

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 519463

(P2003 - 519463A)

(43)公表日 平成15年6月24日(2003.6.24)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/711	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711		35/76	4 B 0 6 3
35/76		39/395	D 4 B 0 6 4
38/00			N 4 B 0 6 5
39/395		48/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 79数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 605597(P2000 - 605597)

(86)(22)出願日 平成12年3月15日(2000.3.15)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月17日(2001.9.17)

(86)国際出願番号 PCT/US00/06612

(87)国際公開番号 W000/055169

(87)国際公開日 平成12年9月21日(2000.9.21)

(31)優先権主張番号 60/124,714

(32)優先日 平成11年3月15日(1999.3.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , C A , J P

(71)出願人 トーマス・ジェファーソン・ユニバーシテイ
アメリカ合衆国、ペンシルバニア州 1910
7、フィラデルフィア、ウオルナット・スト
リート 1020

(72)発明者 クロセ、 カルロ、 エム
アメリカ合衆国、19103 ペンシルベニア州
、フィラデルフィア、デランシー ストリ
ート 1829

(74)代理人 弁理士 大森 純一 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T C L - 1 b 遺伝子、蛋白質、それらに関連した方法およびそれらに関連する物質

(57)【要約】

【解決手段】 ヒト染色体の14q32.1遺伝子座に局在するTCL1遺伝子ファミリーがT細胞悪性腫瘍に関係すると考えられる。本発明はこの遺伝子ファミリーの新しい構成要素であるTCL-1b遺伝子の同定と同定を開示する。TCL-1b遺伝子配列は正常な骨髄および末梢リンパ球において極めて低いレベルで発現するが、14q32.1遺伝子座の組み換えによるT細胞白血病およびリンパ腫において活性化する。本発明はこれらの14番染色体異常の同定、そして発生するどのようなT細胞悪性腫瘍をも検出および治療する方法、またこれらのT細胞悪性腫瘍の発生予防に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 T c l - 1 b 蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列が c D N A 配列である分離核酸。

【請求項2】 前記ヌクレオチド配列は、アミノ酸配列配列番号：10のアミノ酸番号1～128番目を持つヒト T c l - 1 b 蛋白質をコードする請求項1記載の分離核酸。

【請求項3】 少なくとも T c l - 1 b 蛋白質フラグメントをコードする18ヌクレオチド部を含む50キロベース以下の分離核酸。

【請求項4】 少なくとも配列番号：11に描写された配列の18ヌクレオチド部を含む50キロベース以下の分離核酸。

【請求項5】 ヌクレオチド配列配列番号：9の核酸番号1から1152番目を含む請求項1記載の分離核酸。

【請求項6】 T c l - 1 b 蛋白質。

【請求項7】 アミノ酸配列配列番号：10のアミノ酸1～128を含む請求項6記載の分離 T c l - 1 b 蛋白質。

【請求項8】 アミノ配列配列番号：10のアミノ酸番号1から128番目を持つ蛋白質のフラグメントをコードする配列を含み、そのフラグメントは抗体によって T c l - 1 b 蛋白質に特異的に結合できる分離核酸。

【請求項9】 T c l - 1 b 蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含み、そのヌクレオチド配列は c D N A 配列である組換え D N A ベクター。

【請求項10】 請求項7記述の組換え D N A ベクターを含む宿主細胞。

【請求項11】 ヌクレオチド配列がアミノ配列配列番号：10のアミノ酸番号1から128番目を持つヒト T c l - 1 b 蛋白質をコードする請求項7記載の組換え D N A ベクター。

【請求項12】 少なくとも配列番号：11の50ヌクレオチド部を含む50キロベース以下の分離核酸。

【請求項13】 c D N A 配列配列番号：9に相補的なヌクレオチド配列に厳しい条件下で交雑可能な分離核酸であり、前記核酸は少なくとも配列番号：9の25ヌクレオチド部を含む分離核酸。

【請求項14】 T c l - 1 b 核酸をコードする c D N A 配列に相補的なヌクレオチド配列に厳しい条件下で交雑可能な分離核酸であり、その蛋白質はアミノ酸配列配列番号：10を持ち、前記核酸は少なくとも配列番号：9の25ヌクレオチド部を含む分離核酸。

【請求項15】 少なくとも T c l - 1 b 蛋白質のコード配列の一部に相補的なヌクレオチド配列を含み、T c l - 1 b m R N A に交雑可能なアンチセンス分子。

【請求項16】 前記ヌクレオチド配列は少なくとも配列番号：9に描写された配列の一部に相補的な請求項15記載のアンチセンス分子。

【請求項17】 少なくとも非 T c l - 1 b 蛋白質配列に連鎖する10アミノ酸の T c l - 1 b 蛋白質配列を含む融合蛋白質。

【請求項18】 T c l - 1 b 蛋白質のエピトープに結合する抗体。

【請求項19】 少なくとも25アミノ酸の近接配列の上に、配列番号：10に描写されたアミノ酸配列に少なくとも70%のアミノ酸配列同一性を持つアミノ酸配列を含む分離蛋白質。

【請求項20】 試料における14番染色体異常を示す標的配列を検出する方法であり、

a) ヌクレオチド配列配列番号：9に相補的な18から25分子の第一プライマー、および好ましくはT細胞レセプター / 遺伝子座からの、前記 T C L - 1 b 遺伝子にテロメアまたはセントロメアの領域に相補的な第二プライマーを使って前記標的配列を増幅する；および

b) 前記増幅標的配列の存在が前記14番染色体異常を指摘するような結果として生じる標的配列を検出する

段階を含む方法。

【請求項21】 前記14番染色体異常は T C L - 1 b 遺伝子座にあり、t (1 4 : 1 4) (q 1 1 : q 3 2) 転座または i n v (1 4) (q 1 1 : q 3 2) 逆位を含む請求項20記載の方法。

【請求項22】 アミノ酸配列配列番号：10のアミノ酸番号1から120番目を持つヒト T c l - 1 b 蛋白質をコードする c D N A 配列を含む組換えベクタ

ーを含む宿主細胞。

【請求項23】 T c l - 1 b 蛋白質をコードする c D N A 配列に相補的なヌクレオチド配列に厳しい条件下で交雑可能な核酸を含む組換えベクターを含む宿主細胞であって、その蛋白質はアミノ酸配列配列番号：10を持ち、前記核酸は少なくとも配列番号：9の25ヌクレオチド部を含む宿主細胞。

【請求項24】

【請求項25】 薬剂的に許容可能な担体中に請求項15および16記載の前記アンチセンス分子を含む薬剤組成物。

【請求項26】 薬剂的に許容可能な担体中に請求項18記載の前記抗体を含む薬剤組成物。

【請求項27】 核酸試料における14番染色体異常を示す標的ヌクレオチド配列を検出する方法であり、

a) 前記試料を前記ヌクレオチド配列配列番号：9に相補的な15-1152ヌクレオチド範囲からなる10キロベース以下の核酸プローブと交雑する；および
b) 前記試料内における、結果として生じる前記プローブと前記標的配列との間のハイブリダイゼーションを検出または測定する
段階を含む方法。

【請求項28】 前記14番染色体異常はT C L - 1 b 遺伝子座にあり、t (1 4 : 1 4) (q 1 1 : q 3 2) 転座またはi n v (1 4) (q 1 1 : q 3 2) 逆位を含む請求項27記載の方法。

【請求項29】 患者試料、好ましくは人間の試料中に、T c l - 1 b 蛋白質を検出する方法であって、

a) 免疫特異結合が起こるような条件下において前記患者試料に抗T C L - 1 b 抗体を持って接触し、
b) 前記抗体による免疫特異結合の量をすべて検出または測定することを含む方法。

【請求項30】 それぞれ少なくとも15-25のヌクレオチドを持つ一対のプライマーを一またはそれ以上の容器中に含む診断キットであって、少なくとも前記プライマーの一つは配列番号：9またはその相補体に交雑可能で、前記プラ

イマーは核酸増幅反応におけるDNA合成をプライムできる診断キット。

【請求項31】 14番染色体異常関連疾患状態を患う哺乳類、好ましくは人間における前記14番染色体異常関連疾患状態を治療する方法であり、前記哺乳類に治療効果のある量のTc1-1bアンチセンス分子または抗TCL-1b抗体を投与することを含む方法。

【請求項32】 前記疾患状態はT細胞白血病またはリンパ腫を含み、前記14番染色体異常はt(14:14)(q11:q32)転座またはinv(14)(q11:q32)逆位を含む請求項31記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本出願は分子生物学の分野に関し、特に、T細胞白血病における染色体の組み換えによっても活性化されるTCLI遺伝子ファミリーの第三番目の構成要素に関し、具体的にはTcl-1bの分離および同定に関する。

【0002】

本発明は一部国立保健研究所からの交付金番号CA39880号およびCA51083号のもとに政府の支援を受けてなされた。本発明に関して政府が多少の権利を持つものである。

【0003】**関連出願への引照**

本出願は1999年3月15日出願の米国仮特許出願番号60/124,714号に基づき35 USC 119条の下に優先権を主張する。

【0004】**【従来技術】**

染色体の転座、逆位、欠失等の特定の染色体異常と一定の型の悪性腫瘍の間には密接な関係があり、この異常が発癌過程において原因的な役割を果たしている可能性がある。染色体異常は、大部分の骨髄系の悪性腫瘍に見られるように、遺伝子融合を起こし、その結果として融合型の癌関連蛋白質（キメラオンコプロテイン）を生ずることがある。あるいは、リンパ系において起こる転座に見られるように、染色体異常の結果として造血細胞において活性の調節部位の近傍への挿入によって癌関連遺伝子の調節不全を起こす可能性もある（バージリオ他、1993、Proc Natl Acad Sci USA 90:9275-9279）。

【0005】

特定遺伝子座を標的としたノンランダムな染色体の転座はほとんどのヒト造血細胞悪性腫瘍の特徴であり（ハルスカ他、1987、Ann Rev Genet、21:321-345）、いくつかの固型腫瘍に関係している可能性がある（クローズ、1987、Cell 49:155-156）。BおよびT細胞においては、染色体の転座や逆位はしばしば免疫

グロブリン (I g) や T 細胞レセプター (T C R) のための正常な遺伝子組換え過程における誤りの結果として起こる。これらの組み換えの結果として、 I g や T C R 遺伝子が、癌関連遺伝子の近傍へ置換され、そのためにその遺伝子の発現が異常となる (クロース、1987、Cell 41 : 155-156) 。多くの場合、リンパ性悪性腫瘍に見られる組み換えは二種の異なる染色体の間に起こる。

【 0 0 0 6 】

1 4 番染色体バンド q 3 2 . 1 上の T C L 1 遺伝子座は、T 細胞型前リンパ球性白血病 (T-PLL) (プリト-ババプルおよびカトブスキー、1991、Cancer Genet. Cytogenet. 55 : 1-9) 、免疫不全症候群血管拡張性失調症 (A T) に関連した急性および慢性白血病 (ラッソー他、1988、Cell 53 : 137- 1 4 4 ; ラッソー他、1989、Proc Natl Acad Sci USA、86 : 602-606) 、および成人 T 細胞白血病 (バージリオ他、1993、Proc Natl Acad Sci USA、90 : 9275-9279) を含むいくつかの成熟型 T 細胞白血病やリンパ腫に見られる T 細胞レセプター遺伝子の染色体転座や逆位に関係していることが多い。

【 0 0 0 7 】

1 4 番染色体 1 4 q 3 2 . 1 上の T C L 1 腫瘍関連遺伝子も人間における慢性 T 細胞白血病 (T - C L L) の発生に関係しており、染色体転座、t(14;14)(q11;32)、t(7;14)(q35;q32)、または逆位 inv(14)(q11;q32) を原因とする T 細胞レセプター / との並列によってこれらの白血病中で活性化される。ふつうは T C L 1 発現は初期の T 細胞プロジェニター (CD4⁺CD8⁻CD3⁻) や B 細胞系列のリンパ細胞 : プレ B 細胞と B 細胞を発現する未熟 I g M に見られる。I c k プロモーターの制御下における T C L 1 遺伝子導入はマウスにおける T 細胞白血病の原因となった。(バージリオ他、1998、Proc Natl Acad Sci USA、95 : 3885-3889) 。

【 0 0 0 8 】

しかしながら、1 4 q 3 2 . 1 における遺伝子増幅のないいくつかの T 細胞悪性腫瘍の例においては T C L 1 発現の活性化が見られなかった。これは恐らく 1 4 q 3 2 . 1 に少なくともあと一つの腫瘍関連遺伝子が位置しているのかもしれないことを示唆するものである。T C L 1 ファミリーの第二の構成要素である M T C P 1 は X q 2 8 に位置しており、t(X;14)(q28;q11) 転座を持つまれな成熟

T細胞白血病において活性化される。本発明は14q32.1に位置し、これもまたT細胞白血病における14q32.1の組み換えによって活性化されるTCL1遺伝子ファミリーの第三番目の構成要素であるTCL1bの分離および同定(機能解析)に関するものである。

【0009】

14番染色体14q32.1におけるTCL-1遺伝子座の組み換えは、これらの組み換えに関係した他の遺伝子座、すなわちTCR / 遺伝子座もまた14番染色体上のサブバンドq11にあるという点で独特のものである(クローズ他、1985、Science 227:1044-1047;磯辺他、1988、Proc Natl Acad Sci USA、85:3933-3937)。このため、細胞遺伝学的に観察された組み換えは、ただ一つの14番染色体に関係した染色体逆位のinv(14)(q11;q32)か、またはt(14;14)(q11;q32)のような両方の14番染色体に関係した転座、またはよりまれには、7q35におけるTCR 遺伝子座に関係した転座のt(7;14)(q53;q32)である(磯辺他、1988、Proc Natl Acad Sci USA、85:3933-3937)。これらの転座に関係したいくつかの14q32.1の切断点がクローン化され、同定されている(ラッソー他、1988、Cell、51:137-144;ベアー他、1987、Proc Natl Acad Sci USA、84:9069-9073;メングル-ゴー他、1987、MEBO、1:2273-2280;バートネス他、1990、Cancer Genet Cytogenet、44:47:54)。

【0010】

長距離ゲノム地図上の転座転座切断点の位置同定の研究によって約350kbの染色体部位であると推定されるTCL-1遺伝子座が最近クローン化された。(バージリオ他、1993、Proc Natl Acad Sci USA、90:9275-9279)。転座現象にこのように大きな部位が関係しているということは、以前に外套型細胞リンパ腫におけるBCL-1/CDDI遺伝子に関して(辻本他、1984、Science、22、4:1403-1406;ローゼンバーグ他、1991、Proc Natl Acad Sci USA、88:9638-9642;ウィザーズ他、1991、Mol Cell Biol、11:4846-4853;元倉およびアーノルド、1993、Genes Chrom & Cancer、7:89-95)、またバーキットリンパ腫(ダラ-ファベラ他、1982、Proc Natl Acad Sci USA、79:7824-7827;西倉他、1983、Proc Natl Acad Sci USA 80:4822-4826)、および急性T細胞白血病(エリクソン

他、1986、Science、232：884-886）におけるMYC腫瘍関連遺伝子に関して観察されたように、恐らくは何キロベースも離れた距離からTCL-1遺伝子の活性化が起こり得ることを示唆する。

【0011】

TCL-1遺伝子ファミリーの第三番目の構成要素であるTCL1bを完全に分離し、同定（機能解析）することは必然性のある仕事として未だなされずに残っている。T細胞白血病やリンパ腫の原因となる染色体異常に関連したあと一つの腫瘍関連遺伝子の同定は、診断および治療・予防試薬がこの疾患状態を検出、治療および予防する効能をより一層拡大するものである。本発明はTCL1b遺伝子の同定と機能解析によってこの必然性を満足する。

【0012】

前述の部分における参考文献の引用はそれらの参考文献が本発明の従来技術であることを認めていると解釈されるものではない。

【0013】

【発明の概要】

T細胞悪性腫瘍の発生にTCL1遺伝子ファミリーが関係すると思われる。本発明はこの遺伝子ファミリーの新しい構成要素であるTCL-1b遺伝子の構造と同定を開示する。本発明はTCL1bのヌクレオチド配列およびそれらのコードされたTCL1b蛋白質のアミノ酸配列、またそれらの誘導体および類似体、そしてそれらへの抗体に関する。本発明はまた前述のヌクレオチド配列、およびTCL1b蛋白質をコードする等価核酸配列に交雑可能または相補的な核酸に関する。

【0014】

本発明はTCL1b蛋白質、その誘導体または類似体をコードする発現ベクター、およびTCL1b蛋白質、その誘導体または類似体をコードする発現ベクターを含む宿主細胞に関する。

【0015】

本発明はまた染色体異常、特に14q32.1における異常に関連した疾患状態の検出および治療用の診断および治療応用としてのTCL1b遺伝子とそれら

のコード蛋白質の使用に関する。本発明の一具体例において、TCL-1b遺伝子のヌクレオチド配列およびそれらのコードTc1-1b蛋白質のアミノ酸配列は、それぞれ特に14q32.1における染色体異常に関連したT細胞白血病やリンパ腫の疾患状態やTc1-1b蛋白質の発現レベルの増加の検出に役立つ診断試薬としてまたは診断薬の調製において、使用されている。

【0016】

本発明はまたTCL-1b遺伝子のヌクレオチド配列およびそれらのコードTc1-1b蛋白質のアミノ酸配列それぞれの、特に14q32.1における染色体異常に関連したT細胞白血病やリンパ腫の疾患状態やTc1-1b蛋白質の発現レベルの増加の治療・予防における治療・予防薬としての使用に関する。

【0017】

ここで開示されるTCL-1b遺伝子とTc1-1b蛋白質配列は、そしてそれらへの抗体は、染色体異常に関連したT細胞白血病やリンパ腫や、Tc1-1b蛋白質の発現レベルの増加の診断へのアッセイ（検査）において使われる。

【0018】

ここで開示されるTc1-1b蛋白質またはそれらの誘導体や類似体はそれぞれ抗Tc1-1b抗体の生産に使われ、それらの抗体はそれぞれ患者標本におけるTc1-1b蛋白質の検出または測定のためのイムノアッセイ法（免疫学的測定法）において診断的に有用なものである。

【0019】

本発明の別な一面は染色体異常やTc1-1b蛋白質の発現増加に関連した疾患や病態における治療法に関する。特に14q32.1における逆位や転座のような14番染色体の異常はT細胞白血病やリンパ腫に関連している。TCL-1b遺伝子配列やそれらの蛋白質生成物は14番染色体異常関連疾患状態の治療において使われる。抗Tc1-1b抗体は、例えば、それぞれ疾患に関連した過剰発現のTc1-1b蛋白質の活性を中和するときに治療目的で使われる。

【0020】

Tc1-1bまたはmRNAの転写や翻訳を抑制するように設計されたアンチセンスRNAおよびDNA分子とリボザイムを含むオリゴヌクレオチド配列は

T C L 1 bの発現増加に関連した疾患状態の治療において治療用に使われる。

【0021】

T c l 1 bの活動を変調できる蛋白質、ペプチドおよび有機分子はT c l 1 bの異所性発現に関連した疾患状態の治療において使われる。

【0022】

本発明はまたT c l 1 b蛋白質、それらの誘導体または類似体、それらへの抗体、T c l 1 b蛋白質をコードする核酸、誘導体または類似体、そしてT C L - 1 bアンチセンス核酸を含む治療用組成物に関する。

【0023】

本発明はまた、例えば組換え手段による、T c l 1 b蛋白質、誘導体および類似体の生産方法に関する。

【0024】

【発明の実施の形態】

方法

細胞系

【0025】

E B V形質転換リンパ芽球細胞系以外の細胞系はA T C C (メリーランド州、ロックビル) から入手し、10%のウシ胎仔血清と共にR P M I培養基中で成長させた。リンパ芽球細胞系はアルツハイマー病患者の末梢血リンパ球から、以前に報告されたように(グリッチ、C他、1998、Blood、92:368-373) エプスタインバーウイルス(E B V)での形質転換によって形成した。

【0026】

ノーザン、c D N A末端の迅速増幅(R A C E E)および逆転写P C R (R T - P C R)分析

つぎの例外を除き、これらの実験は以前に説明された様に(ペカースキー、Y他、1998、Proc Natl Acad Sci USA、95:8744-8749)行なわれた。ヒト骨髄および胎盤m R N A、ヒト免疫系およびヒト癌細胞系のノーザン法はクロンテック(カリフォルニア州、パロアルト)から購入した。図3 CおよびDのそれぞれの系は3 m gのP o l y A + R N Aを含む。図4 Aに示されるP C Rは多組織c D

NAパネル(クロンテック)と製造業者のプロトコルを使って25~35サイクル行なった。プライマーは:上パネル、TC1、GGCAGCTCTACCCCGGGATGAA(配列番号:1);およびTC39、(配列番号:1);ACAGACCTGAGTGGGACAGGA、(配列番号:2);中パネル、TCLBTCCTCCTTGGCAGGAGTGGTA(配列番号:3);およびTCLC、GAGTTACGGGTGCTCTTGCGT、(配列番号:4);下パネル、対照3'および5'RACE G3PDHプライマー(クロンテック)。図4B、中および下パネル、プライマーは上記と同じ。図4B、上パネル。PCRはプライマーのTC8、ATGGCCTCCGAAGCTTCTGTG、(配列番号:5);およびTC39と共に22サイクル行なった。反応の0.1mlは繰り込まれたプライマーのTC10、TGGTCGTGCGTTCAATCCCT、(配列番号:6);およびTC5、AATCTGGCCATGGTCTGCTATTTTC、(配列番号:7);と共に第二のPCRに15サイクル使われた。RACEプライマーは:TC1(3'RACE用)およびTC5(5'RACE用)であった。

【0027】

パルス領域ゲル電気泳動(PFGE)分析と染色体局在。

【0028】

パルス時間が11時間1-6秒であった以外、PFGE分析は記述されたように(ペカースキー、Y他、1998、Cancer Res、58:3401-3408)行なった。TCL1b遺伝子の染色体局在はGeneBridge 4放射線融合細胞染色体地図パネル(リサーチジェネティックス、アラバマ州、ハンツビル)を用い、製造業者のプロトコルに従って行なった。プライマーはTC1とTC4、TGCTAGGACCAGCTGCTCCATAGA、(配列番号:8)であった。

【0029】

結果

TCL1b遺伝子の同定。

【0030】

いくつかの14q32.1における染色体異常を持つ成熟T細胞白血病において、14q32.1でのTCL1遺伝子の活性化はみられなかった(たきわざ、J、他、1998、Jpn J Cancer Res、89:712-718;坂下、他、1998、Leukemia、12:970-971)。他の未知のTCL1ファミリーが関係している可能性を調べるために、

TCL1およびMTCP1遺伝子生成物に相同の配列をESTデータベースで検索した。一つのEST(アクセス番号AA689513)が相同であることがわかったが、どちらの遺伝子にも完全な対応ではなかった。よって、5'および3'RACE過程とヒト精巣mRNAをcDNA源として使い、全長~1.2kbのcDNAを分離した(配列番号:9)。その1.2kbTCL1b cDNAは128アミノ酸(配列番号:10)の14kDa蛋白質をコードする;(図1)。その中には完璧なコザックコンセンサス配列内の位置28に開始ATGコドンがある。Tcl1およびMtcp1蛋白質と比較して(図1)Tcl1b蛋白質は14アミノ酸挿入があり、Tcl1に30%同一で60%類似しており、Mtcp1に36%同一で63%類似している(図1)。

【0031】

ヒトTCL1b遺伝子の染色体局在のために放射線融合細胞染色体地図パネル(GeneBridge 4)を使った。MITデータベース(<http://www-genome.wi.mit.edu>)でPCRデータを分析することによって、TCL1b遺伝子は14q32において、D14S265のマーカから3.05cRのところに局在された。TCL1b偽遺伝子は5q12-5q13に局在した。TCL1b偽遺伝子には開始ATGやイントロンがなく、オープンリーディングフレームの中間に停止コドンがある。

【0032】

TCL1もTCL1bもどちらも14q32に局在している。したがって、TCL1とTCL1bが物理的に連結しているかどうか解析した。ヒト細菌人工染色体(BAC)ライブラリーにてTCL1とTCL1bを含んでいるいくつかのBACクローンを見つけた。TCL1b遺伝子(配列番号:11);はサイズが6.5kbで、それぞれ189、171、69および697bpの四種のエクソンを含むが(図2)、最初の三つのエクソンだけが蛋白質をコードする。両方の遺伝子のプローブを使った陽性BACクローンのパルス領域分析によってTCL1とTCL1bの遺伝子は逆方向の転写を持ち、16kbの距離のみによって分離されることがわかった(図2)。どちらの遺伝子も以前に公表された14q32.1における転座または逆位のあるT細胞急性リンパ芽球性白血病(ALL)における二組の切断点の間(~160kbの領域)に局在している。(バージリオ、L他、1994

、Proc Natl Acad Sci USA、91 : 12530-12534 ; バージリオ、L他、1993、Proc Natl Acad Sci USA、90 : 9275-9279) 。

【0033】

TCL1b 遺伝子の発現およびT細胞悪性腫瘍における活性化。

【0034】

TCL1とTCL1bの遺伝子が構造、配列および局在において類似していることから、それらが類似した発現パターンを示す可能性がありそうに思えた。これを確かめるために、ノーザンおよびRT-PCR実験をいくつか行なった(図3および図4)。正常な組織におけるノーザン分析は、数日間のX線フィルム感光のあと精巣と胎盤において1.2kb転写が検出された(図3C)以外は、TCL1bに関してほとんど陰性であった(図3A)。しかし、TCL1遺伝子の発現は数日間の感光のあとほとんどの造血組織において検出された(図3A)。半定量的RT-PCR分析(図4A)によって脾臓、扁桃腺、胎児肝臓、胎児腎臓、および胎児胸腺においてTCL1とTCL1bのどちらもが発現していることがわかった。しかし、TCL1b遺伝子は胎盤、腎臓そして胎児脾臓を含むより広い範囲の種類の組織で発現している(図4A)。市販のヒト癌細胞系のノーザン分析によると、TCL1のほうがずっと高いレベルで発現したという違いがあるが(図3B)、TCL1とTCL1bのどちらもラージバーキットリンパ腫の細胞系でのみ発現した(図3B)。

【0035】

TCL1とTCL1bの遺伝子は類似した転写パターンを持ち、物理的に連結されている。したがって、TCL1b遺伝子も14q32における組み換えによって活性化され得るのかどうかを調べた。図3Cおよび図3Dに正常な骨髄およびTCL1が発現しているRBV形質転換リンパ芽球性B細胞系と比較して、14q32.1(SupT11)で転座のあるT白血病細胞系におけるTCL1b遺伝子の活性化が示されている(図3Cおよび図3D、中間のパネル)。TCL1もTCL1bも普通14q32.1異常のない成熟T細胞や成熟T細胞白血病では発現しないので(例えば、14q32.1の異常のないT-ALL MOLT4、図3B、レーン4)、t(14;14)(q11;q32,1)を持つSupT11細胞におけるTCL1およびTCL

1 bの発現は、T C L 1およびT C L 1 bをT細胞レセプターのa / d遺伝子座に並列させることが両方の遺伝子の調節を不全にすることを示唆する。

【0036】

T C L 1 bの発現をより深く調べるためにT C L 1のレベルの上昇したT細胞白血病四件とE B V形質転換リンパ芽球細胞系六件の分析をした。図4 BにT細胞リンパ球性白血病の患者からの一つの白血病試料におけるT C L 1 b発現の活性化が示されている。ヒトT細胞前リンパ球性白血病は1 4 q 3 2 . 1転座または逆位を持ち、T C L 1が過剰発現する(バージリオ、L他、1994、Proc Natl Acad Sci USA、91 : 12530-12534 ; ナーダッシ、M.G.他、1997、Cancer Res、57 : 5452-5456)。T C L 1 b遺伝子はまた六件のE B V形質転換リンパ芽球性B細胞系のうち二件においても発現した(図3 D、上パネル、レーン2-7)。

【0037】

討議

本発明はT C L 1遺伝子ファミリーの新しい構成要素であるT C L 1 bのクローニング、マッピングおよび発現分析を開示する。T C L 1遺伝子とT C L 1 b遺伝子は物理的に連結しており、構造上の類似性、類似した発現パターンおよびT細胞悪性腫瘍への関係を示す。T C L 1遺伝子ファミリーの残りの二つの構成要素が腫瘍関連遺伝子であるので(バージリオ、L他、Proc Natl Acad Sci USA、95 : 3885-3889 ; グリッチ、C、他、1998、Blood、92 : 368-373)、T C L 1 bもまた腫瘍関連遺伝子である可能性が高い。また、T C L 1 bの活性化がT C L 1の活性化を含まない1 4 q 3 2における増幅を伴うT細胞白血病の事例を説明する可能性も高い。

【0038】

T C L 1 b遺伝子はかすかにT C L 1遺伝子よりもXq28におけるM T C P 1遺伝子により相同であるが、二つのT C L 1遺伝子が遺伝子重複の結果である可能性がある。

【0039】

結晶構造によれば(フー、Z.Q.、他、1998、Proc Natl Acad Sci USA、95 : 3413-3418)レチノイドやヌクレオシドまたは脂肪酸のような微小分子の輸送体として

機能するようにも見えるが、TCL1のインビボ（生体内）での機能も、またその腫瘍関連遺伝子のポテンシャルのメカニズムも知られていない。上述の同じ研究（フー、Z.Q.、他、1998、Proc Natl Acad Sci USA、95：3413-3418）はTCL1がダイマーとして機能する可能性を示唆し、TCL1とTCL1bがヘテロダイマーを形成する可能性を示唆した。

【0040】

TCL1とMTCP1の遺伝子組み換えマウスがたった15ヶ月後に成熟T細胞白血病を発病するのだから（バージリオ、L他、1998、Proc Natl Acad Sci USA、95：3885-3889；グリッチ、C他、1998、Blood、92：368-373）、TCL1bの遺伝子組み換えマウスもまた成熟T細胞白血病を遅延して発病するのか、またTCL1とTCL1bの二重遺伝子組み換えマウスは白血病をより早く発病するのかを決定することはかなり興味深いことである。よって、14q32.1における転座や逆位が二つの腫瘍関連遺伝子を同時に活性化して悪性変換を促進することが有り得るように思える。

【0041】

本発明はTCL-1b遺伝子（配列番号：11）のヌクレオチド配列；それらのコードTcl-1b蛋白質（配列番号：10）のアミノ酸配列、またそれらの誘導体と類似体、そしてそれらへの抗体に関する。本発明はまたTCL-1b遺伝子およびそれらのコード蛋白質または誘導体または類似体およびそれらへの抗体の、染色体異常やTCL1bの発現増加に関連した疾患状態の検出および治療／予防のためのアッセイにおける使用に関する。本発明はまたTcl-1b蛋白質、それらの誘導体または類似体、それらへの抗体、Tcl-1b蛋白質をコードする核酸、誘導体または類似体、そしてTCL-1bアンチセンス核酸を含む治療応用に関する。

【0042】

TCL-1b遺伝子は、哺乳動物、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、げっ歯類およびヒトを含む、しかしこれらに限られない、多くの異なる種からのもので、自然配列または異型のもの、または自然、人工的または組換え等あらゆる源からのものである。ここで説明する一具体例において、TCL-1b遺伝子はヒト配列で

ある。T c l - 1 b蛋白質は、哺乳動物、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、げっ歯類およびヒトを含む、しかしこれらに限られない、多くの異なる種に存在するもので、自然配列または異型のもの、または自然、人工的または組換え等あらゆる源からのものである。ここで説明する具体例において、T c l - 1 b蛋白質はヒト蛋白質である。

【0043】

ここでの定義において、T c l - 1 b誘導体はT c l - 1 b配列（配列番号：10）のフラグメントまたはアミノ酸変異体であり、そのフラグメントまたはアミノ酸変異体が全長T c l - 1 b蛋白質に関連する生物学的活性の一つまたはそれ以上を示すことが条件である。この生物学的活動には、抗原性、つまり、抗T C L - 1 b抗体に結合する能力や、免疫源性、つまりT c l - 1 b蛋白質を結合することのできる抗体を生成する能力が含まれるが、これらに限られてはいない。

【0044】

本発明は少なくとも10のアミノ酸、または少なくとも25のアミノ酸、または少なくとも50のアミノ酸、または少なくとも114のアミノ酸からなるT c l - 1 b蛋白質のフラグメントを提供する。それらの誘導体や類似体をコードする核酸もまたこの発明の範囲に属する。好ましいT c l - 1 b蛋白質変異体はT c l - 1 bアミノ酸配列の少なくとも25、少なくとも50、少なくとも75、または少なくとも100の近接アミノ酸において自然T c l - b蛋白質に少なくとも70%のアミノ酸配列相同性を共有するものであり、特に好ましいT c l - 1 b蛋白質変異体は少なくとも80%のアミノ酸配列相同性を共有するものであり、そして別の特に好ましいT c l - 1 b蛋白質変異体は少なくとも90%のアミノ酸配列相同性を共有するものである。ここでの使用において、アミノ酸配列相同性とは同一のアミノ酸残基を持つアミノ酸配列またはアミノ酸残基に保守的变化を含むアミノ酸配列のことである。別の一具体例において、T c l - 1 b相同性蛋白質は引用された長さのアミノ酸において自然T c l - 1 b蛋白質に同一の配列を前述の割合だけ共有するものである。

【0045】

TCL-1b遺伝子(配列番号:11);は2群の切断点によってバンド結合された領域に局在する14番染色体14q32.1の領域に局在する。TCL1とTCL-1bの遺伝子構造、配列および局在が類似しているため、それらの発現パターンを比較した。TCL1bの正常組織における発現はほとんど陰性であった。(図3A)。しかし、TCL1遺伝子発現はほとんどの造血組織に検出された。またTCL1もTCL1bも脾臓、扁桃腺、胎児肝臓及び胎児胸腺において発現がみられた。図4Aに示すように、TCL1b遺伝子は胎盤、腎臓および胎児脾臓を含むより広い範囲の種類の組織において発現がみられた。生検した細胞や組織のような患者の試料におけるTCL-1b mRNAの検出は特定の14番染色体異常やTcl-1b蛋白質の発現増加に関連したT細胞白血病やリンパ腫の存在の指標として使われる。また、本発明のTcl-1bアミノ酸配列は患者の試料におけるTcl-1bの検出や測定のためのイムノアッセイ(免疫学的測定法)に有用な抗体を生成するために使われる。この抗TCL-1b抗体はT細胞白血病やリンパ腫に関連したTcl-1bレベルの増加の検出や測定のための診断イムノアッセイに使われる。

【0046】

本発明によれば、Tcl-1b蛋白質(配列番号:10)、フラグメントのような誘導体、またはその類似体のポリヌクレオチド配列コードを、Tcl-1b蛋白質の発現を支配する組換えDNA分子の生成に好適な発現ベクター、つまり挿入された蛋白質コード配列の転写や翻訳に必要な要素を含むベクターに挿入することができる。このTCL-1bポリヌクレオチド配列また他のポリヌクレオチドやそれらの相補鎖は核酸ハイブリダイゼーションアッセイ、サザンおよびノーザン法分析等にも使われる。一具体例において、ヒトTCL-1b遺伝子(配列番号:11)、またはヒトTCL-1b遺伝子の機能的に活動的な部分をコードする配列が発現している。また別の具体例においては、ヒトTCL-1b遺伝子の誘導体またはフラグメントが発現している。

【0047】

TCL-1b遺伝子がコードする配列

発現した配列標識(EST)データベースアクセス番号AA689513番への参照で

ここで開示された特定の一具体例において、この発明はヒト T C L - 1 b 遺伝子 (配列番号: 1 1) の核酸配列に関する。この発明の好適なしかし限定的ではない一面において、ヒト T C L - 1 b c D N A 配列 (配列番号: 9) ; が、T C L 1 遺伝子ファミリーの他の構成要素である T C L - 1 と M T C P 1 に相同的な E S T データベース (アクセス番号 AA689513番) 中に同定された。この配列は、下記のように分離され 1 . 2 キロベース全長 c D N A としてクローン化された。この発明はまた前述の配列に交雑可能なまたは相補的な核酸配列、または、同等な核酸配列もまた T c l - 1 b 蛋白質生成物をコードするという意味で、前述の配列に同等な核酸配列にも関する。

【 0 0 4 8 】

好適な一面において、公知の T c l - 1 b 配列 (配列番号: 9) を再現するオリゴヌクレオチドプライマーを使ってライブラリーにおける好ましい核酸配列を増幅するためにポリメラーゼ鎖反応 (P C R) が使われる。このプライマーは R N A または D N A 源、好ましくは c D N A ライブラリーから対象配列を増幅するために使われる。当業者には公知のように、P C R はパーキン-エルマーシータス温熱サイクラーと T a q ポリメラーゼを使って行なう。増幅される D N A は任意の真核種からの m R N A または c D N A またはゲノム D N A である。P C R 増幅反応で使うためにいくつかの異なる変性プライマーを合成する。クローン化された T C L - 1 b 遺伝子と本発明の T C L - 1 b 遺伝子 (配列番号: 1 1) のヌクレオチド配列の相同性の度合いの高低調節を可能にするために P C R 反応をブライムするときのハイブリダイゼーション 条件の厳しさもまた変化させる。

【 0 0 4 9 】

T C L - 1 b 遺伝子の一部分、対立遺伝子上のまたは遺伝子多形の、または T C L - 1 b 遺伝子の種相同性の増幅の成功で示されたように、今後はその部分は分子的にクローン化および配列され、そして完全な c D N A またはゲノムクローンを分離するためのプローブとして使用される。これによって、その遺伝子の完全なヌクレオチド配列の決定、その発現分析、そして将来の分析のための蛋白質生成物の生産が可能になる。このようにして T c l - 1 b 蛋白質をコードするその他の遺伝子の同定が可能になる。

【0050】

潜在的に、どの真核性細胞でもTCL-1b遺伝子の分子的クローン化の核酸源として使うことができる。Tcl-1bをコードする核酸配列は、例えば、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、鳥類、ウマ、イヌ、げっ歯類およびその他の霊長類源から、分離される。DNAは当技術で公知の、例えばクローン化DNA（例：DNA「ライブラリー」）、化学合成、cDNAクローン化、または好ましい細胞から精製したゲノムDNAまたはそのフラグメントのクローン化等、標準手法で入手する。（参照例：サムブルック他、1989、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、2nd Ed.、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、ニューヨーク州、コールドスプリングハーバー；グローバー、D.M.（編）、1985、DNA Cloning: A Practical Approach、MRLプレス、Ltd.、英国、オックスフォード、Vol. I、II）好ましい源は14q32.1染色体異常関連白血病の白血病細胞のcDNAである。cDNAから誘導されたクローンがTcl-1bエクソン配列のみを含むのに対して、ゲノムDNAから誘導されたクローンは蛋白質コード領域に加えて調節およびイントロンDNA領域を含む。本発明の特定の一具体例において、ゲノム配列は10キロベース(kb)以下のもの、または20kb以下のもの、または50kb以下のもの、または70kb以下のものである。源が何であれ、遺伝子はその遺伝子の繁殖に適したベクターに分子的にクローン化されるべきである。特定の一具体例において、TCL-1b遺伝子配列の分離のための核酸の好ましい源はB前駆細胞からである。

【0051】

ゲノムDNAからの遺伝子の分子的クローン化において、DNAフラグメントが生成され、一部が好ましい遺伝子をコードする。DNAは特定の部位において種々の制限酵素を使って分割される。あるいは、マンガンの存在中におけるDNAseをDNAをフラグメントするために使う、または、例えば音波破碎によって、DNAを物理的に切る。DNAの線状フラグメントをその後、アガロースおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動法やカラムクロマトグラフィーを含むがそれらに限られない、標準技術によってサイズごとに分別する。

【0052】

DNAフラグメントが生成されたら、数々の方法で好ましい遺伝子を含む特定のDNAフラグメントを同定する。例えば、本発明のTCL-1b遺伝子(配列番号:11)またはその特定なRNA、またはそのプローブやプライマーのようなフラグメントを分離し、標識表示し、そして生成されたTCL-1b遺伝子を検出するためにハイブリダイゼーションアッセイにおいて使う(ベントン、W、およびデービス、R、1977、Science、196:180; グランスタイン、M、およびホッジズ、D、1975、Proc Natl Acad Sci USA、72:3961)。プローブに実質的な配列相同性を共有するDNAフラグメントは厳しい条件下でハイブリッド形成する。ここで使われる「厳しい条件」とは、(バージリオ、L他、1994、Proc Natl Acad Sci USA、91:12530-12534)例えば、50における0.015 M NaCl / 0.015 M クエン酸ナトリウム / 0.1% SDSのように低いイオン強度と高温を洗浄に採用する; (ナーダッシ、M.G.他、1997、Cancer Res、57:5452-5456)ハイブリダイゼーション中に、例えば0.1%のウシ血清アルブミン / 0.1%のフィコール / 0.1%のポリビニルピロリドン / 50 mAのpH 6.5の燐酸ナトリウム緩衝液と750 mMのNaClを含む50%(容量/容量)ホルムアミドのような、ホルムアミドのような変性剤と75 mMのクエン酸ナトリウムを42度Cで採用する; または(3)50%のホルムアミド、5倍のSSC(0.75 M NaCl, 0.075 M ピロリン酸ナトリウム、5倍のデンハート溶液、音波破碎したサケ精子DNA(50 g/ml)、0.1%のSDS、および10%の硫酸デキストランを42度Cで、また0.2倍SSCおよび0.1% SDS中で42度Cでの洗浄を採用するようなハイブリダイゼーション条件のことである。

【0053】

適切なフラグメントはまた制限酵素の消化およびフラグメントのサイズと公知の制限地図に従って予測されるサイズとの比較によって同定される。それ以上の選択は遺伝子の性状に基づいて行なわれる。あるいは、遺伝子の存在はその発現した生成物の物理的、化学的、または免疫学的性状に基づいたアッセイによって検出される。例えば、cDNAクローン、または適切なmRNAをハイブリッド選択するゲノムDNAクローンは、類似したまたは同一の電気泳動移動、等電点

解析での挙動、蛋白質分解消化地図、T c l - 1 bに公知の結合活動や抗原性状を持つ蛋白質を生成するものが選ばれる。あるいは、例えば、イライザ(エンザイム-リンクドイムノソルベントアッセイ)型の手法におけるように、T c l - 1 b蛋白質は標本抗体を推定上T c l - 1 bを発現するクローンに結合することによって同定することもある。

【0054】

T C L - 1 b遺伝子はまた核酸ハイブリダイゼーションに続くインビトロな翻訳によるm R N A選択によっても同定される。この手法において、ハイブリダイゼーションで相補的m R N Aを分離するためにフラグメントを使う。このDNAフラグメントは別のT C L - 1 b遺伝子の使用可能な精製したT C L - 1 b D N Aを再現することもある。分離m R N Aの分離生成物のインビトロ翻訳生成物の免疫沈降反応分析または機能アッセイはそのm R N Aを同定し、よって、好ましい配列を含む相補的D N Aフラグメントを同定する。その上、T c l - 1 b蛋白質に特に抗する固定抗体への細胞から分離されたポリソームの吸着によって特定のm R N Aが選択されることもある。放射標識表示されたT C L - 1 b c D N Aは選択されたm R N A(吸着ポリソームから)を鋳型として使い、合成される。その放射標識m R N Aまたはc D N Aはその後他のゲノムD N Aフラグメントの中からT C L - 1 b D N Aフラグメントを同定するプローブとして使われる。

【0055】

T C L - 1 bゲノムD N Aを分離する方法には他に、遺伝子配列そのものを公知の配列から化学的に合成するか、c D N AをT c l - 1 b蛋白質をコードするm R N Aにする等があるが、これらに限られない。例えば、T c l - 1 b細胞のc D N Aクローン化に役立つR N Aは、B前駆急性白血病細胞や細胞表面I g Mを発現し免疫グロブリンを分泌しない風土病性バーキットリンパ腫のように、T c l - 1 bを発現する細胞から分離される。その他の方法は当業者に公知であり、本発明の範囲に属する。

【0056】

同定および分離された遺伝子はその後適当なクローン化ベクターに挿入される

。当技術において公知の多くのベクター-宿主系が使われ得る。このベクターにはプラスミドや変性ウイルスが含まれるが、それらに限られず、またそのベクター系は使用宿主細胞に適合しなければならない。このベクターには、ラムダ誘導体のようなバクテリオファージやPBR322やpUCプラスミド誘導体のようなプラスミドが含まれるが、こららに限られない。クローン化ベクターへの挿入は、例えばDNAフラグメントの相補的凝着末端を持つクローン化ベクターへの結さつを伴うことができる。しかし、DNAをフラグメントするのに使った相補的制限部位がクローン化ベクターに存在しないと、DNA分子の末端が酵素的に修飾されることがある。あるいは、任意の好ましい部位をヌクレオチド配列（リンカー）をDNA末端に結さつすることによって生成することもできる；これらの結さつリンカーは制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特定の化学合成オリゴヌクレオチドを含む。他の一方法において、分割ベクターとTCL-1b遺伝子は単独重合的テーリングによって修飾される。組換え分子は変換、トランスフェクション、感染、電気穿孔法またはその他の当業者に公知の方法で宿主細胞に導入され、数多くの遺伝子のコピーが生成される。

【0057】

他の一方法において、好ましい遺伝子は「ショットガン」的方法で適したクローン化ベクターに挿入された後、同定および分離される。その好ましい遺伝子の例えばサイズ分割による強化がクローン化ベクターへの挿入の前に行なわれる。

【0058】

特定の具体例において、宿主細胞の、分離TCL-1b遺伝子、cDNA、または合成DNA配列を取り入れた組換えDNA分子を含む変換によって、その遺伝子のコピーが複数生成できるようになる。よって、組換えDNA分子は形成転換体から分離され、そして、必要なら、挿入遺伝子を分離した組換えDNAから検索し、成長する形成転換体によってその遺伝子は大量に入手される。

【0059】

Tcl-1bコードまたはノンコーディング配列の一部を含む、またはTcl-1b蛋白質の一部をコードする（例えば、PCRで使われるプライマー）オリゴヌクレオチドは当業者に公知の方法で合成される。このオリゴヌクレオチドは

好ましくは8から25ヌクレオチドの範囲のサイズを持つ。ここにおける特定の
一具体例において、このオリゴヌクレオチドは15から25ヌクレオチドまたは
18から25ヌクレオチドの範囲のサイズを持つ。

【0060】

TCL-1b遺伝子の発現

本発明によると、Tcl-1b蛋白質、フラグメントのような誘導体、または
その類似体をコードするポリヌクレオチド配列は、適当な発現ベクター、つまり
Tcl-1b蛋白質の発現を支配する組換えDNA分子の生成のための、挿入蛋
白質コード配列の転写および翻訳に必要な要素を含むベクターに挿入されること
ができる。このTcl-1bポリヌクレオチド配列また他のポリヌクレオチドま
たはそれらの相補体はまた核酸ハイブリダイゼーションアッセイ、サザンおよび
ノーザン法分析等においても使われ得る。一具体例において、ヒトTCL-1b
遺伝子、またはヒトTCL-1b遺伝子の機能的に活動的な部分をコードする配
列が発現している。さらに別の具体例においては、ヒトTCL-1b遺伝子の
誘導体またはフラグメントが発現している。

【0061】

遺伝子コードのもつ「ゆらぎ」のために他のDNA配列で実質的に同一のまた
は機能的に同等のTcl-1bアミノ酸配列をコードするものも本発明の範囲に
属する。このDNA配列の中には厳しい条件下でヒトTcl-1b配列に雑種を
作れるものが含まれる。

【0062】

本発明によって使われる改変DNA配列には、異なるヌクレオチド残留物の欠
失、追加、置換を含み、結果的に同一のまたは機能的に同等の遺伝子生成物をコ
ードする配列になるものが含まれる。遺伝子生成物自身がTcl-1b配列中の
アミノ酸残基の欠失、追加、または置換を含み、結果的に沈黙（アミノ酸配列の
変化しない）変化を持ち、よって機能的に同等なTcl-1b蛋白質を生成して
いることもある。このアミノ酸置換は残留物の極性、電荷、溶解性、疎水性、親
水性、そして/または両親媒性に基ついて行なわれる。例えば、陰性電荷のアミ
ノ酸にはアスパラギン酸やグルタミン酸が含まれ；陽性電荷のアミノ酸にはリシ

ンやアルギニンが含まれ；類似した親水性値を持つ非荷電のアミノ酸にはロイシン、イソロイシン、バリン；グリシン、アラニン；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；フェニルアラミン、チロシンがある。

【0063】

本発明のDNA配列は、TCL-1bコード配列を遺伝子生成物の処理や発現を修飾する変更等を含むがそれに限られない種々の目的のために改変させるために、作られる。例えば、特定部位の突然変異誘発、新制限部位の挿入、燐酸化等、当業者に公知の技法を使って導入された変異である。

【0064】

この発明の別の一具体例において、TCL-1b遺伝子配列またはその誘導体がキメラ融合蛋白質をコードするために非TCL-1b遺伝子配合に結されている。融合蛋白質はTcl-1b配列と非Tcl-1b蛋白質配列のあいだに局在する介在部位を含んで作られており、Tcl-1b蛋白質がノンTcl-1b部分から分割できるようになっている。特定の一具体例において、この融合蛋白質におけるTcl-1bアミノ酸配列はTcl-1b蛋白質配列の少なくとも10の近接アミノ酸、少なくとも25の近接アミノ酸、少なくとも50の近接アミノ酸、少なくとも75の近接アミノ酸、少なくとも100の近接アミノ酸、または少なくとも114のアミノ酸を含む。

【0065】

この発明の他の一具体例において、Tcl-1bのコード配列は全部または一部技術に公知の化学的方法を使って合成さる。参照例：カルーサーズ他、1980、Nuc Acids Res Symp Ser、7:215-233；クレアおよびホーン、1980、Nuc Acids Res、9(10):2331；マテウシおよびカルーサーズ、1980、Tetrahedron Letters 21:719；そしてチョウおよびケンブ、1981、Nuc Acids Res 9(12):2807-2817。あるいは、蛋白質そのものがTcl-1bアミノ酸配列の全体または一部を合成する化学的方法を使って生成される。例えば、ペプチドは固相技法で、樹脂から分割して、調製用高性能液体クロマトグラフィーで精製して合成される。（参照例：クレイトン、1983、Proteins Structures And Molecular Principles、W.H.フリーマンカンパニー、ニューヨーク、pp. 50-60）。合成ペプチドの組成はアミノ酸

分析または配列決定法によって確認できる（例：エドマン分解手法；参照：クレイトン、1983、Proteins Structures And Molecular Principles、W.H.フリーマンカンパニー、ニューヨーク、pp. 34-49）。

【0066】

生物学的に活性なT c l - 1 b蛋白質またはその誘導体を発現するために、T c l - 1 b蛋白質またはその誘導体をコードするポリヌクレオチド配列を適当な発現ベクターに挿入する。つまり、挿入コード配列の転写および翻訳に必要な要素を含むベクターである。T C L - 1 b遺伝子生成物また宿主細胞または組換えT c l - 1 b発現ベクターでトランスフェクトされたまたは変換された細胞系は種々の目的に使われる。これらには免疫特異的にT C L - 1 b蛋白質に結合する抗体の生成（つまり、モノクローナルまたはポリクローナル）が含まれるが、これに限られてはいない。抗T C L - 1 b抗体は患者試料におけるT C L - 1 b蛋白質のレベルの検出や測定に使われる。

【0067】

発現系

T C L - 1 bコード配列と適当な転写 / 翻訳制御信号を含む発現ベクターの構成のために当業者に公知の方法を使う。これらの方法にはインビトロ組換えDNA技法、合成技法、そしてインビボ組換え / 遺伝子組換えが含まれる。例えば、サムブロック他、1989、Molecular Cloning、A Laboratory Manual 2nd ed . .、ニューヨーク州、コールドスプリングハーバーラボラトリー、およびオスベル他、1989、Current Protocols in Molecular Biology、グリーンパブリッシングアソシエツアンドワイリーインターサイエンス、ニューヨークを参照。

【0068】

T c l - 1 bコード配列を発現するために種々の宿主発現ベクター系が使われる。これらには、T c l - 1 bコード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで変換した細菌のような微生物；T c l - 1 bコード配列を含む組換えイースト発現ベクターで変換されたイースト；T c l - 1 bコード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター

(例、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV) またはTc1-1bコード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例、Tiプラスミド)に感染した植物細胞系；または動物細胞系が含まれるが、これらに限られてはいない。これらの系の発現要素は強度や特異性において変化する。使われるホスト/ベクター系によって、構成性および誘導性プロモーターを含む任意の適切な転写および翻訳要素が発現ベクターにおいて使われる。例えば、細菌系のクローン化ではバクテリオファージラムダ、*plac*, *ptrp*, *ptac* (*ptrp-lac* ハイブリッドプロモーター)のような誘導性プロモーターが使われる；昆虫細胞系のクローン化では、バキュロウイルスポリヘドリンプロモーターのようなプロモーターが使われる；植物細胞系のクローン化では、植物細胞のゲノムから誘導されたプロモーター(例、ヒートショックプロモーター；RUBISCOの小部分ユニット用のプロモーター；クロロフィルa/b結合蛋白質用のプロモーター)または植物ウイルスから誘導されたプロモーター(例、CaMVの35S RNAプロモーター；TMVのコート蛋白質プロモーター)が使われる；哺乳動物細胞系のクローン化では、哺乳動物細胞のゲノムから誘導されたプロモーター(例、メタロチオネインプロモーター)または哺乳動物ウイルスから誘導されたプロモーター(例、アデノウイルス遅延プロモーター；種痘ウイルス7.5kプロモーター)が使われる；Tc1-1b DNAの複数のコピーを含む細胞系の生成においては、SV40-、BPV-、およびEBV-ベースのベクターが適当な選択マーカーと共に使われる。

【0069】

細菌系においては、発現したTc1-1b蛋白質の使用意図によって、いくつかの発現ベクターが優位に選択される。例えば、抗体の生成のためにTc1-1b蛋白質が大量に生成されるときは、すぐに精製できる融合蛋白質生成物のレベルが高い発現を支配するベクターが好ましい。このベクターには、ハイブリッドAS-lac Z蛋白質が生成されるようにlac Zコード領域と共にフレームのベクターにTc1-1bコード配列が結さつする、E.大腸菌発現ベクターpUR278(ルーサー他、1983, EMBO J、2:1791)；pINベクター(井上および井上、1985, Nucleic Acids Res、13、3101-3109)；バンヒークおよびシュースター、1989, J Bio

I Chem、264 : 5503-5509) ; 等が含まれるが、これらに限られない。p G E X ベクターはまた異種ポリペプチドをグルタチオンSトランスファラーゼ (G S T) を持つ融合蛋白質として発現するのに使われる。一般にそれらの融合蛋白質は溶解性でグルタチオン-アガロースビードへの吸着に続く遊離グルタチオンの存在中における溶出によって溶解細胞から簡単に精製される。P G E X ベクターは当該クローン化ポリペプチドをG S T 部分から放出するためにトロンピンまたはX a 因子プロテアーゼ分割部位を含むようにできている。

【 0 0 7 0 】

イーストにおいては、構成性または誘導性プロモーターを含むいくつかのベクターが使われる。参考文献 : Current Protocols in Molecular Biology、Vol. 2、1988、オースベル他編、Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience、第13章; グラント他、1987、Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology、ウーおよびグロスマン編、1987、Acad. Press、ニューヨーク、153:516-544 ; グローバー、1986、DNA Cloning. Vol. II、IRL Press、ワシントンDC、第3章; ビター、1987、Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology、バーガーおよびキンメル編、Acad. Press、ニューヨーク、152:673-684; The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces、1982、ストラザーン他編、Cold Spring Harbor Press、Vols. IおよびII。

【 0 0 7 1 】

植物発現ベクターが使われる場合、いくつかのプロモーターの内任意のものがT c 1 - 1 b コード配列発現の動因となる。例えば、C a M V の 3 5 S R N A および 1 9 S R N A プロモーターのようなウイルス性プロモーター (ブリッソン他、1984、Nature 310 : 511-514)、またはT M V のコート蛋白質プロモーター (高松他、1987、EMBO J、6:307-311) が使われる ; あるいは、R U B I S C O の小部分ユニットのような植物プロモーター (コルツジ他、1984、EMBO J、3 : 1671-1680 ; プログリー他、1984、Science、224 : 838-843) ; またはダイズhsp17.5-Eまたはhsp17.3-Bのようなヒートショックプロモーター (ガーリー他、1986、Mol Cell. Biol、6 : 559-565) が使われる。これらの構造物はT i プラスミド、R i プラスミド、植物ウイルスベクター、直接D N A 変換、マイクロインジェクシ

オン、エレクトロポレーション等によって植物細胞に導入される。これらの技法の参考文献として、例えば、ワイスバックおよびワイスバック、1988、Methods for Plant Molecular Biology、Academic Press、ニューヨーク、第VIII節、pp. 421-463；グリアーソンおよびコーリー、1988、Plant Molecular Biology、2nd Ed.、Blackie、ロンドン、7-9章がある。

【0072】

T C L - 1 b 遺伝子の発現に使われ得る他の一発現系は昆虫系である。この一系において、オートグラフィカリフォルニカ核ポリヘドロシス ウイルス (A c N P V) が異種遺伝子を発現するベクターとして使われている。このウイルスはスポドプテラフルジペルダ細胞において成長する。T c l - 1 b コード配列はそのウイルスの非必須領域 (例えばポリヘドリン遺伝子) にクローン化され、AcNPVプロモーター (例えばポリヘドリンプロモーター) の支配下におかれる。T c l - 1 b コード配列挿入の成功によってポリヘドリン遺伝子が不活性化され、非閉塞組換えウイルス (例：ポリヘドリン遺伝子によってコードされた蛋白質性コートを欠くウイルス) が生成される。これらの組換えウイルスはその後その中で挿入遺伝子が発現するスポドプテラフルジペルダ細胞を感染するために使われる。(参照例：スミス他、1983、J Virol、46：584；スミス、米国特許第4,215,051号)。

【0073】

哺乳動物の宿主細胞においては、いくつかのウイルス性に基いた発現系が使われる。アデノウイルスが発現ベクターとして使われる場合、T c l - 1 b コード配列は例えば遅延プロモーターや3連リーダー配列のようなアデノウイルス転写/翻訳制御複合体に結さつされる。そしてキメラ遺伝子がインビトロまたはインビボ組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入される。ウイルス性ゲノムを非必須領域 (例：E1またはE3領域) に挿入すると、感染宿主中で生存可能なそしてT c l - 1 b 発現可能な組換えウイルスができる。(参照例：ローガン及びシエンク、1984、Proc Natl Acad Sci USA、81：3655-3659)。あるいは、種痘7.5Kプロモーターが使われる。(参照例：マケット他、1982、Proc Natl Acad Sci US A、79：7415-7419；マケット他、1984、J Virol、49：857-864；パニカリ他、1982、

Proc Natl Acad Sci USA, 79 : 4927-4931)。

【0074】

挿入 T c l - 1 b コード配列の効率的翻訳のために特定の開始信号が必要なことがある。これらの信号には A T G 開始コドンと隣接配列が含まれる。自身の開始コドンと隣接配列を含む T C L - 1 b 遺伝子全部が適当な発現ベクターに挿入される場合は、それ以外の翻訳制御信号は不必要なことがある。しかし、T c l - 1 b コード配列の一部のみが挿入されて 5 ' 末端を欠く場合は、A T G 開始コドンを含む外因性翻訳制御信号を与える必要がある。さらに、挿入部全体の翻訳を確実にするためにその開始コドンは T c l - 1 b コード配列の読み枠と同相でなければならない。これらの外因性翻訳制御信号と開始コドンは自然および人工的を含み種々の源からのものである。適当な転写エンハンサー、転写ターミネーター等を含むことによって発現効率を上げることができる。(参照: ビットナー他、1987、Methods in Enzymol、153 : 516-544)。

【0075】

加えて、特定の好ましい方法で挿入配列発現を変化する、または遺伝子生成物を修飾および処理する宿主細胞株が選ばれる。この蛋白質生成物の修飾(例: 磷酸化)および処理(例: 分割)は蛋白質の機能にとって大切なことがある。それぞれの異なる宿主細胞は蛋白質の翻訳後処理および修飾の特性的そして特定のメカニズムを持っている。発現された異種蛋白質の適正な修飾および処理を確実にするために適当な細胞系や宿主系が選ばれる。この目的のために一次転写の適切な処理用の細胞機構を持つ真核性宿主細胞と遺伝子生成物の磷酸化が使われる。これらの哺乳動物宿主細胞には CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、WI38 等が含まれるが、これらに限られてはいない。

【0076】

組換え蛋白質の長期の高収率生成のためには、安定発現が好ましい。例えば、T c l - 1 b 蛋白質を安定して発現する細胞系が作られている。ウイルス性複製源を含む発現ベクターを使う代わりに、宿主細胞は適当な発現制御要素(例: プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル酸化部位、等)に制御される T C L - 1 b D N A、および選択可能なマーカーを使って変

換される。

【0077】

異種DNA導入の後、作られた細胞を強化培地で1-2日育て、その後選択培地に切り換える。組換えプラスミド中の選択可能マーカークが選択に抵抗を与え、細胞が安定してプラスミドを染色体中に取り込み細胞増殖巣を形成できるようにし、それがクローン化され細胞系へと拡張される。この方法はTc1-1b蛋白質を発現する細胞系の作成に使用して有利である。本発明はTc1-1b蛋白質が細胞に発現するようにTc1-1b蛋白質をコードする組換え発現ベクターで変換された宿主細胞を培養し、発現したTc1-1b蛋白質を回収することによって組換えTc1-1b蛋白質を生産する方法を提供する。

【0078】

単純ヘルペスチミジンキナーゼ(ウィグラー他、1977、Cell、11:223)、ヒポキサンチン-グアニンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ(スズィバルスカおよびスズィバルスキー、1962、Proc Natl Acad Sci USA、48:2026)およびアデニンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ(ローウィ他、1980、Cell、22:817) 遺伝子を含む、しかしこれらに限られない、いくつかの選択系が使われ、これらはそれぞれtk-、hgprrt-、またはaprrt-細胞において使われ得る。また、メトトレキセートに抵抗を与えるdhfr(ウィグラー他、1980、Natl Acad Sci USA、77:3567; オヘア他、1981、Proc Natl Acad Sci USA、78:1527); ミコフェノリン酸に抵抗を与えるgpt(マリガンおよびバーク、1981、Proc Natl Acad Sci USA、78:2072); アミノグリコシドG-418に抵抗を与えるneo(コルベレ-ガラピン他、1981、J Mol Biol、150:1); そしてヒグロマイシンに抵抗を与えるhygro(サンテレ他、1984、Gene、30:147)の選択ベースとしてアンチメタボライト抵抗が使われる。最近、この他の選択可能遺伝子が記述されている。主なものは、細胞にトリプトファンの代わりにインドールを使わせるtrpB; 細胞にヒスチジンの代わりにヒスチノールを使わせるhisD(ハートマンおよびマリガン、1988、Proc Natl Acad Sci USA、85:8047); そしてオルニチンデカルボキシラーゼ抑制因子、2-(ジフルオロメチル)-DL-オルニチン、DFMOに抵抗を与えるオルニチンデカルボキシラーゼ(マクコンローグ、L、1987、Current Communications in M

olecular Biology中、コールドスプリングラボラトリー編)である。

【0079】

T c l - 1 bを発現する遺伝子導入体または形質転換体の同定

コード配列を含み、生物学的に活性な遺伝子生成物を発現する宿主細胞は少なくとも大きく分けて次の4種の方法で同定される。(a) DNA-DNAまたはDNA-RNA ハイブリダイゼーション;(b)「マーカ-」遺伝子機能の存在または不在;(c)宿主細胞におけるT c l - 1 b mRNA転写の発現によって測定される転写レベルの評価;そして(d)イムノアッセイ(免疫学的測定法)または生物学的活性によって測定される遺伝子生成物の検出。

【0080】

第一の方法では、それぞれT c l - 1 bコード配列、または部分、またはその誘導体に相同なヌクレオチド配列を構成するプローブを使ったDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションによって発現ベクターに挿入されたT c l - 1 bコード配列の存在を検出する。

【0081】

第二の方法では、組換え発現ベクター/ホスト系は特定の「マーカ-」遺伝子機能(例:チミジンキナーゼ活動、抗生物質への抵抗、メトトレキセートへの抵抗、変換発現型、バキュロウイルス中の閉塞体形成等)の存在または不在を基に同定、選択される。例えば、ヒトT c l - 1 bコード配列がベクターのマーカ-遺伝子配列内に挿入されると、T c l - 1 bコード配列を含む組換え細胞はマーカ-遺伝子機能の不在によって同定される。あるいは、マーカ-遺伝子がT c l - 1 b配列と連合してT c l - 1 bコード配列発現の制御に使われた同じまたは異なるプロモーターの制御下におかれる。誘導または選択への反応におけるマーカ-の発現がT c l - 1 bコード配列の発現を示す。

【0082】

第三の方法では、T C L - 1 b遺伝子の転写活動をハイブリダイゼーションアッセイによって評価する。例えば、RNAをT c l - 1 bコード配列または転写ノンコーディング配列またはそれらの特定の部分へ相同性を有するプローブを使ってノーザン法で分離及び分析する。あるいは、宿主細胞の全核酸を抽出し、こ

のプロープへのハイブリダイゼーションを定量的にアッセイする。

【0083】

第四の方法では、T c l - 1 b 蛋白質生成物のレベルを例えばウエスタン法、放射線同位元素を用いた免疫沈降法、酵素結合イムノアッセイ等のイムノアッセイ（免疫学的測定法）によって免疫学的に評価する。

【0084】

発現遺伝子生成物の精製

T C L - 1 b 遺伝子配列を発現する組換えを同定したら、その遺伝子生成物を分析する。これは生成物の放射性標識表示を含む物理的または機能的性状に基づくアッセイによって行ない、その後ゲル電気泳動法、イムノアッセイ、または当業者に公知のその他の検出方法で分析する。

【0085】

T c l - 1 b 蛋白質を同定したら、クロマトグラフィー（例：イオン交換、アフィニティー、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、吸収率較差溶解度、または任意の他の蛋白質精製標準技法を含む標準方法でそれを分離、精製する。機能性状を任意の適切なアッセイで評価する。

【0086】

あるいは、組換え体によってT c l - 1 b 蛋白質を同定したら、その蛋白質のアミノ酸配列を、その組換え体に含まれるキメラ遺伝子のヌクレオチド配列から演繹する。結果として、その蛋白質を技術に公知の標準的化学法で合成する（参照例：ハンカピラー他、1984、Nature、310：105-111）。

本発明の特定の一具体例において、このT c l - 1 b 蛋白質は、組換えDNA技法で生成されようが化学合成法で生成されようが、一次アミノ酸配列として、図1（配列番号：10）に表わすアミノ酸配列の全部または一部を実質的に含むもの、またフラグメントおよび他の誘導體、そしてその類似体を含むが、それに限られてはいない。

【0087】

T c l - 1 b への抗体の生産

この発明によれば、T c l - 1 b 蛋白質、そのフラグメントまたはその他の誘

導体、またはその類似体はそのイムノゲンを認識する抗体を生産するイムノゲンとして使われる。この抗体にはポリクローン性、モノクローン性、キメラ、単鎖、Fabフラグメント、そしてFab発現ライブラリーが含まれるが、これらに限られてはいない。特定の一具体例において、ヒトTc1-1b蛋白質への抗体が生産されている。

【0088】

Tc1-1b蛋白質へのポリクローン性抗体、または誘導体、または類似体の生産には技術で公知の種々の手法が使われる。抗体の生産のために、ウサギ、マウス、ラットを含む、しかしこれらに限られない種々の宿主動物が天然Tc1-1b蛋白質、または合成版、またはその誘導体(例:フラグメント)の注射で免疫化されている。宿主種によって免疫反応の強化のために、フロイント(完全および不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リソレシチン、ブルニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノールのような表面活性物質、そしてBCG(カルメット-ゲランかん菌)およびコリネバクテリウム-パルヴムのようなヒトアジュバントを含む、しかしこれらに限られない種々のアジュバントが使われる。

【0089】

特定の一例において、ウサギをTc1-1bに対して免疫化するために細菌に発現されたTCL-1b遺伝子の14kDa蛋白質が使われた。この抗体は14kDaTc1-1b蛋白質を種々の白血病及びリンパ腫中にウエスタン法および免疫沈降法によって認識した。

【0090】

Tc1-1b蛋白質配列(配列番号:10)またはその類似体用のモノクローン性抗体の調製には、培養における連続細胞系によって抗体分子を生成する任意の技法が使われる。例えば、最初にコウラーおよびミルスタインによって開発されたハイブリドーマ法(1975、Nature、256:495-497)、またトリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(コズボー他、1983、Immunology Today、4:72)、そしてヒトモノクローン性抗体生成用EBV-ハイブリドーマ法(コール他、1985、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy中、Alan R. Liss, Inc., pp.77-96)が

ある。本発明のさらに別の一具体例において、最近の技術を使ってモノクローン性抗体を無菌動物に生成している (PCT/US90/02545)。この発明によると、ヒトの抗体が使われ、ヒトハイブリドーマを使って (コート他、1983、Proc Natl Acad Sci USA、80 : 2026-2030) またはヒトB細胞をEBVウイルスでインビトロに変換して (コール他、1985、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy中、Alan R. Liss, Inc., pp.77-96) 得られている。事実、この発明によれば、遺伝子を T c l - 1 b 特異のマウス抗体分子から適当な生物学的活動のヒト抗体分子と共にスプライスすることによる「キメラ抗体」の生成のために開発された技法 (モリソン他、1984、Proc Natl Acad Sci USA、81 : 6851-6855 ; ニューバーガー他、1984、Nature、312 : 604-608 ; 竹田他、1985、Nature、314 : 452-454) を使っている ; この抗体は本発明の範囲に属するものである。

【0091】

この発明によれば、単鎖抗体の生産のために記述された技法 (米国特許番号4,946,778号) が T c l - 1 b 特異の単鎖抗体の生産に適用されている。この発明のさらに別の一具体例では、Fab発現ライブラリーの構築のために記述された T c l - 1 b 蛋白質、誘導體、または類似体の好ましい特異性を持つモノクローン性Fabフラグメントを迅速で簡単に同定するための技法 (ヒューズ他、1989、Science、246 : 1275-1281) を使っている。

【0092】

分子のイディオタイプを含む抗体フラグメントは公知の技法で生産される。例えば、このフラグメントには、抗体分子のペプシン消化によって生産される F(ab')₂ フラグメント ; F(ab')₂ フラグメントのジスルフィド架橋を軽減することによって生成される Fab' フラグメント、そして抗体分子をパインと還元剤で処理することによって生成される Fab フラグメントが含まれるが、これらに限られてはいない。

【0093】

抗体の生産において、好ましい抗体のスクリーニングはその技術で公知の技法、つまり E L I Z A (エンザイムリンクドイミュノソルベントアッセイ) で行なわれる。例えば、T c l - 1 b 蛋白質の特定の領域を認識する抗体を選択するに

は、その領域を含むT c l - 1 bフラグメントに結合する生成物用に生成されたハイブリドーマをアッセイすればよい。ヒトT c l - 1 bに特異の抗体を選択するには、ヒトT c l - 1 bへの陽性結合そして例えば、マウスT c l - 1 bへの陰性結合を基に選択すればよい。

【0094】

前述の抗体はこの発明の蛋白質配列の局在および活動、例えば適当な生理学的試料におけるこれらの蛋白質のイメージング、そのレベルの測定等、に関連した技術において公知の方法で使われている。

【0095】

T C L - 1 b遺伝子および蛋白質の構造

T C L - 1 b遺伝子および蛋白質の構造はこの技術において公知の種々の方法で分析されている。

【0096】

遺伝学的分析

T C L - 1 b遺伝子に対応するクローン化DNAまたはcDNAは、サザンハイブリダイゼーション(サザン、E.M.、1975、J Mol Biol、98:503-517)、ノーザンハイブリダイゼーション(参照例:フリーマン他、1983、Proc Natl Acad Sci USA、80:4094-4098)、制限エンドヌクレアーゼマッピング(マニアティス、T.、1982、Molecular Cloning, A Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)、およびDNA配列分析を含む、しかしこれらに限られない方法で分析されている。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR; 米国特許番号4,683,202号、4,683,195号、および4,889,818号; Proc Natl Acad Sci USA、85:7562-7656; オーチマン他、1988、Genetics、120:621-623; ロー他、1989、Science、243:217-220)に続くT c l - 1 b特異のプローブでのサザンハイブリダイゼーションによって種々の細胞型からのDNAにおけるT C L - 1 b遺伝子の検出が可能になる。一具体例において、T c l - 1 bの遺伝学的リンケージの決定にサザンハイブリダイゼーションが使われている。PCRに続くハイブリダイゼーションアッセイもT c l - 1 b RNAまたは14q32.1染色体異常の検出または測定に使われている。ノーザンハイブリダイゼーション分析はT C L - 1 b遺伝子の発現レベルの決定

に使われている。T c l - 1 b 発現のために種々の発現または活動状態における種々の細胞型が検査されている。サザンおよびノーザンの両方のハイブリダイゼーションにおいて、またはドットプロットにおいて、ハイブリダイゼーション条件の厳しさは使われた特定のT c l - 1 b プロブへの好ましい関連度を持つ核酸の検出を確実にするために操作している。

【0097】

制限エンドヌクレアーゼマッピングはT C L - 1 b 遺伝子の遺伝学的構造を大体的に決定するために使われる。制限エンドヌクレアーゼ分割によって誘導した制限地図はDNA配列分析で確認する。

【0098】

DNA配列分析はこの技術において公知の任意の技法で行なわれる。これらは、マクサムおよびギルバートの方法(1980、Meth Enzymol、65:499-560)、サンガーダイデオキシ法(サンガー他、1977、Proc Natl Acad Sci USA、74:5463)、または自動DNAシークエネーター(例:アプライドバイオシステム、カリフォルニア州、フォスターシティ)の使用を含むが、これらに限られてはいない。代表的なT C L - 1 b 遺伝子のcDNA配列は実質的にここにおいて開示した配列からなる(配列番号:9)。

【0099】

蛋白質分析

T c l - 1 b 蛋白質のアミノ酸配列はDNA配列からの演繹によって、あるいは自動アミノ酸シークエンサーによる蛋白質の直接的な配列決定法によって誘導される。代表的なT c l - 1 b 蛋白質のアミノ酸配列は実質的に図1(配列番号:10)に表わされたような配列からなり、アミノ酸番号1-128で示された代表的成熟蛋白質を持つ。

【0100】

T c l - 1 b 配列はまた親水性分析によっても特性化される(ホップ、Tおよびウッツ、K、1981、Proc Natl Acad Sci USA、78:3824)。親水性プロフィールを使ってT c l - 1 b 蛋白質の疎水性および親水性領域、およびそれらの領域をコードする遺伝子配列の対応する領域を同定する。

【0101】

二次構造分析(チョー、P.およびファスマン、G.、1974、Biochemistry、13:22)もまた行なわれ、Tc1-1bの特定の二次構造を想定する領域を同定している。

【0102】

操作、翻訳、および二次構造予測、またオープンリーディングフレーム予測およびプロットングもこの技術において入手可能なコンピューターソフトを使って行なっている。

【0103】

その他の構造分析もまた使われている。これらには、X線結晶解析(イングストム、A.、1974、Biochem Exp Biol 11:7-13)およびコンピューターモデリング(フレッテリック、R.、およびゾラー、M.、(編)1986、Computer Graphics and Molecular Modeling、Current Communications in Molecular Biology中、コールドスプリングハーバーラボラトリー、ニューヨーク州、コールドスプリングハーバー)が含まれるが、これらに限られてはいない。

【0104】

Tc1-1bおよびそのTc1-1b蛋白質生成物およびそのための抗体の用途

例えば、t(14:14)(q11;q32)染色体転座、inv(14)(q11;q32)染色体逆位、およびt(7:14)(q35;q32)染色体転座のような14番染色体におけるTCL-1b遺伝子座に関連した染色体転座および逆位は、T細胞性前リンパ球性白血病(T-PLL)(ブリト-ババプルおよびカトヴスキー、1991、Cancer Genet Cytogenet、55:1-9)、免疫不全症候群血管拡張性失調症(AT)に関連した急性および慢性白血病(ラッソー他、1988、Cell、53:137-144;ラッソー他、1989、Proc Natl Acad Sci USA、86:602-606)、および成人T細胞白血病(バージリオ他、1993、PNAS、90:9275-9279)を含む、しかしこれらに限られないいくつかの成熟型T細胞白血病に関連している。AT関連転座のいくつかの例において、14q32.1バンドに関係したT細胞白血病およびリンパ腫において、14q32.1中に異常を持つ細胞のクローン性拡張が顕性悪性腫瘍の発生の前にいくつかの例におい

て記録されている(ラッソー、他、1988、Cell、35:137-144)。したがって、Tc1-1bポリヌクレオチド、そのTc1-1b蛋白質生成物およびそれへの抗体は上述の疾患、またTCL-1b遺伝子座に関連した染色体転座および逆位に関連したその他の障害、そして/またはTc1-1bRNAや蛋白質の発現増加に対する診断、治療/予防目的に使われる。Tc1-1bポリヌクレオチド、そのTc1-1b蛋白質生成物およびそれへの抗体はそれ自身のみで治療/予防目的に使われるか、またはその他のT細胞白血病の治療に役立つ治療薬と組み合わせられて使われる。この分子はまた、種々のTCL-1b遺伝子発現関連の容態、疾患および障害の検出、治療後経過予測、診断またはモニター、またはそれらの治療をモニターするためのイムノアッセイ等の診断アッセイにも使われる。よって、具体例において、この組織におけるT細胞悪性腫瘍または前癌変化は、類似する非悪性試料(その患者からまたは他の人から実験的に測定されるか、この試料における標準レベルとして公知のもの)におけるTc1-1b発現レベルと比較して、患者試料におけるTc1-1b発現の増加を検出することによって診断される。診断目的のために、TCL-1b遺伝子発現やT細胞白血病やリンパ腫のような疾患状態におけるTCL-1b遺伝子の発現増加の検出に使われる。治療目的のために、Tc1-1b蛋白質はTc1-1b活動を中和する抗TCL-1b抗体を作るために使われる。本発明の範囲にはTCL-1bRNAや蛋白質の発現を抑制するように機能するアンチセンスRNAやDNA分子とリボザイムを含むオリゴヌクレオチド配列も含まれる。

【0105】

診断用途

下記に示すように、TCL-1b遺伝子配列はTCL-1b遺伝子座のまわりの14番染色体転座および逆位に関連した疾患状態に関連しており、選択的にTおよびBリンパ球分化に初期に発現し、また14番染色体の逆位、inv(14)(q11;q32)を持つT-PLLを診断された患者またはt(14:14)(q11;q32)染色体転座を持つ患者からの細胞に高レベルの発現を示す。よって、TCL-1b遺伝子配列(配列番号:11)は14番染色体のTCL-1b遺伝子座に係る染色体異常、つまり転座、逆位および欠失、の結果として起こる疾患の検出のための治療用途を持つ

つ。配列番号: 9の少なくとも8のヌクレオチド、少なくとも15のヌクレオチド、少なくとも25のヌクレオチド、少なくとも50のヌクレオチド、少なくとも100のヌクレオチド、少なくとも200のヌクレオチド、少なくとも300のヌクレオチド、または少なくとも387のヌクレオチドから1324までのヌクレオチドのTCL-1bヌクレオチド配列を含む核酸はTCL-1b遺伝子(配列番号: 11)の検出および測定のためのハイブリダイゼーション検査におけるプローブとして使われる。5キロベース以下の、10キロベース以下の、25キロベース以下の、50キロベース以下の、または70キロベース以下のTCL-1b遺伝子に交雑可能な核酸、cDNA、または相補ストランドがTCL-1bヌクレオチド配列の検出および測定のためのハイブリダイゼーション検査におけるプローブとして使われる。例として、TCL-1b DNA配列は、例えば、Tcl-1b発現の異常を診断するために患者の試料のインシチュウハイブリダイゼーション検査を含むサザンまたはノーザン分析のような、ハイブリダイゼーション検査において使われる。ハイブリダイゼーション検査はTcl-1b発現の迷入変化や上記の活動に関連したT細胞悪性腫瘍のような容態、障害または疾患状態を検出、治療後経過予測、診断またはモニターするために使われる。特に、このハイブリダイゼーション検査はハイブリダイゼーションが起こりうる条件下において、TCL-1b DNAまたはRNAに交雑可能な核酸プローブを持つ核酸を含む試料への接触、そして結果として起こるハイブリダイゼーションを検出または測定することを含む方法によって行なわれる。特に、ハイブリダイゼーション検査は、患者の試料からのmRNAまたはcDNAをTcl-1bプローブと交雑させて結果として起こるハイブリダイゼーションの量を測定して、Tcl-1b mRNAの発現増加と関連した異常の存在を検出するために使われる。例えば、使われる検査法には、ノーザン法、ドット法、逆転写PCR等が含まれるが、これらに限られない。好ましいハイブリダイゼーション検査は、図Xに示す、少なくとも15から全長cDNA配列(配列番号: 9)までのポリヌクレオチドのTCL-1b遺伝子プローブを使って行なう患者の試料のノーザン法である。別の好ましいハイブリダイゼーションアッセイは抗TCL-1b抗体またはTCL-1bヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを使う、患者の

試料のインシチュアハイブリダイゼーション分析である。これらの技法はその技術において公知であり、実際多くの市販の診断キットのベースとなっている。

【0106】

ここで使われている患者試料には、インシチュアハイブリダイゼーション検査において使われる新鮮または凍結組織試料；Tリンパ球を含む細胞または組織試料、そして、概して、TCL-1b核酸を測定または定量するアッセイ（検査）に使われる末梢血リンパ球（PBL）やTリンパ球のような核酸を含む患者試料を含むが、これらに限られない。

【0107】

プライマー依存性核酸増幅法におけるプライマーとして役立つ少なくとも8から25のヌクレオチドを含むTCL-1bのポリヌクレオチド配列は、患者試料におけるTCL-1b遺伝子配列の検出に使われる。本発明に役立つプライマー依存性核酸増幅法には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、競合性PCR、周期性プローブ反応、そしてリガーゼ連鎖反応が含まれるが、これらに限られない。これらの技法は当業者に公知である。本発明の好ましい核酸増幅法は逆転写PCR（RT-PCR）である（シーバート他、1992、Nature、359：557-558）。

【0108】

本発明の特定の一具体例において、プライマー依存性核酸増幅法で使われる一対のプライマーのそれぞれのプライマーはゲノムTCL-1bヌクレオチド配列の異なるエクソンから選択される。例えば、一対のプライマーの第一のプライマーがTCL-1bゲノム配列のエクソン1から選択されれば、第二のプライマーはそのTCL-1bゲノム配列のエクソン2、3または4から選択されることになる。別な一例として、一対のプライマーの第一のプライマーがTCL-1bゲノム配列のエクソン2から選択されれば、第二のプライマーはそのTCL-1bゲノム配列のエクソン1、3または4から選択されることになる。プライマー依存性核酸増幅法で使われる一対のプライマーのそれぞれのプライマーが異なるエクソンから選択されることによって、増幅ゲノムヌクレオチド配列は、結果として生ずる増幅配列のサイズの差異のために、増幅cDNAヌクレオチド配列から区別される。結果として生ずる増幅ゲノムヌクレオチド配列は増幅イントロン配列を含む

ことになるので、増幅イントロン配列を含まない増幅cDNAヌクレオチド配列より大きなサイズとなる。cDNAヌクレオチド配列の増幅のためには、プライマー配列は検出可能な増幅ヌクレオチド配列を与えるために十分に離れたエクソン配列から選択されるべきである。

【0109】

本発明のTCL-1b遺伝子配列(配列番号:9および11)は14番染色体異常、特に14q32.1における転座t(14:14)(q11;q32)およびinv(14)(q11;q32)逆位を検出するために診断的に使われる。よって、本発明は、8から25のヌクレオチドの、好ましくは18から25のヌクレオチドの、配列番号:11または配列番号:9のヌクレオチド配列に相補的な第一プライマー、およびTCL-1b遺伝子にテロメア側またはセントロメア側の領域に相補的な、そして増幅標的配列の存在が異常を指摘するような結果的産物である増幅標的配列を検出する第二のプライマーを使って試料における標的配列を増幅する段階を含む、試料において14番染色体異常を示すまたは含む標的配列を検出する過程を提供する。本発明はまた増幅標的配列の存在が患者におけるT細胞悪性腫瘍の存在を指摘するような上述の方法に従って14番染色体異常を検出することによって患者における14番染色体異常に関連したT細胞悪性腫瘍の診断法を提供する。結果として生ずる増幅標的配列はゲル電気泳動法で検出され、14番染色体異常を含まない正常試料または標準と比較される。上述のバジリオ他はポリヌクレオチド配列が第二プライマーとして有用であることを開示している。その他の第二プライマーとして有用なポリヌクレオチド配列はT細胞レセプター.alpha./.delta.遺伝子座、T細胞レセプター.beta.鎖、または、14番染色体異常が逆位関連なら、TCL-1b遺伝子のポリヌクレオチド配列5'からエクソン1まで、または、染色体異常が転座関連なら、TCL-1b遺伝子のポリヌクレオチド配列3'から3'イントロンまでから選ばれる。ゲノムDNA標的配列の増幅には長PCR生成物の生成が必要なことがある。長PCR生成物のPCR生成技法はScience(1994)263:1564-1565に記述されている;長PCR生成物生成PCRキットはパーキンエルマーおよびタカラ酒造株式会社から市販されている。本発明はまた少なくとも配列番号:11のヌクレオチド配列の一部に相補的な15-1324のヌクレオチド

の範囲を含む、10キロベース以下の核酸プローブを持つ試料を交雑する、そして試料内におけるプローブと標的配列との間の結果として生ずるハイブリダイゼーションの量を検出または測定する段階を含む、核酸試料中に少なくとも14番染色体異常の一部を指摘または包含する標的ヌクレオチド配列を検出する方法を提供する。結果として生ずる増幅標的配列はゲル電気泳動法で検出され、14番染色体異常を含まない正常試料または標準と比較される。本発明はまた、患者において増幅標的配列の存在がT細胞悪性腫瘍の存在を指摘する上述の方法に従って該14番染色体異常を検出することによって患者における14番染色体異常関連T細胞悪性腫瘍の診断法を提供する。ハイブリダイゼーションプローブと標的配列の間の絶対相補性は、好ましくはあるが、要求されていない。ここで言う「少なくとも一部に相補的」な配列とは、核酸と交雑して安定ハイブリダイゼーション複合体を形成するに十分な相補性を持つ配列を意味する。交雑能力は相補性の度合いと核酸の長さの両方に依存する。概して、交雑核酸が長いほどTc1-1b RNAとのベースミスマッチも多いが、それでも安定二重鎖を形成する（または、場合によって、三重鎖を形成する）。当業者は交雑複合体の融点を測定する標準手法を用いてミスマッチの許容度を確認することができる。

【0110】

本発明のさらに別な一面はTCL-1b遺伝子配列およびTc1-1b蛋白質の検出または測定用の診断キットに関係する。よって、本発明は、10キロベース以下のそして配列番号:9のヌクレオチド配列またはその相補体の15-1324ヌクレオチドの範囲を含むプローブを含む容器中の化合物を含む診断キットを提供する。あるいは、本発明は、一つまたはそれ以上の容器中に、少なくともプライマーの一つは配列番号:9またはその相補体に交雑可能である少なくとも8-25ヌクレオチドの一对のプライマーを含み、そのプライマーは増幅反応においてcDNA合成をプライムすることのできる診断キットを提供する。本発明はまたプライマーの一つが配列番号:9またはその相補体に交雑可能であり、プライマーの一つがTCL-1b遺伝子にテロメア側またはセントロメア側に局在するDNA配列に交雑可能である診断キットを提供する。特定の一具体例において、前述の容器の化合物の一つは検出可能に標識表示されている。

【0111】

本発明の増幅反応はポリメラーゼ連鎖反応、競合PCRおよび競合逆転写PCR（クレメンティ他、1994、Genet Anal Tech Appl、11(1):1-6およびシーバート他、1992、Nature、359:557-558）；ハイブリッドRNA/DNAプローブとRNAseを使った標的配列の増幅を許す周期的プローブ反応（ID Biomedical）；リガーゼ連鎖反応（ウー他、1989、Genomics、4:560-569）である。特定の一具体例において、1992年11月12日付けPCT Publication No. WO/92/19775に記述されたように、TCL-1b遺伝子座関連染色体異常が検出されている。特定の一具体例において、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて使われたTcl-1bプローブが検出可能に標識表示されている。この標識はその技術において公知の任意のもので、放射（性同位元素による）標識、蛍光標識、ビオチン、化学発光標識等を含むが、これらに限られない。

【0112】

アッセイ（検査）がプライマーを使う特定の一具体例において、少なくとも一つのプライマーは検出可能に標識表示されている。別の一具体例において、プライマー対の一つが捕獲に備える部分、つまり磁気ビードに取り付けられている。

【0113】

抗TCL-1b抗体は生成され、患者の試料におけるTcl-1b蛋白質生成物の存在を検出することによって14番染色体異常関連疾患状態を同定するために診断的に使われる。Tcl-1b蛋白質配列の検出のために、本発明の診断キットは一つまたはそれ以上の容器中に選択的に検出可能に標識表示されている抗TCL-1b抗体を含む。異なる一具体例において、キットは容器に入れた標識表示された特定の抗体の結合部を含むことができる。ここでの使用において検出可能な標識とは直接的または間接的に検出可能な信号を与える標識のことで、例えば、酵素、放射性標識化分子、蛍光性分子、粒子、化学発光物、酵素基質またはコファクター、酵素阻害剤、または磁気粒子を含む。本発明において検出可能標識として有用な酵素の例にはアルカリフォスファターゼとわさび大根ペルオキシダーゼがある。対象蛋白質に検出可能な標識を付ける方法は色々あり、例えば、対象蛋白質への例えばわさび大根ペルオキシダーゼのような酵素の添付のための

4、4'-ジフルオロ-3、3'-ジニトロフェニルサルフォンのような二官能剤の使用がある。添付酵素はその後検出可能な反応生成物を産する基質と反応させる。本発明は、免疫特異結合が起こるような条件下で抗TC1-1b抗体を持つ患者試料に接触し、抗体による免疫特異結合の量を検出または測定することによって患者試料におけるTC1-1b蛋白質を検出する方法を提供する。

【0114】

試料はTC1-1b蛋白質を含む患者からの任意の試料で、例えば、組織の一部、末梢血リンパ球等がある。疾患状態の診断において、TC1-1b蛋白質、誘導体、そして類似体の機能的活動は種々の方法のアッセイで検定される。従って、本発明はまた、正常な個体からの相似試料におけるレベルと比べてTC1-1b蛋白質レベルが高いことが患者におけるT細胞悪性腫瘍の存在を指摘する場合に、患者からの試料にTC1-1b蛋白質発現増加を検出することによって、患者における14番染色体異常関連T細胞悪性腫瘍を診断する方法を提供する。

【0115】

例えば、抗TC1-1b抗体への結合のアッセイによってTC1-1b蛋白質を検出または測定する一具体例において、種々のこの技術で公知のイムノアッセイが使われる。これらには、ラジオイムノアッセイ、ELISA(エンザイムリンクドイムノソルベントアッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチューイムノアッセイ(例えばコロイド金、酵素または放射性同位元素による標識の使用)ウエスタン法、インサイチューハイブリダイゼーション、沈降反応、凝集反応アッセイ(例:ゲル凝集反応アッセイ、ヘマグルチネーションアッセイ)、相補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、蛋白質Aアッセイ、および免疫電気泳動アッセイ等を含むが、これらに限られない。一具体例において、一次抗体に標識を検出することによって抗体結合が検出されている。別の具体例において、二次抗体または試薬の一次抗体への結合を検出することによって一次抗体を発見している。さらに別の具体例において、二次抗体が標識表示されている。その技術においてイムノアッセイにおける結合検出のための多くの手段が公知であり、それらは本発明の範囲に属するものである。特にこのイムノアッセイは、免疫

特異な結合が起こる条件下において抗TC L - 1 b抗体を持つ患者から誘導した試料に接触し、その抗体による免疫特異な結合の量を検出または測定する方法で行なわれる。特定の一具体例において、T c l - 1 b蛋白質のレベル増加が疾患状態の指標であるとき、T c l - 1 b蛋白質の存在の検定のためにT c l - 1 b蛋白質への抗体が患者の組織や血清のアッセイに使われている。本発明の一具体例において、患者試料の免疫細胞化学法によってT c l - 1 b蛋白質を検出または測定している。別の一具体例において、T c l - 1 b発現増加関連疾患の療法のモニターのためにT c l - 1 b蛋白質またはRNAのレベルを測定するアッセイを使っている。例えば、治療前に比べてTC L - 1 b RNAまたは蛋白質のレベルが治療後に下がっているということはその治療法への好ましい反応を指摘している。治療後にレベルが上がっているようなら、治療への反応がよくないことを示す。

【0116】

別の一具体例において、T c l - 1 b蛋白質またはRNA発現のレベルが疾患を表現させるために使われている。つまり、T c l - 1 b蛋白質またはRNA発現増加が疾患の悪化を指摘している。

その他の方法は専門家に公知のものであり、本発明の範囲に属するものである。

【0117】

治療 / 予防用途

T c l - 1 bの阻害剤は特に14q32.1における14番染色体異常そして / またT c l - 1 b蛋白質発現増加に関連した疾患の治療のための治療用途で使われる。本発明の一具体例において、T c l - 1 b蛋白質そして / またはT c l - 1 b蛋白質を発現する細胞系はT c l - 1 b蛋白質に結合してT c l - 1 b蛋白質の作動薬または拮抗薬として働き得る抗体、ペプチド、またはその他の分子のスクリーニングに使われる。例えば、T c l - 1 b蛋白質の活動を中和できる抗TC L - 1 b抗体は、T細胞白血病やリンパ腫のような14番染色体異常やT c l - 1 b蛋白質の発現に関連した疾患状態を抑制または予防するために使われる。従って、本発明は、14番染色体関連疾患状態を患う哺乳類に治療効果のある量の抗TC L - 1 b抗体を与えることによって14番染色体関連疾患状態を患

う哺乳類において14番染色体関連疾患状態を治療する方法を提供する。あるいは、組換えTc1-1b蛋白質を持つ有機またはペプチドライブラリーのスクリーニングはTc1-1b蛋白質の活動を抑制するように機能する治療性分子の同定に有用である。当業者にとって日常的と思われる数々の方法において合成および天然生成物をスクリーニングする。

【0118】

抗体、ペプチド、またはその他の分子のTc1-1b蛋白質の効果を変調させる能力をモニターする。例えば、本発明のTCL-1bヌクレオチド配列、Tc1-1b蛋白質配列、その誘導体または類似体、またはそれへの抗体からなる治療性組成物の投与以前、以後両方において、TCL-1b遺伝子配列またはTc1-1b蛋白質配列は上述のように検出される。

【0119】

TCL-1bポリヌクレオチドは、T細胞白血病やリンパ腫のような種々の14番染色体関連疾患状態、そして/またはTc1-1b蛋白質の発現増加の治療に有用である。TCL-1bアンチセンス遺伝子配列を細胞に導入することによって、TCL-1b遺伝子の過剰発現に関連した容態の治療に遺伝子療法が使われる。従って、本発明は、14番染色体関連疾患状態を患う哺乳類に治療効果のある量のTCL-1bアンチセンス分子を与えることによって14番染色体関連疾患状態を患う哺乳類において14番染色体関連疾患状態を治療する方法を提供する。

【0120】

アンチセンスRNAおよびDNA分子そしてリボザイムを含む、そしてTCL-1b mRNAの翻訳を抑制するように機能するオリゴヌクレオチド配列は、本発明の範囲に属するものである。ここで使われる「アンチセンス」とは、何らかの配列相補性のお陰でTCL-1b RNA（好ましくは、mRNA）の一部に交雑可能な核酸のことである。アンチセンスRNAおよびDNA分子は標的mRNAに結合して蛋白質翻訳を予防することによって直接mRNAの翻訳を妨げるように働く。アンチセンスDNAに関して、TCL-1bヌクレオチド配列の翻訳開始部位、つまり-10と+10の間の領域から誘導されたオリゴデオキシ

リボヌクレオチドが好ましい。本発明は、TCL-1b mRNAに交雑可能な Tc1-1b 蛋白質のコード配列の少なくとも一部に相補的な核酸配列を含むアンチセンス分子を提供する。本発明はまた、TCL-1b コード配列（配列番号：11）に交雑するノンコーディング配列（配列番号：11）の少なくとも一部に相補的な核酸配列を持つアンチセンス分子を提供する。本発明の好ましい一具体例において、アンチセンス配列はTCL-1b 遺伝子の5' ノンコーディング配列から誘導される。本発明の特に好ましい一具体例において、アンチセンス配列は配列番号：9から誘導される。

【0121】

リボザイムはRNAの特定の分割を促進させることのできる酵素RNA分子である。リボザイム活動のメカニズムはリボザイム分子の相補的標的RNAへの配列特異なハイブリダイゼーションに関係し、その後塩基配列特異的な分割が起こる。本発明の範囲に属するのは、Tc1-1b RNA配列の塩基配列特異的な分割を特異にそして効率的に促進させるハンマーヘッドモチーフリボザイム分子である。

【0122】

任意の潜在RNA標的内の特定なりボザイム分割部位は、最初、GUA、GUU、そしてGUCの配列を含むリボザイム分割部位を求めて標識分子をスキャンすることによって同定される。同定したら、分割部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15から20のリボヌクレオチドの短いRNA配列を、そのオリゴヌクレオチド配列を不適切なものとし得る二次構造のような予測された構造に関して評価する。標的候補の適切性はまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使って、その候補の相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションへの接近可能性を検査することによっても評価できる。

【0123】

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA分子またリボザイムはどちらもRNA分子合成法としてその技術において公知の任意の方法で調製される。これらにはその技術において公知の固相フォスホラミジト化学合成のようなオリゴデオキシリボヌクレオチドを化学合成する技法が含まれる。あるいは、RNA分子は

アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のインビトロおよびインビボ転写によって生成される。このDNA配列はT7またはSP6ポリメラーゼプロモーターのような適切なRNAポリメラーゼプロモーターを取り入れる多種多様なベクターに取り入れられる。あるいは、使われるプロモーターによって、アンチセンスRNAを構成的または誘導的に合成するアンチセンスcDNA構築物が細胞系に安定して導入される。

【0124】

細胞内安定性および半減期を増加させる手段として種々のDNA分子修飾が導入される。修飾の例には、リボまたはデオキシヌクレオチドの側防配列の分子の5'および/または3'末端への追加、またはオリゴデオキシリボヌクレオチドバックボーン内でのフォスフォジエステラーゼ連鎖に代わるフォスフォロチオアートまたは2'-O-メチル連鎖の使用が含まれるが、これらに限られない。

【0125】

核酸を細胞または組織内に導入する方法には、裸核酸の挿入、つまり組織内への注射のような核酸のインビトロ導入法、核酸の細胞へのエクスビトロ導入法、ウイルス、レトロウイルス、ファージまたは原形質等のベクターの使用、またはインビボまたはエクスビボで使われる電気穿孔法のような技法を含む。

【0126】

その他の方法はその技術の専門家に公知であり、本発明の範囲に属するものである。

【0127】

治療または予防用途の供覧

本発明のTCL-1bポリヌクレオチド、Tc1-1b蛋白質生成物、その誘導体および類似体、そしてそれへの抗体は好ましい治療または予防活動に関してインビボに検査される。例えば、これらの化合物は人間において検査する前に、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギ等を含む、しかしこれらに限られない適切な動物モデル系において検査される。インビボ検査では、人間への投与の前にその技術で公知の任意の動物モデル系が使われる。

【0128】

治療 / 予防方法および組成物

本発明は、被験者への有効量の治療薬、つまり本発明のTCL-1bポリヌクレオチド、Tcl-1b蛋白質、その誘導体または類似体、またはそれへの抗体の投与によって治療および予防法を提供する。好ましい一面において、その治療剤は実質的に精製されている。被験者は好ましくは動物であり、ウシ、ブタ、ニワトリ等の動物を含むが、それらに限られない。また、好ましくは哺乳類であり、もっとも好ましくは人間である。

【0129】

本発明の治療剤の投与にあたって、種々の送出系が公知であり、使われる。例えば、リポソーム内のカプセル化、微粒子、マイクロカプセル、組換え細胞による発現、レセプター媒介エンドサイトーシス(参照例:ウーおよびウー、1987、J Biol Chem、262:4429-4432)、レトロウイルス性またはその他のベクターの一部としての治療用核酸の構築等がある。導入法には、皮内、筋肉内、腹膜内、静脈内、皮下、鼻腔内、および経口経路が含まれるが、これらに限られない。化合物は任意の便利な経路、例えば、注入または大量注射、上皮または粘膜皮膚内層を通じた吸収(例:口腔粘膜、直腸および腸管粘膜等)で投与され、その他の生物学的活性剤と共に投与される。投与は全身性または局所性である。また、本発明の薬剤組成物は、心室内および髄腔内注射を含む任意の適切な経路で中枢神経系に導入することが望ましい;心室内注射には例えばオマヤレザバーのようなレザバーに取り付けられた心室内カテーテルが役立つ。

【0130】

特定の一具体例において、本発明の薬剤組成物を治療を要する個所に局所的に投与することが望ましい;これには、例えば、限定するわけではないが、手術中の局所的注入、手術後の塗布、例えば、傷への包帯と共に行なうもの、注射、カテーテル、坐剤、または移殖によるものがあり、該移殖は多孔性、無孔性、またはゲル状物質のもので、シアラスティック膜のような膜や繊維を含む。一具体例において、投与は悪性腫瘍または腫瘍性または前腫瘍性組織の部位(または以前の部位)に直接注射で行なわれる。

【0131】

治療剤が蛋白質治療剤をコードする核酸である特定の一具体例において、その核酸は、それを適当な核酸発現ベクターの部分として構築しそれが細胞内性になるように投与することによってそのコードされた蛋白質の発現を促進するように、インピボで投与される。その方法の例としては、レトロウイルス性ベクターの使用による（参照：米国特許番号4、980、286号）、または直接注射による、または微粒子照射による（例：遺伝子銃；バイオリスティック、デュボン）、またはリポドまたは細胞表面レセプターまたはトランスフェクティング剤でコートすることによる、または核に入ると知られているホメオボックス風ペプチドへの結合において投与することによる（参照例：ジョリオット他、1991、Proc Natl Acad Sci USA、88：1864-1868）等がある。あるいは、核酸治療剤は細胞内的に導入され、相同性組換えによって宿主細胞DNAに発現のために取り入れられる。

【0132】

本発明はまた薬剤組成物を提供する。この組成物は治療効果のある量の治療剤と薬剤的に容認できる担体または医薬品添加物を含む。この担体は食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、そしてそれらの組み合わせを含むがこれらに限られない。担体と組成物は無菌である。製剤は投与の様式に適合しなければならない。

【0133】

望むなら、この組成物は少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤も含むことができる。この組成物は液体溶液、懸濁液、乳剤、錠剤、カプセル、持続放出性製剤、または粉末である。この組成物はトリグリセリドのような従来の結合剤および担体を使って坐剤に形成される。経口製剤には薬剤グレードのマニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウム糖、セルロース、炭酸カルシウム等の標準担体が含まれる。

【0134】

好ましい一具体例において、この組成物は人間への静脈内投与に適応する薬剤組成物として日常的手法に従って形成される。典型的に、静脈内投与用の組成物

は無菌等張性水様緩衝剤中の溶液である。必要な場合は、この組成物は可溶化剤と、注射部位の痛みを和らげるためのリドカインのような局所麻酔も含む。概して、処方成分は別々にまたは混合して単位投与量ごとに、例えば、アンプルや活性成分の量を示したプラスチック袋のような密封容器中に凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給される。この組成物が注入によって投与されるときは、無菌の薬剤グレードの水または食塩水をふくむ注入瓶に調剤される。この組成物を注射で投与するときは、処方成分を投与前に混合されるようにアンプル入りの注射用無菌水または食塩水を与える。

【0135】

本発明の治療剤は中性または塩類の形で形成する。薬剤的に許容できる塩類には塩酸、燐酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等から誘導されるような遊離アミノ基、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニア、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等から誘導されるような遊離カルボキシル基を使って作るものが含まれる。

【0136】

本発明の治療剤の特定の障害または容態の治療に有効な量はその障害または容態の性質に依り、標準的臨床技法で決められる。またインビトロアッセイも最適投与量範囲の同定のために使われる。製剤に使われる精密な投与量はまた投与の経路および疾患または障害の状態レベルにも依存し、担当医師の判断およびそれぞれの患者の状況によって決定すべきである。しかし、静脈内投与の適切な用量範囲はふつう体重1キログラムあたり20-500マイクログラムの活性化化合物である。鼻腔内投与の適切な投与量は体重1キログラムあたり0.01pgから1mgである。効果的用量はインビトロまたは動物モデル検査系から誘導した用量反応曲線から推定する。

【0137】

坐剤は概して体重10キログラムに対して0.5%の範囲の活性成分を含む。経口製剤は好ましくは10%から95%の活性成分を含む。

【0138】

本発明はまた本発明の薬剤組成物の単一または複数の成分を詰めた単一または複数の容器を含む薬剤パックまたはキットを提供する。選択的にこの容器に関連するのは薬剤または生物学的製品の製造、使用または販売を制御する政府当局によって決められた型の通知であり、この通知は人間への投与用としての製造、使用または販売を承認するものである。

【0139】

TCL - 1 b 遺伝子発現のアンチセンス調節

本発明はTCL - 1 b 遺伝子（配列番号：11）またはcDNA（配列番号：9）コードされるTcl - 1 b 蛋白質またはその一部にアンチセンスである少なくとも六個のヌクレオチドの核酸の治療または予防用途における使用を提供する。このアンチセンス核酸は本発明の拮抗薬治療剤としての有用性があり、例えば上述のT細胞悪性腫瘍のような障害の治療または予防に使われる。

【0140】

本発明のアンチセンス核酸は二本鎖または一本鎖RNAまたはDNAまたはそれらの修飾体または誘導体であるオリゴヌクレオチドであり、細胞に直接投与可能であり、または外因性誘導配列の転写によって細胞内で生成される。

【0141】

特定の一具体例において、現在の発明によって提供されるTCL - 1 b アンチセンスポリヌクレオチドは特に14q32.1における14番染色体異常に関連した疾患状態の治療に使うことができ、その時その疾患状態がTCL - 1 b 遺伝子を発現することを供覧する（インビトロまたはインビボ）ことができる。この供覧はTCL - 1 b RNAまたはTcl - 1 b 蛋白質の検出によって行なうことができる。

【0142】

本発明はまた上述のように薬剤的に許容される担体中における効果的用量の本発明のTCL - 1 b アンチセンス核酸を含む薬剤組成物を提供する。T細胞悪性腫瘍のような14番染色体関連疾患状態の、本発明の薬剤組成物投与を含む治療法および予防法もまた提供する。

【0143】

別の一具体例において、本発明は、その細胞に有効量の本発明のアンチセンス T C L - 1 b 核酸を含む組成物を与えることによって、原核細胞または真核細胞における T C L - 1 b 核酸配列の発現を抑制する方法に向けられている。

【0144】

T C L - 1 b アンチセンスポリヌクレオチドは少なくとも6のヌクレオチド、好ましくはオリゴヌクレオチド(6から50のオリゴヌクレオチドの範囲)からなるものである。特定の側面において、オリゴヌクレオチドは少なくとも10のヌクレオチド、少なくとも20のヌクレオチド、少なくとも30のヌクレオチド、または少なくとも400のヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAまたはキメラ混合物または誘導体または修飾版である。オリゴヌクレオチドは基部、糖部、または燐酸塩のバックボーンで修飾される。オリゴヌクレオチドには、ペプチド、または細胞膜を越えた輸送の促進剤(参照例: レッツィンガー他、1989、Proc Natl Acad Sci USA、86:6553-6556; レメトリ他、1987、Proc Natl Acad Sci USA、84:648-652; PCT Publication No. WO88/09810、1988年12月15日発行)または血液脳関門(参照例: PCT Publication No. WO89/10134、1988年4月25日発行)、ハイブリダイゼーション誘発式分割剤(参照例: クロール他、1988、Bio Techniques、6:958-976)または化学架橋形成剤(参照例: ゾン、1988、Pharm Res、5:539-549)等、その他の付属基を含むこともある。

【0145】

オリゴヌクレオチドは別の一分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発式架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発式分割剤等に接合する。

【0146】

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えばDNA自動合成装置(バイオサーチ、アプライドバイオシステムズ等から市販されているようなもの)のようなその技術で公知の標準法で合成される。例として、フォスフォロチオアートオリゴはスタイン他(1988、Nucl. Acids Res. 16:3209)の方

法で合成され、メチルフォスフォネートオリゴは制御細孔ガラスポリマーサポート(サリン他、1988、Proc Natl Acad Sci USA、85:7448-7451)を使って調製される。

【0147】

特定の一具体例において、Tcl-1bアンチセンスオリゴヌクレオチドは触媒RNA、またはリボザイム(参照例:PCT International Publication WO 90/11364、1990年10月4日発行;サーバー他、1990、Science、247:1222-1225)を含む。別の一具体例において、オリゴヌクレオチドは2'-O-メチルリボヌクレオチド(井上他、1987、Nucl. Acids Res. 15:6131-6148)、またはキメラRNA-DNA類似体(井上他、1987、FEBS Lett、215:327-330)である。

【0148】

代替的一具体例において、本発明のTcl-1bアンチセンス核酸は細胞内で外因配列からの転写によって生成される。例えば、ベクターをインビボに導入して細胞に取り入れ、その細胞内においてそのベクターまたはその一部が転写され、よって本発明のアンチセンス核酸(RNA)を生成する。このベクターはTcl-1bアンチセンス核酸をコードする配列を含んでいるものである。このベクターは、望ましいアンチセンスRNAを生成するように転写される限り、エピソームのままでもいいし、または染色体統合をしてもよい。このベクターはその技術で標準的な組換えDNA技術法によって構築される。ベクターは哺乳類の細胞での複製および出現に使われるプラスミド、ウイルス、またはその技術で公知のその他のものである。Tcl-1bアンチセンスRNAをコードする配列の発現は、その技術で哺乳類、好ましくはヒト細胞での活動が公知の任意のプロモーターによって行なわれる。このプロモーターは包括的または構成的なものである。このプロモーターには、SV40早期プロモーター領域(バーノイストおよびチャムボン、1981、Nature 290:304-310)、3'長ラウス肉腫ウイルス末端重複に含まれるプロモーター(山本他、1980、Cell 1、22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(ワグナ

—他、1981、Proc Natl Acad Sci USA、78:1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子調節配列(プリンスター他、1982、Nature、296:3942)等があるが、これらに限られない。

【0149】

本発明のアンチセンス核酸は少なくともTCL-1b遺伝子、好ましくはヒトTCL-1b遺伝子のRNA転写の一部に相補的な配列を含む。しかし、絶対相補性は、好ましいが、要求されない。ここで言う「少なくともRNAの一部に相補的」な配列とは、RNAと交雑して安定二重鎖を形成するに十分な相補性を持つ配列を意味する；二本鎖TCL-1bアンチセンス核酸の場合、二重鎖DNAの一本鎖がそのために検査されるか、または三重形成がアッセイされる。交雑能力は相補性の度合いとアンチセンス核酸の長さの両方に依存することになる。概して、ハイブリダイズする核酸が長いほどTCL-1b RNAとのベースミスマッチも多いが、それでも安定二重鎖(または、場合によって、三重鎖)を形成する。当業者は交雑複合体の融点を測定する標準手法を用いてミスマッチの許容度を確認することができる。

【0150】

TCL-1bアンチセンス核酸はTCL-1b RNAを発現すると示された細胞型のT細胞悪性腫瘍を治療(または予防)するために使われる。この発現に関して検査された悪性、腫瘍性、そして前腫瘍性細胞は、上述のものを含むが、これに限られない。好ましい一具体例において、一本鎖DNAアンチセンスTCL-1bオリゴヌクレオチドが使われる。

【0151】

TCL-1b RNAを発現する悪性(特に腫瘍)細胞型は、その技術で公知の種々の方法で同定される。この方法には、TCL-1b特異核酸を使ったハイブリダイゼーション(例：ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション、インサイチュウハイブリダイゼーションによるもの)、インビトロでTCL-1bに翻訳される細胞型からのRNAの能力観察等があるが、これらに限られない。好ましい一面において、治療の前に、患者からの一次腫瘍組織がTCL-1b発現に関してアッセイされる。

【0152】

薬剤的に許容される担体中に有効量のTCL-1bアンチセンス核酸を含む本発明の薬剤組成物はTCL-1b RNAを発現する型の悪性腫瘍を持つ患者に投与される。

【0153】

特定の疾患状態または容態の治療に効果的なTCL-1bアンチセンス核酸の量はその疾患状態または容態の性質に依存し、標準臨床技法で決定される。可能なら、治療する腫瘍型のアンチセンス細胞毒性をインビトロに、そして有用な動物系で、人間における検査や使用の前に決定しておくことが望ましい。

【0154】

特定の一具体例において、TCL-1bアンチセンス核酸を含む薬剤組成物はリポソーム、微粒子、またはマイクロカプセルを用いて投与される。本発明の種々の具体例において、これらの組成物を、TCL-1bアンチセンス核酸の持続放出性を実現するために使用することが、有用である。特定の一具体例において、抗体を用いて特定の同定可能腫瘍抗原に標的を合わせたリポソームを使用することが望ましい（レオネッティ他、1990、Proc Natl Acad Sci USA、87：2448-2451；レネイセン他、1990、J Biol Chem、265：16337-16342）。

【0155】

【配列表】

【化1】

SEQUENCE LISTING

<110> Croce, Carlo

<120> TCL-1b Gene and Protein and Related Methods and Compositions

<130> CRO 01.PCT03

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 1

ggcagctcta ccccgggatg aa

22

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 2

acagacctga gtgggacagg a

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primers

【 0 1 5 6 】

【化2】

<400> 3
tcctccttgg caggagtggg a 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 4
cagttacggg tgctcttgcg t 21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 5
atggcctccg aagcttctgt g 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 6
tggtcgtgcg gttcaatccc t 21

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primers

【0157】

【化3】

<400> 7
aatctggcca tggctctgcta tttc

24

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 8
tgctaggacc agctgctcca taga

24

<210> 9
<211> 1152
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
gaggcgggtc ccggttgca gacttgccatg gcctccgaag cttctgtgcg tctaggggtg 60
ccccctggcc gtctgtggat ccagaggcct ggcattctacg aagatgagga ggggagaacc 120
tgggtgactg tggctgtgcg gttcaatccc tgcgtaggg aatgggccag ggcctcccag 180
ggcagcagat atgaaccag catcacagt cacttgtggc agatggcagt gcatacccag 240
gagctactct cctccggcca gatgcccttc tcccagctgc ccgccgtgtg gcagctctac 300
cccgggagga agtaccgagc agcggattcc agtttctggg aaatagcaga ccatggccag 360
attgactcta tggagcagct ggtcctaaca tatcagccgg agaggaaaga ctgacactgg 420
gagtggctgg cctgctgga cctgctctt ctggcctggg gtctcctcat gccccctcag 480
tgaggatctt catgtacctg ctcttctggt tgcacacca gcatagcctc cttgcaggca 540
gaaggcagta gggccccgc aactcagtt tctctctgtt tccttagtta tcagtcctgt 600
cctgtcccac tcaggtctgt acttagggca gctggcctgg atgggcttca ctggggcctc 660
gtctgtgtgc tgagccagtt tcccctgctg gctgcaagct gtgggttctt tctcctctgt 720
gccccctcag ctgatcttct agatgccact cccaaatccc cttcataacc accaggatgt 780
gtgccagacc aggcctccag caccctcagc gcagctctgt attgaaact caccatcggc 840
aggcagtggg tcggtttaag agatggcatt agaggagacc cagtctggat gtggacttgg 900
atgccctgtg ggtatcagtt ctgctgacac tttggcccga aatagatcca gtgctgagca 960
agcaatgtac accggagcct cagtgagccc atctgcacag tggggagcat ggagggatgg 1020
gtttggcctg tgcttctgct tattcagctc ttcagctcac ggaaggatg ctagtccgtg 1080
aaggtagcct cacagtactg gttaattaa ctttattgct cactgtcaaa aaaaaaaaaa 1140
aaaaaaaaaa aa 1152

<210> 10
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

【0158】

【化4】

<400> 10
 Met Ala Ser Glu Ala Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Pro Gly Arg Leu
 1 5 10 15
 Trp Ile Gln Arg Pro Gly Ile Tyr Glu Asp Glu Glu Gly Arg Thr Trp
 20 25 30
 Val Thr Val Val Val Arg Phe Asn Pro Ser Arg Arg Glu Trp Ala Arg
 35 40 45
 Ala Ser Gln Gly Ser Arg Tyr Glu Pro Ser Ile Thr Val His Leu Trp
 50 55 60
 Gln Met Ala Val His Thr Arg Glu Leu Leu Ser Ser Gly Gln Met Pro
 65 70 75 80
 Phe Ser Gln Leu Pro Ala Val Trp Gln Leu Tyr Pro Gly Arg Lys Tyr
 85 90 95
 Arg Ala Ala Asp Ser Ser Phe Trp Glu Ile Ala Asp His Gly Gln Ile
 100 105 110
 Asp Ser Met Glu Gln Leu Val Leu Thr Tyr Gln Pro Glu Arg Lys Asp
 115 120 125

<210> 11
 <211> 6486
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 tctctctcct cccctcctc ccccgactgg caccgcccc actgccggcc cgcccccac 60
 tgccggcccc ggccccacc acgccggagc tgctccattt aaggagattg cgcagctgga 120
 aagctacacg tgtgagccta gaggcgggtc ccggttgacg acttgccatg gcctccgaag 180
 cttctgtgcg tctaggggtg cccctggcc gtctgtggat ccagaggcct ggcattctacg 240
 aagatgagga ggggagaacc tgggtgactg tggtcgtgcg gttcaatccc tcgcgtaggg 300
 aatgggcccag ggcctcccag ggcagcagag tgagtctctg gcacgagggg aggctgtggg 360
 gagggctgcg cactgaccoc tgcccgtgtg ggaccgcggt gggggtcaga gggggccgtt 420
 ctcaccgcga ctggaaaact cacttctgtg caggtctagg agcgcagcaa tgtccatgcc 480
 cagccctggc cccaggaaca cccccgtaa agggaccaca ggcacaagct tatccacatg 540
 agataatgtg gtctctgctg gtgaagccga ggctaaggta gctcagggct tagtgccatt 600
 cccagtgcct gctgggaagg cccacaaatg ggcagctat tgagctgggc tttgtgggat 660
 gaggtaggag tctccagtc tagaaaggag gcaggagtag tataagcaaa agcattgcag 720

【0159】

【化5】

cctggaggca ccagggtgggc caacaggatg aacatgacat tgggtgcaga ttactgatct 780
 gcaaaatgag aataatatac ctctgtggca agctagtac agacatgctc acatacatgg 840
 ctcaaccgct gaatggcctg ggaagcatt tgactgataa cagattctgg aaattaattc 900
 aggaggcttg ggtggagtcc tagattcttt acttttcaa agctccccag gtgataatga 960
 taatgactca ggaaacggct gtagatgagg gcttttagatc acagccagtc tttgagggat 1020
 gaagtaaata cagtagcgtc tctgggtgtg gtggcggtgg ggaattgatt ccaggaccga 1080
 ctgtggatgc tcaagtcctt gatagaaaat gacctgggta gtaattacat ataacctcag 1140
 cgcatcctct actatatttg aatcagatt actaataaca cctaagtcta cacctacaca 1200
 tcaactcaag ctctgctttt gggaactttg tggaaattct ttttttcccc aaatattttt 1260
 aatctgaggt tagtcgaatt catgggtgca gtatccatgg aaatgggggg ctggctgtac 1320
 cttagtgtaa tgtggtaaaa gcatatccgg atatttaaaa tgccatttag ggctgggctc 1380
 ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggagccga gatgggctta tcacgagatc 1440
 aggagatcga gaccatccta gccaacatgg ggaaccccg tctctactaa aaatacaaaa 1500
 aattagccgg cgtgggtggc ggacgcctgt agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg 1560
 agaatggcgt gaaccgggga ggcaagcctt gtagtgagcc gagatcgcac cactgcactc 1620
 cagcctgggt gacagagtga gactccgtcc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aatgccgttt 1680
 aggtcttctg aaacaattca ctgcctgttt gtttgtttt tgagaaagtc ttgctctgtt 1740
 gcggctggag tgcactggtg tgatgttggc tcaactgcaac ctccacctcc caggctcaag 1800
 tgattctcat gcctcagcct cccgagtagc ttggattaca ggcgattttt ttttacagtt 1860
 aatttttttt gttattttca ggagagacaa aagttaatc atgtgggcca ggctggtttt 1920
 gaactcctga cctcaagtga tctgcccacc ttggcctccc aaagtgctgg gattacaggt 1980
 gagccacctc gccagccag ttcactgaca ctttaacaa tataacacat ttccataaaa 2040
 aagttcaaat aggttatttc aaaaaatgtt ggtagagaac atggaaaggc ttttctgtac 2100
 atacactaaa taaagcatgc aaaaattgtg gagcaaatat ttttaagttt tcaaaagcct 2160
 gaaaaagtgt taatggaggg cactgtaaaa tgggtcgacc actatggaaa acaggatgag 2220
 gatttctcaa aaaaagaatt acggcataat ccagcaatgc cacttctgga tatataccca 2280
 caagcatctg aagccggaac ttaagcatgt attcatacat ccagtgtcac agcagtatca 2340
 ttcactactg ccaaaagggt gtggcagccc ccgtgtccat tgatagatga atgggtaaac 2400
 aacacaaacc atgaagtatt cacccttaaa agtcagacac acggatgaaa cttggagcca 2460
 ttatactaaa tgaaatatgc cagtcacgga aggacagatt ctcttgtatg aggtactcag 2520
 agtggctca ttcataaagt ggaatggtag ctgccagggg ctggagggag togaggatgg 2580
 gaagttaatg ttagtaacag gtacggagtc tcagtttggg aagataaaaa gttctggagg 2640
 tggatagtgc cgacggttc acatgtcaat gcacttaatg ccaccaaact gtactcttaa 2700
 aacagttga ccgggcacgg tggctcacgc ctgaatccca gcactttggg ggaccgaggc 2760
 gggcggatca caagtcagg agatcgagac catcctggct aacacgggta aaccccgtct 2820
 ctactaaaaa taaaaagaa ttagccgggt gcgggtggcg gcgtctgtag tcccagctac 2880
 tcggggggct gaggcaggag aatggcttga acctgggagg cggagcttg agtgagctga 2940
 gatccagcca ctgactcca gcctggcgca cagagcaaga ctccgtctca aacaaaaaa 3000
 agcaaaaaaa aaaaaacagt taagattttt tttttttta aatgattcag tggaaataga 3060
 atggattctt caaataactt agccacgggt gggataaggg acctacttag taagtatttt 3120
 ttccccttct ttcttaaaaa tagatcgatg tcttaggggt ggaattaggc ttccctggcg 3180
 acacatctaa tgcaagatc agccaccttt ttctgtaaag gatctgatgg taaacatttt 3240
 ccaactgaga gctatgctct tgcagctact cagctctgct attgcagtgc aaaagcagct 3300
 aaagcaacg gtaaaggaat gacggaagga gccttagttt atttacaata aagctttatt 3360
 tgcaaaagca gatgcaagcc agacttagtt tgctgatctc tgatctacag tcagaataga 3420
 cagagaagga gagattttgc cgtataattt aaaatacttc tctttgcaa agcagctccat 3480
 aaaaaaagtg aggacaacaa actgagaaaa attattcaca acatgtctga ttgatagagc 3540
 actaatattc ttaattcaaa aagacatttt atcacaaaag aagacaaaata cttagaaaat 3600

【0160】

【化6】

tgtgcaaaag actttccatt ttgttgcata acgtaggaag ctttggtttt acttttccta 3660
 tcatetttct aacttccagt accagcctaa ttttgttatt tttattatta tgtatttatt 3720
 ttgagacaga gtcttgctct gtctcccagg ctggagtga gtgacctgac gatagcttac 3780
 aacagcctct acetcccagg ttcaagaaat cttctcacct tagctcccag agtagctggg 3840
 actgtaggca catgccacca tggccagcta attttttatt tttttagag acagagtctc 3900
 attatgttgc cgaggctggt ctggaactcg tggcttcnag cagtcctcct gccttggcct 3960
 cccaaagtgt tgggattaca ggcataagcc actgctccca gccttatttc gtatatttac 4020
 tataagtgtg tgaaggcat gatcagaact gccatataat ttggcgggaa aatctatcac 4080
 cctcagatcc aggagtccat ggatatcttg tttttaaacc gaagatttaa aaaattaccg 4140
 caatggcaga gatggagccc caagagaata ctcagcttta acccaagggt ttgacaggtt 4200
 ggaaacagtg gctaaatttg gggattgcag tggggcgagg caggggtcag gtcagagggg 4260
 gccagaaggg ccccagccat cctagatgga gccacaagta ccagtgccaa ggctcttgg 4320
 ctggaattct gaaaacattt acctctgacc ctggcagccc actggccatt gcttgtgtgc 4380
 agcccagtgt gcagggaaac ctatccatga tttgcccct cttttctggt cccttcagta 4440
 tgaaccagc atcacagtgc acttgtggca gatggcagtg catacccggg agctactctc 4500
 ctccggccag atgcccttct cccagctgcc cgccgtgtgg cagctctacc cggggaggaa 4560
 gtaccgagca gcggtattca gtttctggga aatagcagac catggccagg caagtgtgtg 4620
 gtggttctag gtgaaagcga caggtggccc ctggtgactg ccgtggccct ctctctctg 4680
 tgccccgtgc ccccttgggg ttcttctctg tctcttctct gttgctcaag tcttcttca 4740
 aggaggcctg agtgtgtgtg ggtggatcgg tgcattgatt cccatgtggg atgcaggcag 4800
 agtgggtgag ggagggaggg ttgccttccc tgggctaggg aaatccataa gctggagttc 4860
 ccacctgct caccctgcc tgcctgctgct gccagcctgc atgggcccgt gtaaggcca 4920
 actggaagag catctcccag aggtctgat ggctgctccc tctcctgcag attgactcta 4980
 tggagcagct ggtcctaaca taccagccgg agaggaaaga ctgacctgg gagtggctgg 5040
 tatgttgggg cctgtgctg ctccgtgtgag ggatcagacg aaagtgaga gacctctcct 5100
 ctttccagaa agacggcgtg gcctcctcct cctgctgtt tgctgagatt tttcttaacat 5160
 agccacctgt cactctgtt ccccagcccc ttggatgtga tggtaacacag tgggtgggcc 5220
 ccataataa gttcctaaag catgggatct catogaataa gactcatcat ttaatcctg 5280
 tgagaatttt gtgagtgta cgtgttaatg tcccatttca cgacgaaaag acaagactct 5340
 ggggatggga atgacttct ctagaccata cagccaggaa atagcgtgga atctagtgat 5400
 ctccggctcc tagattaac catggcactg aggtgccgtg tgaccgtggc cttggaggac 5460
 ccagctaga cccatagagg gctcctctca gatgggcagc agcttggagc aggccaggca 5520
 gggcctgtgc cattggagg gctggcactg gacttgcctt tgaccccagc agcttggatg 5580
 ggggtccggg ctccccata gtccactgac tgtctcctt ggtcttctcg caggccctgc 5640
 tggccctgcc tcttctggcc tgggtctctc tcatgcccc tcagtgagga tcttcatgta 5700
 cctgctcttc tgtttgcaca cccagcatag cctccttgca ggcagaaggc agtagggccc 5760
 ctgcacactc agtttctctc gtttcttca gtatcagtc ctgtcctgtc ccactcaggt 5820
 ctgtacttag ggcagctggc ctggatgggc ttcaactggg ccctgtctgt gtgctgagcc 5880
 agtttcccct gctggctgca agctgtgggt tcttctcct ctgtgcccct catgctgatc 5940
 ttctagatgc cactccaaa tcccctcat acccaccagg atgtgtgcc agccaggcct 6000
 ccagcaccct cagtgcagct cgtgattgga aactcaccat cggcaggcag tggttcggtt 6060
 taagagatgg cattagagg agcccagtct ggatgtggac ttggatgcc tgtgggtatc 6120
 agttctgctg acacttggc ccgaaataga tccagtgtg agcaagcaat gtacaccgga 6180
 gcctcagtga gcccatctgc acagtgggga gcatggagg atgggtttg cctgtgcttc 6240
 tgcttattca gtcctcagc tcacggaagg gatgctagtc cgtgaagggt acctcacagt 6300
 actggttaat taaactttat tgctcactgt ccaactttgt gctgaattgg agcctctctt 6360
 tgacctctt tagcataga aatggcagct tctggtaccg aaatgttaag gtaacatttt 6420
 aatgatccat ttcatattt tccactgg gaaggaaatt gtgattggc cattcagcag 6480

【0161】

【化7】

caggac

6486

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Croce, Carlo

<120> TCL-1b Gene and Protein and Related Methods and Compositions

<130> CRO 01.PCT03

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver..2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 1

ggcagctcta ccccggatg aa

22

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 2

acagacctga gtgggacagg a

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 3
tcctccttgg caggagtggg a 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 4
cagttacggg tgctcttgcg t 21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 5
atggcctcgg aagcttctgt g 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 6
tggtcgtgcg gttcaatccc t 21

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 7
aatctggcca tggctctgcta.tttc

24

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primers

<400> 8
tgctaggacc agctgctcca taga

24

<210> 9
<211> 1152
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
gaggcgggtc ccggttgacg acttgccatg gcctccgaag cttctgtgcg tctaggggtg 60
ccccctggcc gtctgtggat ccagaggcct ggcatctacg aagatgagga ggggagaacc 120
tgggtgactg tggctgtgcg gttcaatccc tcgctgtaggg aatgggccag ggcctcccag 180
ggcagcagat atgaaccag catcacagtg cacttgtggtc agatggcagt gcatacccag 240
gagctactct cctccggcca gatgcccttc tcccagctgc ccgccgtgtg gcagctctac 300
cccgggagga agtaccgagc agcggattcc agtttctggg aaatagcaga ccatggccag 360
attgactcta tggagcagct ggtcctaaca tatcagccgg agaggaaaga ctgacactgg 420
gagtggctgg ccctgctggc cctgcctctt ctggcctggt gtctcctcat gcccctcag 480
tgaggatctt catgtacctg ctcttctggt tgcacacca gcatagcctc cttgcaggca 540
gaaggcagta gggcccctgc aactcagtt tctctcgttt tccttagtta tcagtcctgt 600
cctgtcccac tcaggtctgt acttagggca gctggcctgg atgggcttca ctggggccct 660
gtctgtgtgc tgagccagtt tcccctgctg gctgcaagct gtgggttctt tctcctctgt 720
gcccctcatg ctgatcttct agatgccact cccaaatccc cttcataccc accaggatgt 780
gtcccagacc aggcctccag cacccccagt gcagctcgtg attggaaact caccatcggc 840
aggcagtggt tcggtttaag agatggcatt agagggagcc cagtctggat gtggacttgg 900
atgccctgtg ggtatcagtt ctgctgacac ttggcccga aatagatcca gtgctgagca 960
agcaatgtac accggagcct cagtgagccc atctgcacag tggggagcat ggaggatgg 1020
gtttggcctg tgcttctgct tattcagtc cttcagctcac ggaagggatg ctagtccgtg 1080
aaggtgacct cacagtactg gtttaattaa ctttattgct cactgtcaaa aaaaaaaaaa 1140
aaaaaaaaaa aa 1152

<210> 10
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Ala Ser Glu Ala Ser Val Arg Leu Gly Val Pro Pro Gly Arg Leu
 1 5 10 15
 Trp Ile Gln Arg Pro Gly Ile Tyr Glu Asp Glu Glu Gly Arg Thr Trp
 20 25 30
 Val Thr Val Val Val Arg Phe Asn Pro Ser Arg Arg Glu Trp Ala Arg
 35 40 45
 Ala Ser Gln Gly Ser Arg Tyr Glu Pro Ser Ile Thr Val His Leu Trp
 50 55 60
 Gln Met Ala Val His Thr Arg Glu Leu Leu Ser Ser Gly Gln Met Pro
 65 70 75 80
 Phe Ser Gln Leu Pro Ala Val Trp Gln Leu Tyr Pro Gly Arg Lys Tyr
 85 90 95
 Arg Ala Ala Asp Ser Ser Phe Trp Glu Ile Ala Asp His Gly Gln Ile
 100 105 110
 Asp Ser Met Glu Gln Leu Val Leu Thr Tyr Gln Pro Glu Arg Lys Asp
 115 120 125

<210> 11

<211> 6486

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

tctctctct cccctcctc ccccgactgg caaccgcccc actgcccggcc ccgccccccac 60
 tgccggcccg ggccccacc acgccggagc tgctccattt aaggagattg cgcagctgga 120
 aagctacacg tgtgagccta gaggcgggtc ccggttgacg acttgccatg gcctccgaag 180
 cttctgtgcg tctaggggtg cccctgggcc gtctgtggat ccagaggcct ggcactctacg 240
 aagatgagga ggggagaacc tgggtgactg tggctgtgcg gttcaatccc tcgcttaggg 300
 aatgggccag ggcctcccag ggcagcagag tgagtcctgg gcacgagggg aggctgtggg 360
 gagggctgcg cactgacccc tgcccgtgtg ggaccgcggt gggggtcaga gggggccggt 420
 ctcacccgca ctggaaaact cacttctgtg caggtctagg agcgcagcaa tgtccatgcc 480
 cagccctggc cccaggaaca ccccccgtaa agggaccaca ggcacaagct tatccacatg 540
 agataatgtg gtctgtcgtg gtgaagccga ggctaaggta gctcagggct tagtgccatt 600
 cccagtgcot gctgggaagg cccacaaatg gggcagctat tgagctgggc tttgtgggat 660
 gagtaggagt tctccaggtc tagaaaggag gcaggagtag tataagcaaa agcattgcag 720

cctggaggca ccagggtgggc caacaggatg aacatgacat tgggtgcaga ttactgatct 780
 gcaaaatgag aataatatac ctctgtggca agctagtccac agacatgctc acatacatgg 840
 ctccaccgct gaattggcctg gggaagcatt tgactgataa cagattctgg aaattaattc 900
 aggaggcttg ggtggagtcc tagattcttt acttttcaaa agctccccag gtgataatga 960
 taatgactca ggaacggct gtatagagg gcttttagatc acagccagtc tttgagggat 1020
 gaagtaata cagtacgctc tctggtgtgg gtggcgtgg ggaattgatt ccaggaccga 1080
 ctgtggatgc tcaagtcct gatagaaaat gacctgggta gtaattacat ataacctcag 1140
 cgcacctct actatatttg aaatcagatt actaataaca cctaattgcta cacctacaca 1200
 tcacttcaag ctctgctttt gggaactttg tggaaattct ttttttcccc aaatattttt 1260
 aatctgaggt tagtgcgaatt catgggtgca gtatccatgg aaatgggggg ctggctgtac 1320
 cttagtgtaa tgtggtaaaa gcataatccgg atatttaaaa tgccatttag ggctggggcg 1380
 ggtggctcac gctgtaatc ccagcacttt gggaggccga gatgggctta tcacgagatc 1440
 aggagatcga gaccatccta gccaacatgg ggaacccccg tctctactaa aaatacaaaa 1500
 aattagccgg gctggtggc ggacccctgt agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg 1560
 agaatggcgt gaacccggga ggcgaagctt gtagtgagcc gagatcgac cactgcactc 1620
 cagcctgggt gacagagtga gactccgtcc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aatgccgttt 1680
 aggtcttctg aaacaattca ctgcctgttt gtttgtttt tgagaaagtc ttgctctgtt 1740
 gcggctggag tgcactgggt tgatgttggc tcactgcaac ctccacctcc caggctcaag 1800
 tgattctcat gcctcagcct cccgagtagc ttggattaca ggcgattttt ttttacagtt 1860
 aattttttt gttattttca ggagagacaa aagtttaatc atgtgggcca ggctggtttt 1920
 gaactcctga cctcaagtga tctgccacc ttggcctccc aaagtgtctg gattacaggt 1980
 gagccacctc gccagccag ttcactgaca ctttaacaa tataacacat ttctaaaaa 2040
 aagttcaaat aggttatttc aaaaaatgtt ggtagagaac atggaaaggc ttttctgtac 2100
 atacactaaa taaagcatgc aaaaattgtg gagcaaatat ttaagtttt tcaaaagcct 2160
 gaaaaagtgt taatggaggg cactgtaaaa tgggtgcagcc actatggaaa acaggatgag 2220
 gatttctcaa aaaaaaagt acggcataat ccagcaatgc cacttctgga tatatacca 2280
 caagactctg aagccggaac ttaagcatgt attcatacat coatgttcac agcagtatca 2340
 ttcatactag ccaaaagggt gtggcagccc ccgtgtccat tgatagatga atgggtaaac 2400
 aacacaaacc atgaagtatt cacccttaa agtcagacac acggatgaaa cttggagcca 2460
 ttatactaaa tgaatatgca cagtacgga aggacagatt ctcttgtatg aggtactcag 2520
 agtggctca ttcataaagt ggaatgtag ctgccaggg ctggaggag tcgaggatgg 2580
 gaagttaatg ttagtacag gtacggagtc tcagtttggg aagataaaaa gttctggagg 2640
 tggatagtgc cgacggttcc acatgtcaat gcacttaatg ccaccaaact gtactcttaa 2700
 aaacagttga ccgggcacgg tggctcacgc ctgaatcca gcaacttggg ggaccgaggc 2760
 gggcgatca caaggtcagg agatcgagac catcctggct aacacgggtg aaccccgtct 2820
 ctactaaaa tacaagaaga ttagccgggt gcgggtggcg gcgtctgtag tcccagctac 2880
 tcggggggct gaggcaggag aatggcttga acctgggagg cggagcttgc agtgagctga 2940
 gatccagcca ctgactcca gctgggcca cagagcaaga ctccgtctca aacaaaacaa 3000
 agcaaaacaa aaaaaacagt taagattttt tttttttta aatgattcag tggaaataga 3060
 atggattctt caaataactt agccaagggt gggataaggg acctacttag taagtatttt 3120
 ttcccttct ttctaaaaa tagatcgatg tcttagggtg ggaattaggc ttccctggcg 3180
 acacatctaa tgcaagatc agccacctt ttctgtaaag gatctgatgg taaacatttt 3240
 ccacttgaga gctatgctct tgcagctact cagctctgct attgcagtc aaaagcagct 3300
 aaaggcaacg gtaaaggaat gacggaagga gccttagttt atttacaata aagctttatt 3360
 tgcaaaagca gatgcaagcc agacttagtt tgctgatctc tgatctacag tcagaataca 3420
 cagagaagga gagattttgc cgtataattt aaaatacttc tctttgcaaa agcagtccat 3480
 aaaaaagtg aggacaacaa actgagaaaa attattcaca acatgtctga ttgatagagc 3540
 actaatattc ttaattcaaa aagacatttt atcaaaaaa aagacaaata cttagaaaaat 3600

tgtgcaaaag aactttccatt ttgttgcata acgtaggaag ctttggtttt acttttcceta 3660
 tcatctttct aactttccagt accagcctaa ttttgttatt tttattatta tgtatttatt 3720
 ttgagacaga gtcttgctct gtctcccagg ctggagtgca gtgacctgac gatagcttac 3780
 aacagcctct acctcccagg tcaagaat cttctcaact tagcttcccg agtagctggg 3840
 actgtaggca catgccacca tggccagcta attttttatt tttttagag acagagtctc 3900
 attatgttgc cgaggctggt ctggaactog tggcttcnag cagtctcct gcottggcct 3960
 cccaaagtgt tgggattaca ggcataagcc actgctccca gccttatttc gtatatttac 4020
 tataagtgtg tgaaggtcat gatcagaact gccatatatt ttggcgggaa aatctatcac 4080
 cctcagatcc aggagtccat ggatatcttg tttttaaacc gaagatttaa aaaattaagg 4140
 caatggcaga gatggagccc caagagaata ctccagcttta acccaagggtg ttgacaggtt 4200
 ggaacacagt gctaaatttg gggattgcag tggggcgagg cagggtgcag gtcagagggg 4260
 gccagaaggg ccccagccat cctagatgga gccacaagta ccagtgccaa ggctcttggt 4320
 ctggaattct gaaaacattt acctctgacc ctggcagccc actggccatt gcttgtgtgc 4380
 agcccagttg gcaggggaacc ctatccatga tttgcgcct cttttctggt cctttcagta 4440
 tgaaccacgc atcacagtgc acttgtggca gatggcagtg catacccggg agctactctc 4500
 ctccggccag atgcccttct cccagctgcc cgcctgtgg cagctctacc ccgggaggaa 4560
 gtaccgagca ggggattcca gtttctggga aatagcagac catggccagg caagtgtgtg 4620
 gtggttctag gtgaaagcca cagggtggcc ctggtgactg ccgtggcct ctctctctg 4680
 tgcctctggc ccccttgggg ttcttctctg tctcttctct gttgctcaag tcttcttca 4740
 aggaggcctg agtgtgtgtg ggtggatcgg tgcctgagtt cccatgtggg atgcaggcag 4800
 agtgggtgag ggaggggagg ttgccttccc tgggctaggg aaatccataa gctggagttc 4860
 ccacctgcct caccctgcc tctgtctgct gccagcctgc atgggogggc gtttaaggcca 4920
 actggaagag catctcccag aggttctgat ggtgctccc tctctgacg attgactcta 4980
 tggagcagct ggtcctaaca tctcagccgg agaggaaaga ctgacactgg gagtggctgg 5040
 tatgttgggg cctctgtcgt ctccgtgtag ggatcagacg aaagtggaga gacctctct 5100
 cttttcagaa agacggcgtg gcctctctct cctctgtgtt tgctgagatt tttcttacct 5160
 agccacctgt cactctgtt ccccagccc ttggatgtga tggtagacag tgggtgggccc 5220
 cccataataa gttcctaag catgggatct catcgaataa gactcatcat ttaatccttg 5280
 tgagaatttt gtgaggtgta cgtgttaatg tcccatttca cgacgaaaag acaagactct 5340
 ggggatggga atgacttctc cgagaccata cagccaggaa atagcgggtg atctagtgat 5400
 ctccgggtccc tagatttaac catggcactg aggtgcctg tgcaggtggc ctggaggac 5460
 ccagcactga cccatagagg gctcctctca gatgggcagc agcttggagc aggccaggca 5520
 gggcctggtc cattggaggg gctggcactg gacttgctt tgaccccagc agcttggatg 5580
 ggggtgccgg ctccccata gttcactgac tgtctcttt ggtcttctog caggccctgc 5640
 tggcctgcc tcttctggcc tgggtctctc tcatgcccc tcagtggga tcttcatgta 5700
 cctgctcttc tgtttgcaca cccagcatag cctccttga ggcagaaggc agtagggccc 5760
 ctgcacaetc agtttctctc gtttctctta gttatcagtc ctgtcctgtc ccactcaggt 5820
 ctgtaacttag ggcagctggc ctggatgggc ttcactgggg ccctgtctgt gtgctgagcc 5880
 agtttccct gctggctgca agctgtgggt tcttctctct ctgtgccct catgctgatc 5940
 ttctagatgc cactccaaa tccccttcat acccaccagg atgtgtgccc agccaggcct 6000
 ccagcaccce cagtgcagct cgtgattgga aactcaccat cggcaggcag tggttcgggt 6060
 taagagatgg cattagaggg agcccagctt ggatgtggac ttggatgccc tgtgggtatc 6120
 agttctgctg acactttggc ccgaaataga tccagtgtct agcaagcaat gtacaccgga 6180
 gcctcagtga gcccatctgc acagtgggga gcatggaggg atgggtttgg cctgtgcttc 6240
 tgettattca gtccttcagc tcaoggaagg gatgctagtc cgtgaagggt acctcagct 6300
 actggttaat taaactttat tgctcactgt ccacttttgt gctgaattgg agctctctt 6360
 tgacctctt ctagcataga aatggcagct tctggtaccg aaatgttaag gtaacattt 6420
 aatgatccat tcatatttt tccacactgg gaaggaaatt gtgattggtc cattcagcag 6480

【図面の簡単な説明】

【図1】 T c l 1、T c l - 1 b および M t c p 1 の配列比較。同一性は黒い四角、類似性は灰色の四角で示されている。T C L 1 と M c t p の G e n B a n k のアクセス番号はそれぞれX82240とZ24459である。

【図2】 T C L 1 および T C L 1 b 遺伝子のゲノム構成。縦の矢印はクローン化された14q32.1の切断点を示す。BssHII (B)、ClaI (C)、EagI (E)、SfiI (F)、KspI (K)、MluI (M)、NotI (N)、NruI (R) および Sall (S) には制限部位がある。黒い長方形はT C L 1 と T C L 1 b のエクソンを示す。

【図3】 T C L 1 および T C L 1 b 遺伝子のノーザン分析。(A) ヒト免疫系ノーザン法。レーン1-6: 脾臓; リンパ節; 胸腺; 末梢血白血球; 骨髄; 胎児肝臓。(B) ヒト癌細胞系ノーザン法。レーン1-8: 前骨髄球白血病、HL-60; ヒーラ細胞; 慢性骨髄性白血病、K-562; Tリンパ芽球性白血病、MOLT-4; バーキットリンパ腫ラージ; 結腸直腸腺癌、SW480; 肺癌、A549; メラノーム、G361。(C) レーン1-6: バーキットリンパ腫ラージ; バーキットリンパ腫ドーディ; バーキットリンパ腫CA-46; SupT11; 骨髄; 胎盤。(D) レーン1: 骨髄; レーン2-7、EBV形質転換リンパ芽球細胞系: Ado-1471; Ado-1476; Ado-1701; Ado-1727; Ado-2069; Ado-2199; レーン8: CA-46。(A-D)。上、T C L 1 b プローブ; 中、T c l 1 プローブ; 下、アクチンプローブ。

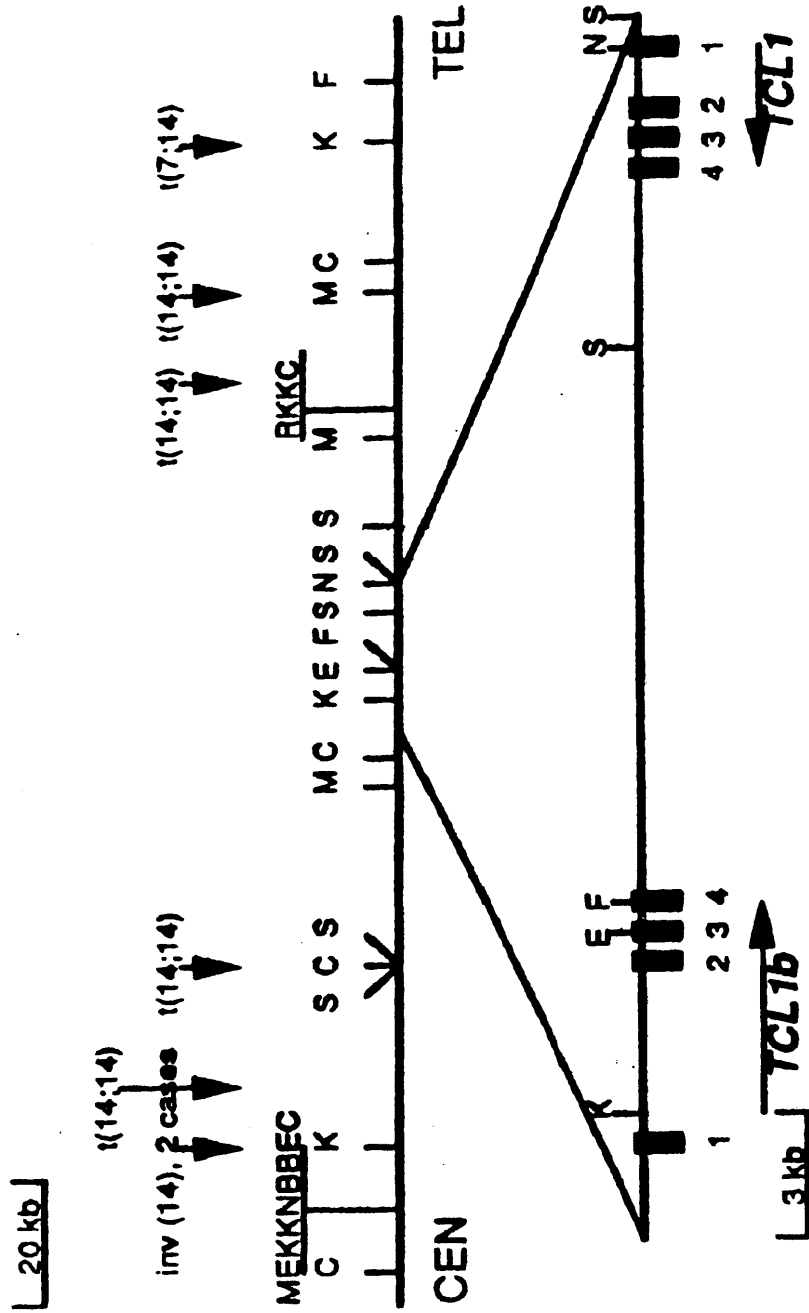
【図4】 T C L 1 と T C L 1 b 遺伝子のRT-PCR分析。(A) 正常なヒト組織。レーン1-23: 心臓; 肝臓; 脳; 筋肉; 胎盤; 腎臓; 肺; 膵臓; 脾臓; リンパ節; 胸腺; 扁桃腺; 末梢血白血球(PBL); 胎児肝臓; 胎児脳; 胎児肺; 胎児腎臓; 胎児心臓; 胎児骨格筋; 胎児脾臓; 胎児胸腺; 陰性対照。(B) レーン1-4、T細胞PLL試料: 3047; 3046; 3050; 3048。レーン5-6: 骨髄; PBL。(A-B)。上、T C L 1 b プライマー; 中、T C L 1 プライマー; 下、対照G3PDHプライマー。

TCL1 1 MAECP TLGEAVTDHPDR LWAWEK F YLDEKQ AW P T EIKDR LQ
 MTCPI 1 ~~~MAGEDV GAPPDE L W HQEG IYRDEY QRTWVA VVEE L T S F L R
 TCL1b 1 ~~~MASEASVR L GVP PGR L W Q R P G I Y E D E I G R T W T V V R F N P S R R E W A R A S Q G S R Y E P S

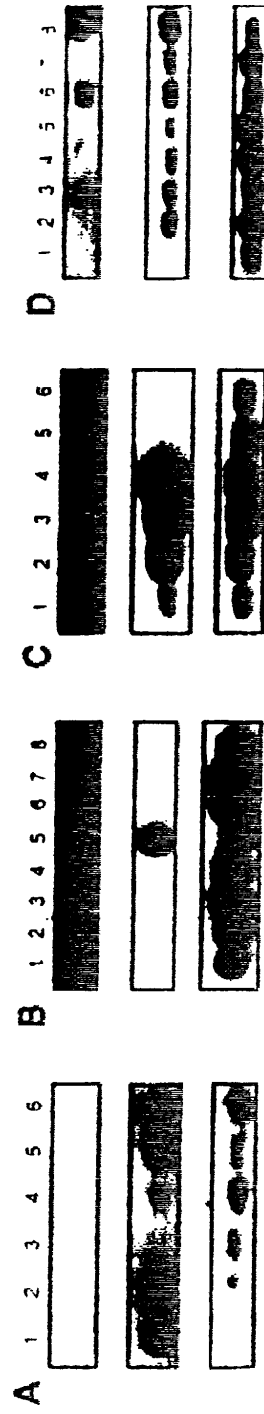
TCL1 47 RRV L R R R E D V V L G R P P Q G P S L L P M W Q L Y P G R Y R S D S S E W R V Y H K I D G V E
 MTCPI 42 A R V . . Q Q Q M P L G A A R P H L T S Q L P M W Q L Y P E R Y M D N S R L M Q I Q H H M R G V Q Y L
 TCL1b 59 T V H L M Q A V H T R L S G Q P T S Q L P A W Q L Y P G R Y R A A D S S E W E I A D H G Q I D S M E Q L

TCL1 107 L L E L L P D D ~ ~
 MTCPI 100 L L K L L P D D ~ ~
 TCL1b 119 L L T Y Q P R K D

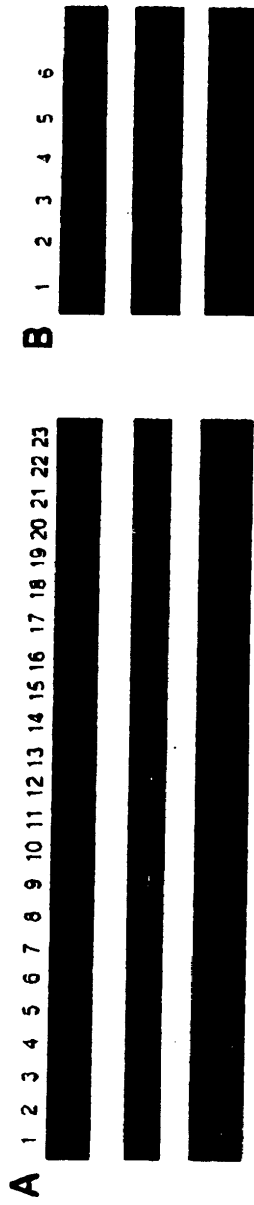
【図2】



【图3】



【図4】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/06612
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : 536/24.5; 530/387.1, 387.9; 435/4, 7.1, 7.21, 7.23; 514/2, 44 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/24.5; 530/387.1, 387.9; 435/4, 7.1, 7.21, 7.23; 514/2, 44 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, CANCERLIT, BIO. AND AGRI. INDEX, CUR. BIOTECH AB., CLAIMS/U.S. PAT. AB., CHINESE PAT. AB., EUROPEAN PAT., DERWENT, IMSWORLD PAT., EMBASE, MEDLINE, WIPO/PCT PATENTS, DIALOG, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CONDORELLI et al. T-Cell-directed <i>TAL-1</i> Expression induces T-Cell Malignancies in Transgenic Mice. Cancer Research. 15 November 1996, Vol. 56, pages 5113-5119.	29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
'B' earlier document published on or after the international filing date		'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
'I' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		'A' document member of the same patent family
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
04 MAY 2000	19 MAY 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer ALANA M. HARRIS, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/06612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

C07H 21/00, 21/04; C07K 16/00, 17/00, 17/02, 17/04; G01N 33/53, 33/574; A61K 38/00, 38/04, 38/08, 38/16, 48/00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/06612

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-14, 17, 19-24, 27, 28 and 30
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The search on these independent claims, as well as their dependent claims could not be conducted because the CRF for this case is defective.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K	39/395	A 6 1 P 35/02	4 C 0 8 5
	48/00	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 6
A 6 1 P	35/02		4 C 0 8 7
C 0 7 K	14/47		4 H 0 4 5
	16/18	C 1 2 N 1/15	
	19/00		
C 1 2 N	1/15		
	1/19	C 1 2 Q 1/68	A
	1/21	G 0 1 N 33/53	D
	5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 N 15/00	Z N A A
G 0 1 N	33/53	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P	21/02	C 1 2 N 5/00	A
(72)発明者	ピカースキー、 ユリ アメリカ合衆国、19111 ペンシルベニア 州、フィラデルフィア、ヴェリー ロード 8110、アパート エー307		
Fターム(参考)	4B024 AA01 AA12 BA36 BA45 CA04 EA04 GA11 HA12 HA15 4B063 QA01 QA08 QA18 QA19 QQ43 QR55 QR62 QS34 4B064 AG01 CA19 CC24 DA05 DA14 4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46 4C084 AA06 AA07 AA13 BA01 BA02 BA21 CA53 NA14 ZB272 4C085 AA13 AA14 DD62 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB27 4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 NA14 ZB27 4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 CA41 DA76 DA86 EA28 EA51 FA74		

专利名称(译)	TCL-1b基因，蛋白质，与其相关的方法和与其相关的物质		
公开(公告)号	JP2003519463A	公开(公告)日	2003-06-24
申请号	JP2000605597	申请日	2000-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	托马斯杰弗逊大学		
申请(专利权)人(译)	托马斯杰弗逊大学		
[标]发明人	クロセカル口エム ピカースキーユリ		
发明人	クロセ、カル口、エム ピカースキー、ユリ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/711 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/02 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68		
CPC分类号	C07K14/47 A61K38/1709		
FI分类号	A61K31/711 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P35/02 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/53.D C12P21/02.C C12N15/00.ZNA. A A61K37/02 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024 /HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065 /AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA21 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084 /ZB272 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD62 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB27 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087 /AA03 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZB27 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	60/124714 1999-03-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决方案：位于人类染色体14q32.1基因座的TCL1基因家族被认为与T细胞恶性肿瘤有关。本发明公开了该基因家族的新成员TCL-1b基因的鉴定和鉴定。TCL-1b基因序列在正常骨髓和外周血淋巴细胞中的表达水平非常低，但在T细胞白血病和淋巴瘤中通过在14q32.1位点重组而被激活。本发明涉及这些14号染色体异常的鉴定，检测和治疗任何正在发展的T细胞恶性肿瘤的方法以及预防这些T细胞恶性肿瘤的发展。