Th2 細胞中への T-bet の導入は、これらを極性化 Th1 細胞に転向または変換し、これは IFN- γ 発現の誘導および IL-4 および IL-5 発現の欠失により証明された。この変換は、外因性 IL-4 の存在下で起きた。T-bet - 形質導入 Th2 細胞の 77% 全部がここで IFN- γ を産生し、一方 IL-4 および IL-5 を産生する細胞の割合は、それぞれ 13% および 1% に低下した。従って、これらの T-bet 形質導入細胞は、IFN- γ および IL-4 の両方を産生する Th0 細胞ではない。従って、T-bet は、Th2 細胞内で単に IFN- γ 発現を誘導するだけでなく、実際に Th2 細胞を反対の Th1 サブセット内に再プログラムする。

10

20

【0207】

実施例 10 . T - b e t は極性化 Tc2 細胞も Th 1 経路に転向する

最大の注目は CD + 4 T リンパ細胞に向けられているけれども、細胞毒性 CD + 8 T 細胞も IFN- γ 産生 (Tc1) および IL-4 産生 (Tc2) サブセットに分裂することも明らかである。完全に極性化された Tc2 細胞を Tc1 経路に転向する T-bet の能力を試験した。従って、精製した CD + 8 T 細胞を Tc2 極性化条件下で9日間分化させて完全な分化に達した。図 10 は、T-bet が Tc2 細胞を形質導入し、これは T-bet が CD4 を形質導入したと類似していたことを示している。Th2 細胞は IFN- γ を産生し (85% 対 15%)、そして IL-4 および IL-5 産生を抑制 (それぞれ 3% 対 34% および 1% 対 45%) するようにプログラムされた。従って、T-bet は完全に分化した CD + 8 Tc2 細胞を Tc1 細胞に転換できる。

30

40

【0208】

実施例 11 . T - b e t はチロシンリン酸化である

T-bet がチロシンリン酸化タンパク質であるかどうかを決定するために、AE7 Th1 細胞からの全細胞溶解物を、ペルバナデート (perovanadate) を用いるインキュベーションの 0、5、10、30 分後に調製した。溶解物を T-bet 抗血清を用いて免疫沈降し、SDS-PAGE (8% ゲル) により分離し、ニトロセルロースに移行し、そして抗ホスホチロシン mAb 4G10 を用いてプローブした。暴露の後、プロットをストリップしそして抗 T-bet 抗血清を用いて再プローブした。図 11 に示すように、T-bet は明らかに T 細胞内でチロシンリン酸化されたタンパク質である。

【0209】

実施例 12 . 優性陰性 T - b e t 分子の創成

キメラ cDNA 分子を、T-bet DNA 結合ドメイン (残基 138 - 327) および ショウジョウバエタンパク質 engrailed のレプレッサードメインを用いて作製した。engrailed タンパク質は、転写の強力な活性なレプレッサーである (Taylor, D., 1996, Genes Dev. 10, 2732; Li, J. Thurman, H. et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10885)。多量体化 T-box 共通部位 / TK 最少プロモーターシフェラーゼ

50

ポーター構築物を生体外で用いた T - b e t - e n g r a i l e d 構築物。図 1 2 に示すように、T - b e t / e n g r a i l e d は、T - b o x レポーター構築物を 5 : 1 比でトランス活性化する w t T - b e t の能力を特異的かつ著しく抑制し、それぞれ N F A T p および p 6 5 発現構築物による N F A T および N F B レポーターのトランス活性化を抑制しない。

【 0 2 1 0 】

実施例 1 3 . I L - 2 プロモーターの T - b o x の変異は I L - 2 プロモーター活性を低下する

最近、DNA に結合した B r a c h y u r y 遺伝子の T - b o x 領域の結晶構造が解明されそして特異性 DNA コンタクト (c o n t a c t) またはマイナーコンタクトに本質的なアミノ酸部分が誘導された。ヒトおよびネズミ I L - 2 近位プロモーターの検査は、T - b o x ファミリーメンバーを結合するために重要なヌクレオチドが存在することを示す。具体的には、ネズミ I L - 2 プロモーターの - 2 4 0 ~ - 2 2 0 b p は共通 T - b o x 部位に強い類似性を有する。共通 T - b o x 部位は、A A T T T C A C A C C T A G G T G T G A A A T T を含んでなる、ヒト I L - 2 プロモーターは、g A g c T a t C A C C T A a G T G T G g g c T a を含んでなる。ネズミ I L - 2 プロモーターは、A A a c T g c C A C C T A g G T G T G g g c T a を含んでなる。変異 T - b o x m I L - 2 プロモーターは、A A a c T g c t g t C T A a a c a T G g g c T a を含んでなる (DNA コンタクトは太字、マイナーコンタクトは下線を付した)。DNA - タンパク質相互作用に本質的な結晶構造により示されるトランスバージョン・ヌクレオチド置換は、この推定 T - b o x 部位内に、ネズミ - 4 4 0 ~ - 4 0 b p I L - 2 プロモーターの範囲内で作製された。I L - 2 リシフェラーゼレポーター構築物の J u r k a t 細胞 (左) または A E 7 T h 1 クローン (右) 内の基礎レベル (中空棒) および P M A (5 0 n g / m l) プラス イオノマイシン (1 u M) 誘導 (黒棒) プロモーター活性を示した (図 1 3)。

【 0 2 1 1 】

T - b e t の役割は、T h 細胞の分化を駆動することであり、これは同時に I F N - 遺伝子を誘導および I L - 2 遺伝子を抑制するその能力により証明される。抗原を未経験の T h p 細胞は I L - 2 のみを産生する。刺激を受けると、I L - 2 産生は低下しそして T h 成熟エフェクターサイトカインの産生により置換される。特に、T h 2 細胞は、I L - 4 を産生する能力を取得すると I L - 2 産生を停止し、そして同時に I F N - を誘導そして I L - 2 遺伝子を抑制する T - b e t の能力は、T h 2 細胞内に特に顕著である。同時に I F N - プロモーターをトランス活性化しそして I L - 2 プロモーターを抑制する T - b e t の能力は、従ってナイーブ T h p の分化の推進における T - b e t の役割と一致する。T - b e t は、上流プロモーター配列の 3 k b のみを含む構築物をトランス活性化することが示され、これは位置 - 2 3 0 0 ~ - 2 2 9 1 および - 1 9 5 7 ~ - 1 9 4 8 における 2 個の T - b o x 部位の存在と一致する。しかし、プロモーターのこの領域は T h 1 - 特異性ではないので、第三イントロン内の T - b o x 部位も重要でありそして遺伝子のどこかに追加の T - b o x 部位が存在すると考えられる。

【 0 2 1 2 】

T - b o x ドメインは、最近 DNA と同時結晶化されそしてメジャーおよびマイナーグループ両方の中でタンパク質が DNA に接触している新規の配列特異性 DNA 認識構造を証明した (M u e l l e r , C . W . a n d H e r r m a n n , B . G . , 1 9 9 7 , N a t u r e 3 8 9 , 8 8 4 - 8 8 8)。生体外標的部位選択により規定された共通 T - b o x 結合部位は、パリンドローム 5 ' - G G G A A T T T C A C A C C T A G G T G T G A A A T T C C C - 3 ' であった。I L - 2 プロモーターの検査は、組換え T - b e t タンパク質が結合する N F B 部位の 5 ' の - 2 4 0 ~ - 2 2 0 丁度にある優れた T - b o x 部位を明らかにした。I L - 2 プロモーターへの T - b e t の結合は、酵母ワンハイブリッドスクリーンにおけるその単離を説明し、ここで、リードアウトは、I L - 2 プロモーター内の T - b o x 部位への T - b e t の結合に単に依存して人工レポーターを駆動

する。T - b e tによるIL - 2活性の明瞭な抑制にもかかわらず、T - b o x部位の変異の際のIL - 2プロモーター活性の低下が観察された。しかし、そのT - b e tはT - b o x部位が変異されたIL - 2プロモーター構築物のトランス活性化をまだ抑制できる。これは、IL - 2プロモーター中の別のT - b o x部位の存在か、または近くで結合する別の正に作用する因子との干渉のいずれかの存在を示唆する。この因子の良い候補は、T - b o x部位に丁度隣接する部位T G G G C Cに結合するR o t h e n b e r gらが記載した活性である (C h e n , D . a n d R o t h e n b e r g , E . V . , 1 9 9 4 , J . E x p . M e d . 1 7 9 , 9 3 1 - 9 4 2) 。

【 0 2 1 3 】

さらに、T - b e tはThpおよびTh2細胞内のTh2プログラムを抑制する。これは、IFN - とIL - 4との間の前者に有利な不均衡の直接の結果ではないと考えられる。Th2プログラムを抑制し、同時にTh1プログラムを促進するT - b e tの作用は、G A T A - 3およびc - M a fの記憶であり、この両者ともに間接的にIFN - 発現を抑制し、前者はIL - 12受容体 2鎖の発現への影響を通じる (H o , I - C . , e t a l . 1 9 9 8 , J . E x p . M e d . 1 8 8 : 1 3 5 9 - 1 3 6 6 ; O u y a n g , W . e t a l . , 1 9 9 8 , I n h i b i t i o n o f T h 1 d e v e l o p m e n t a l m e d i a t e d b y G A T A - 3 t h r o u g h a n I L - 4 i n d e p e n d e n t m e c h a n i s m . I m m u n i t y 9 : 7 4 5 - 7 5 5) 。しかし、G A T A - 3およびc - M a fとは異なり、T - b e tは実際に反対経路内に完全に極性化したエフェクターTh細胞を変換できる。

【 0 2 1 4 】

当該技術分野の熟練者は、日常的な実験を越えることなく、本明細書中に記載した本発明の特定の態様に等価な多数の事項を認め、または確認できるであろう。このような等価事項は、別記の特許請求の範囲内に包含されると考える。なお、特許請求の範囲に記載された発明以外の主たる態様は、次のとおりである。

【 0 2 1 5 】

態様1：配列番号2または配列番号4のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子または該核酸分子の全鎖長を通して該核酸分子に対して相補的である単離された核酸分子。

【 0 2 1 6 】

態様2：配列番号1に記載のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号1の全鎖長を通して該ヌクレオチド配列に対して相補的である、態様1記載の核酸分子。

【 0 2 1 7 】

態様3：配列番号3のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号3全鎖長を通して該ヌクレオチド配列に対して相補的である、態様1記載の核酸分子。

【 0 2 1 8 】

態様4：態様1～3のいずれかに記載の核酸分子を含んでなるベクター。

【 0 2 1 9 】

態様5：発現ベクターである、態様4記載のベクター。

【 0 2 2 0 】

態様6：態様4記載のベクターを含む宿主細胞。

【 0 2 2 1 】

態様7：態様6記載の宿主細胞を、T - b e tタンパク質が産生されるまで適当な媒体内で培養することを含んでなる、T - b e tタンパク質を産生するための方法。

【 0 2 2 2 】

態様8：媒体または宿主細胞からT - b e tタンパク質を単離することを含んでなる、態様7記載の方法。

【 0 2 2 3 】

態様9：配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド。

10

20

30

40

50

【 0 2 2 4 】

態様 1 0 : 配列番号 1 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含んでなる、態様 9 記載のポリペプチド。

【 0 2 2 5 】

態様 1 1 : 配列番号 3 の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を含んでなる、態様 9 記載のポリペプチド。

【 0 2 2 6 】

態様 1 2 : 異種ポリペプチドと操作可能に連結した態様 1 記載の核酸分子によりコードされるポリペプチドを含んでなる融合タンパク質。

【 0 2 2 7 】

態様 1 3 : 特異的に態様 9 ~ 1 1 のいずれかに記載のポリペプチドを結合する抗体。

【 0 2 2 8 】

態様 1 4 : ポリクローナル抗体である、態様 1 3 記載の抗体。

【 0 2 2 9 】

態様 1 5 : モノクローナル抗体である、態様 1 3 記載の抗体。

【 0 2 3 0 】

態様 1 6 : 検出可能な物質にカプリングしている、態様 1 3 記載の抗体。

【 0 2 3 1 】

態様 1 7 : 配列番号 2 または 4 のペプチドをコードする導入遺伝子を有する細胞を含む非 - ヒトトランスジェニック動物。

【 0 2 3 2 】

態様 1 8 : 細胞を細胞内の T - b e t 活性が調節されるように T - b e t 活性を調節する薬剤と接触させることを含んでなる、細胞内の T - b e t 活性を調節するための試験管内方法であって、該薬剤が配列番号 2 のポリペプチドをコードする核酸分子、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列に対してアンチセンスである核酸分子、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する細胞内抗体、またはそれらの組み合わせ物からなる群より選択される、上記方法。

10

20

【 図 1 B c 】

```

      850      860      870      880      890      900
上  GAGGCAGCTGGCAACGCTTCCAACACGCATATCTTTACTTTCCAAGAAACCCAGTTCAATT
下  GAGGCTGCCTGCAGTGCCTTCTAACACACACAGCTTACTTTCCAAGAGACCAGTTCAATT
      840      850      860      870      880      890

      910      920      930      940      950      960
上  GCGGTGACTGCTTACCAGATTCGCCGAGATTACTGAGCTGAAAATGATAATACCCCTTT
下  GCAGTGAAGTCCCTTACCAGAACCCAGAGATCACTGAGTGAATAATCGACAACAGCCCTTT
      900      910      920      930      940      950

      970      980      990      1000      1010      1020
上  GCCAAGCATTCGGGGAGAACTTTGAGTCCATGTACACATCTGTTGACACCAGCATCCCC
下  GCCAAGGATTCGGGGAGAACTTTGAGTCCATGTACACATCTGTTGATACGACTGTCCCC
      960      970      980      990      1000      1010

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
上  TCCCCTGCTGGACCCAACTGTCAATTCCTTGGGGGAGATCACTACTCTCTCTACCC
下  TCCCCTGCTGGACCCAACTGTCAATTCCTTGGGGGAGATCACTACTCTCTCTACCC
      1020      1030      1040      1050      1060      1070

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
上  AACCAATATCCCTTCCAGCCCTTCAACCCGACCTTCTGGCCAGCCGAAAGGATGTG
下  AACCAATATCCCTTCCAGCCCTTCAACCCGACCTTCTGGCCAGCCGAAAGGATGTG
      1080      1090      1100      1110      1120      1130

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
上  GTTCCACAGCTTACTGGCTGGGGCCCGCCGGGACACAGCTATGAGCTGAGTTTCCGA
下  GTTCCACAGCTTACTGGCTGGGGCCCGCCGGGACACAGCTATGAGCTGAGTTTCCGA
      1140      1150      1160      1170      1180      1190

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
上  GCAGTCAGCATGAAGCCCTGCATCTTGGCCCTGCCCCTGGGCCACCATGCTCTACTAC
下  GCAGTCAGCATGAAGCCCTGCATCTTGGCCCTGCCCCTGGGCCACCATGCTCTACTAC
      1200      1210      1220      1230      1240      1250

```

図 1B(つづき)

【 図 1 B d 】

```

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
上  CGAGGCCAGGAGTCTCTGGCACCTGGAGCTGGCGGCTGTGGCACCCAGTACCCTCC
下  CGAGGCCAGGAGTCTCTGGCACCTGGAGCTGGCGGCTGTGGCACCCAGTACCCTCC
      1260      1270      1280      1290      1300      1310

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
上  AAGATGGGCGGGCAGCTGGTCCGCCATATCGGACTCTGCCATGGAAACCCGCCCT
下  AAGATGAGCCGAGCTGGTGGTCCGCCATATCGGACTCTGCCATGGAAACCCGCCCT
      1320      1330      1340      1350      1360      1370

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
上  GGAGGCTCAGAGGGGACGGGACAGAGGACAGGCTCCGCCCTTGGTGTGGACTGAGATT
下  GGATCCTCAGAGGACAGGCTCCCT-----CCGCCCTGTGGCTGAGGTC
      1380      1390      1400      1410      1420      1430

      1430      1440      1450      1460      1470      1480
上  GCCCCATCCGGCCGAATCCAGTATTCAGGACTGGCCGAGGAGACTTAAGAGGAGG
下  ACCTCCCTCAGCCGAGCCAGCCAGCTCAGGACTAGCCGAGGAGACACTAAGAGGAGG
      1430      1440      1450      1460      1470      1480

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
上  CGCGTCCGCCCTATCCTCCAGTGGTGCAGCTCCCTCCGCCCTGGGGCCCTTCTCCT
下  AGGATATCCGCCCTATCCTCCAGTGGGACAGCTCCCTCCGCCCTGGGGCCCTTCTCCT
      1490      1500      1510      1520      1530      1540

      1570      1580      1590      1600
上  TTTGATAAGGAAGCTGAAGGACAGTTTTATAACTATTTCCGCACTGA
下  TTTGATAAGGAAGCTGAAGGACAGTTTTATAACTATTTCCGCACTGA
      1550      1560      1570      1580      1590

```

図 1B(つづき)

【 図 2 】

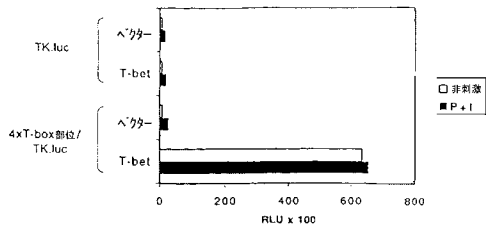


図 2

【 図 3 A 】

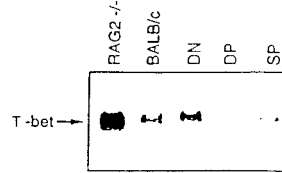


図 3A

【 図 3 B 】



図 3B

【 図 3 C 】

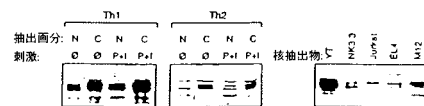


図 3C

【 図 3 D 】

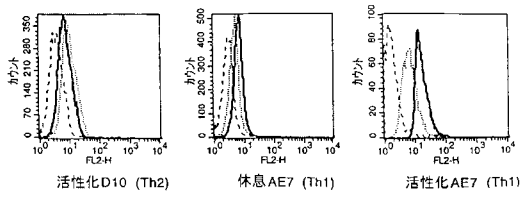


図 3D

【 図 4 B 】

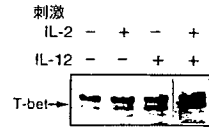


図 4B

【 図 4 A 】

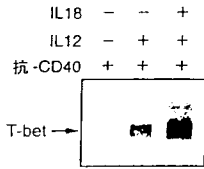


図 4A

【 図 5 】

T-betはTh細胞中のIFN-γ 遺伝子をトランス活性化する

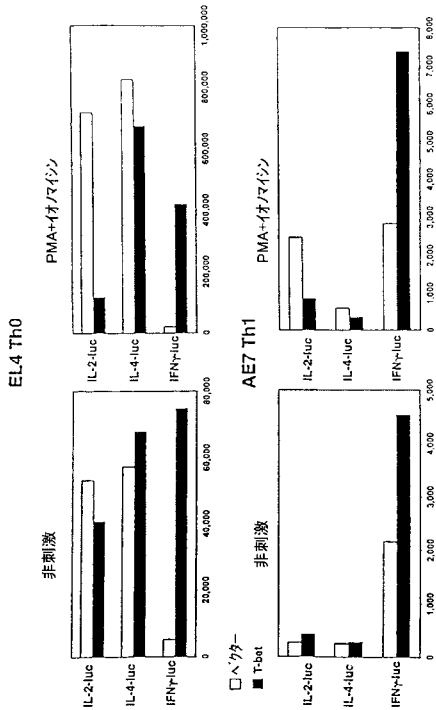


図 5

【 図 6 】

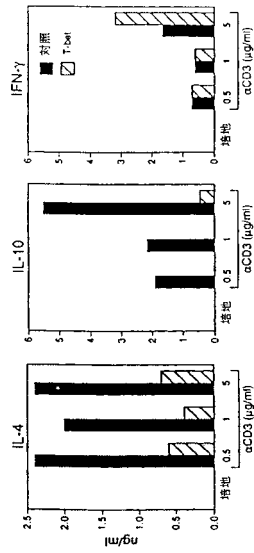


図 6

【 図 7 】

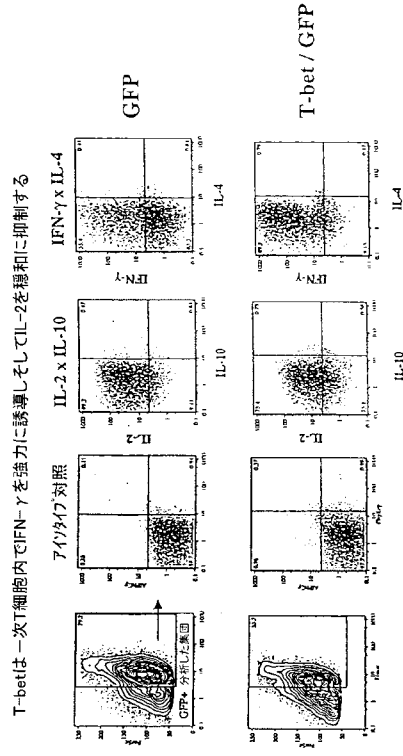
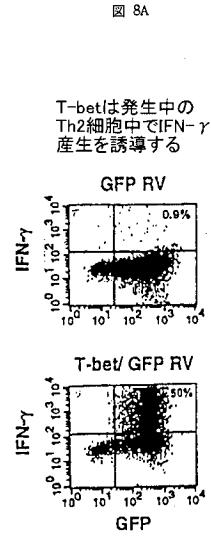


図 7

【 図 8 A 】



【 図 8 B 】

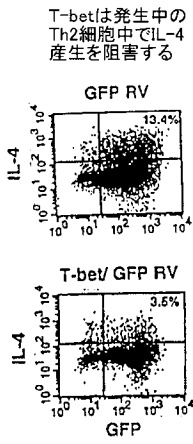


図 8B

【 図 9 A 】

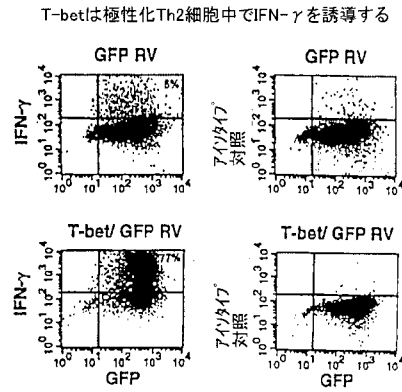


図 9A

【 図 9 B 】

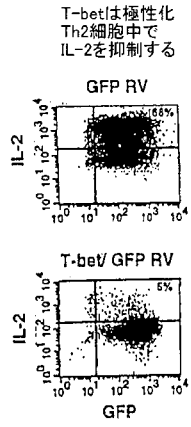


図 9B

【 図 9 C 】

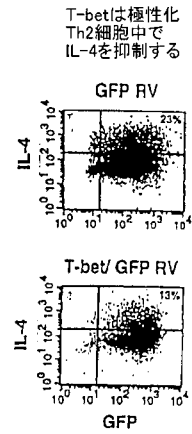


図 9C

【 図 9 D 】

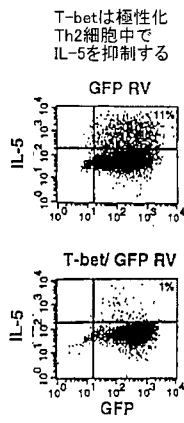


図 9D

【 図 10 A 】

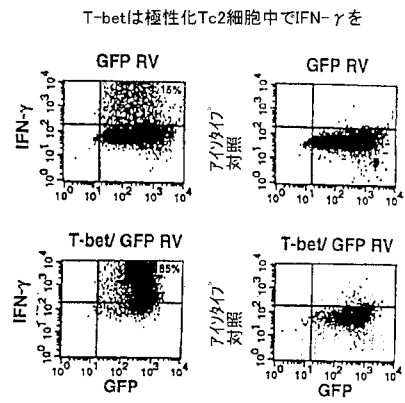


図 10A

【 図 1 0 B 】

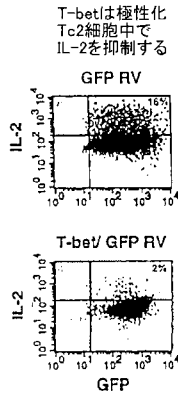


図 10B

【 図 1 0 C 】

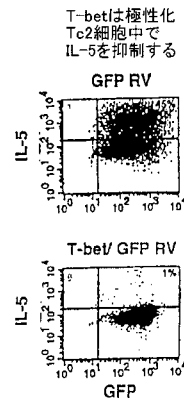


図 10C

【 図 1 0 D 】

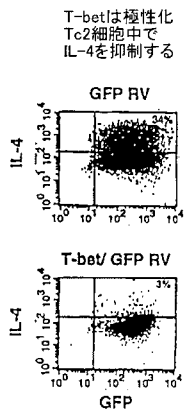


図 10D

【 図 1 2 】

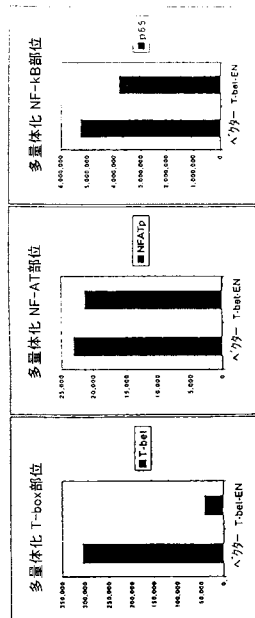


図 12

【 図 1 1 】

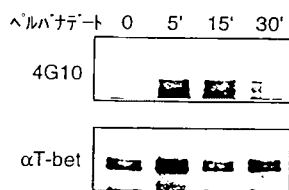


図 11

【 図 1 3 】

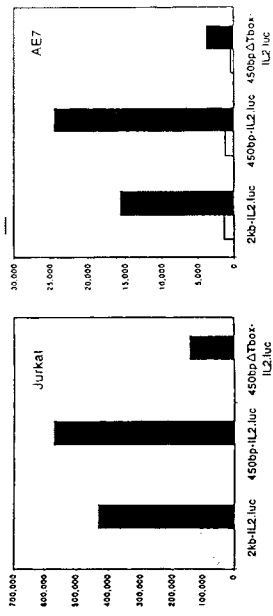


図 13

【 配列表 】

2010011856000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 15/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 39/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/02	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 39/00	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
	A 6 1 P 1/16	

(72)発明者 スーザン・ジエイ・スザボ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02446ブルックライン・ビーコンストリート1131

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB50 BB51 DA13 DA36 FB02
 4B024 AA01 AA11 BA43 CA03 CA07 DA02 DA06 EA02 EA04 FA02
 GA11 HA04 HA17
 4B064 AG01 AG26 CA02 CA10 CA19 CA20 DA01 DA13
 4C084 AA02 AA13 AA17 BA44 NA14 ZA022 ZA332 ZA542 ZA552 ZA622
 ZA662 ZA752 ZA812 ZA892 ZA922 ZA942 ZA962 ZB052 ZB082 ZB132
 ZB152 ZB262 ZB322 ZC062 ZC352 ZC372
 4C085 AA13 AA14 BB11 CC23 GG02 GG04 GG05 GG08
 4C086 EA16 NA14 ZA02 ZA33 ZA54 ZA55 ZA62 ZA66 ZA75 ZA81
 ZA89 ZA92 ZA94 ZA96 ZB05 ZB08 ZB13 ZB15 ZB26 ZB32
 ZC06 ZC35 ZC37
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 DA86 EA22
 EA28 EA29 EA50 FA74

专利名称(译)	T-bet组合物及其使用方法		
公开(公告)号	JP2010011856A	公开(公告)日	2010-01-21
申请号	JP2009200540	申请日	2009-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	哈佛大学校长及研究员协会		
申请(专利权)人(译)	总统和Fuerozu哈佛Karetsuji		
[标]发明人	ローリーエイチグリムシヤー スーザンジエイズザボ		
发明人	ローリー・エイチ・グリムシヤー スーザン・ジエイ・スザボ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C07K19/00 C07K16/18 C12P21/02 A61K45/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 A61K48/00 A61K38/00 A61K39/395 A61K31/7088 A61P37/00 A61P35/00 A61P31/00 A61P37/06 A61P25/00 A61P3/10 A61P19/02 A61P29/00 A61P21/04 A61P37/02 A61P5/14 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P27/02 A61P1/00 A61P11/06 A61P15/02 A61P39/00 A61P7/06 A61P7/04 A61P1/16 A01K67/027 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/12 C12Q1/68		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P11/06 A61P15/02 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/4705 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K19/00 C07K16/18 C12P21/02.C A61K45/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D A61K48/00 A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.U A61K31/7088 A61P37/00 A61P35/00 A61P31/00 A61P37/06 A61P25/00 A61P3/10 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P21/04 A61P37/02 A61P5/14 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P27/02 A61P1/00 A61P11/06 A61P15/02 A61P39/00 A61P7/06 A61P7/04 A61P1/16 A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA03 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA04 4B024/HA17 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA332 4C084/ZA542 4C084/ZA552 4C084/ZA622 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA922 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB052 4C084/ZB082 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4C084/ZC372 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA33 4C086/ZA54 4C086/ZA55 4C086/ZA62 4C086/ZA66 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA92 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB05 4C086/ZB08 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB32 4C086/ZC06 4C086/ZC35 4C086/ZC37 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/137085 1999-06-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了编码T-bet的分离的核酸分子和分离的T-bet蛋白。 解决方案：分离编码鼠和人T-bet的核酸分子，并使用它具有反义核酸分子，重组表达载体，引入该表达载体的宿主细胞和T-bet转基因。 产生了非人类转基因动物，还产生了T-bet蛋白，T-bet融合蛋白和抗T-bet抗体。 它们包括检测生物样品中T-bet活性的方法，调节细胞中T-bet活性的方法和作为使用T-bet组合物的方法的T-bet活性。 用于识别调节剂的方法。 [选择图]无

