

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成23年4月14日 (2011.4.14)

【公表番号】特表2010-538093(P2010-538093A)

【公表日】平成22年12月9日 (2010.12.9)

【年通号数】公開・登録公報2010-049

【出願番号】特願2010-524197(P2010-524197)

【国際特許分類】

A 6 1 K 36/53 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 19/10 (2006.01)

A 6 1 P 5/30 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 35/78 Z N A Q

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 19/10

A 6 1 P 5/30

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 9/00

C 1 2 N 5/00 1 0 2

C 1 2 N 5/00 2 0 2 A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成23年2月4日 (2011.2.4)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 4】

ER+株化細胞は、レポーター遺伝子を制御するEREを含むプロモータを有するベクターで形質転換される。例えば、ベクターは、ERE、最小チミジンキナーゼプロモータ（tk）およびルシフェラーゼ遺伝子（Luc）を含むウイルスベクターであり得る。構築物を公知の方法で標的細胞に形質移入し、ER-ERE-tk-Lucシステムの発現を、例えば、既知量のE2の存在下、推定上のER+細胞上で上記アッセイを行うことにより確認する。ER+細胞の首尾良い形質転換を検証するための他の方法には、公知のER抗体での免疫染色が挙げられる。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 5】

ERE含有プロモータは、ERE配列およびプロモータ配列を含むDNAである。プロモータ配列は、最小チミジンキナーゼ（tk）プロモータ配列などの当該分野で公知のプロモータ配列である。他のERE含有プロモータも可能であり、本発明の範囲内である。EREおよびプロモータ配列は共に作動して、レポーター遺伝子の発現を調節する。本明細書中に記載のように、エストロゲン性物質（例えば、植物抽出物もしくはE2）はERに結合してER二量体を形成し、AF-2表面を形成する。次いで、ER二量体はEREに結合し、プロモータの制御下で遺伝子を活性化する。いくつかの実施形態では、EREは、プロモータの直接的に上流にあり（5'-to）、それにプロモータが直接的に結紮する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0088

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0088】

プラスミドの構築。ヒトTNF- α 遺伝子pLT由来のPstI～AhaII断片（-1044～+93）を、ルシフェラーゼcDNAの上流にクローン化した。5'欠失を、独特の制限部位（-125欠失についてApaI、および-82欠失についてStyI）を用いることにより構築した。-125～-82 [TNF応答性配列（TNF-RE）]由来のヒトTNF- α プロモータ断片の3つのコピーもしくはカエルビテロゲニンA2遺伝子（vitA2-ERE、5'-TCAGGTCACAGTGACCTGA-3'）（配列番号1）由来のEREの1つのコピーを、ルシフェラーゼ（それぞれ、TNF-RE tkLucおよびERE TKLuc）に連結した-32～+45単純ヘルペスチミジンキナーゼ（TK）プロモータの上流に結紮した。ER β 変異体を、QuickChange部位特異的変異誘発キット（Stratagene）を用いて、変異を含むオリゴヌクレオチドを用いることにより創製した。変異体をSequenaseキット（Amersham Pharmacia）を用いて配列決定することにより、変異の存在を検証した。

。