

【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1部門第1区分

【発行日】平成18年5月18日(2006.5.18)

【公表番号】特表2006-504397(P2006-504397A)

【公表日】平成18年2月9日(2006.2.9)

【年通号数】公開・登録公報2006-006

【出願番号】特願2003-578416(P2003-578416)

【国際特許分類】

C 12 N	15/09	(2006.01)
A 61 K	31/711	(2006.01)
A 61 K	39/395	(2006.01)
A 61 K	45/00	(2006.01)
A 61 K	48/00	(2006.01)
A 61 P	7/02	(2006.01)
A 61 P	9/10	(2006.01)
A 61 P	17/02	(2006.01)
A 61 P	19/08	(2006.01)
A 61 P	19/10	(2006.01)
A 61 P	35/00	(2006.01)
A 61 P	35/04	(2006.01)
C 07 K	14/47	(2006.01)
C 07 K	16/18	(2006.01)
C 12 N	1/15	(2006.01)
C 12 N	1/19	(2006.01)
C 12 N	1/21	(2006.01)
C 12 Q	1/02	(2006.01)
C 12 Q	1/68	(2006.01)
G 01 N	33/15	(2006.01)
G 01 N	33/50	(2006.01)
G 01 N	33/574	(2006.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)
C 12 N	5/06	(2006.01)
A 61 K	38/00	(2006.01)
C 12 P	21/08	(2006.01)

【F I】

C 12 N	15/00	Z N A A
A 61 K	31/711	
A 61 K	39/395	D
A 61 K	39/395	N
A 61 K	45/00	
A 61 K	48/00	
A 61 P	7/02	
A 61 P	9/10	1 0 1
A 61 P	17/02	
A 61 P	19/08	
A 61 P	19/10	
A 61 P	35/00	
A 61 P	35/04	
C 07 K	14/47	

C 0 7 K	16/18	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/574	A
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 N	5/00	E
A 6 1 K	37/02	
C 1 2 P	21/08	

【手続補正書】

【提出日】平成18年3月23日(2006.3.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号：1で説明されるヌクレオチド配列；
 (b) 配列番号：2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列；
 (c) (a)または(b)の配列と少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列；
 (d) (a)、(b)、または(c)の配列の少なくとも50個の連続するヌクレオチドの部分配列(ただし、該部分配列は、配列番号：1のヌクレオチド1027からヌクレオチド1076の範囲でない)；または
 (e) (a)、(b)、(c)、または(d)の任意のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、
 を有する単離核酸分子。

【請求項2】

(a) または(b)の配列と少なくとも85%の同一性を有する該ヌクレオチド配列を有する、請求項1に記載の核酸。

【請求項3】

配列番号：2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコード化する、請求項1に記載の核酸。

【請求項4】

配列番号：1に対するアンチセンスであるかまたはそれと少なくとも85%の同一性を有する配列であって、少なくとも50個の連続するヌクレオチドの部分配列を有する、請求項1に記載の核酸。

【請求項5】

請求項1から4のいずれか1項に記載の核酸分子を含む、核酸ベクター。

【請求項6】

請求項5に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項7】

(a) 配列番号：2で説明されるアミノ酸配列；

(b) (a) の配列と少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列；または (c) (a) または (b) の配列の少なくとも 30 個の連続するアミノ酸の部分配列（ただし、該部分配列は、配列番号：2 のアミノ酸番号 1102 から 1152 の範囲でない）、
を有する単離ポリペプチド。

【請求項 8】

(b) の該アミノ酸配列が、配列番号：2 の該アミノ酸配列の少なくとも 1 個のアミノ酸の保存的置換を含む、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

該ポリペプチドが幹細胞分化誘導活性を有する、請求項 7 または 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号：2 で示されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

配列番号：2 または配列番号：4 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを特異的に認識する抗体。

【請求項 12】

薬剤として用いるための、テネイシン W を特異的に認識する抗体。

【請求項 13】

該抗体が、薬剤として用いるための、配列番号：2 または配列番号：4 で示されるアミノ酸配列を有するテネイシン W を特異的に認識する、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 14】

癌の予防または処置のための医薬の製造のための、テネイシン W を特異的に認識する抗体の使用。

【請求項 15】

癌が転移性である、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】

癌が固形腫瘍である、請求項 14 または 15 に記載の使用。

【請求項 17】

癌が、膠芽細胞腫、前立腺癌腫、肺癌腫、結腸直腸癌腫、骨癌腫、または乳癌腫である、請求項 14 から 16 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 18】

過剰骨成長に起因する骨疾病の予防または処置のための、テネイシン W を特異的に認識する抗体の使用。

【請求項 19】

(a) 配列番号：1 または配列番号：3 で説明されるヌクレオチド配列；
(b) 配列番号：2 または配列番号：4 で示されるアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列；
(c) (a) または (b) の配列の任意の 1 つと少なくとも 35% の同一性を有するヌクレオチド配列；
(d) (a)、(b)、または (c) の配列の少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドの部分配列；および
(e) (a)、(b)、(c)、または (d) と相補的なヌクレオチド配列、
からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する単離核酸分子、
および、医薬的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体、
を含む、組成物。

【請求項 20】

該核酸分子が、配列番号：1 または配列番号：3 に対するアンチセンスである部分配列を有する、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

配列番号：2または配列番号：4で示されるアミノ酸配列をコード化する該単離核酸分子を含む、請求項19に記載の組成物。

【請求項22】

薬剤として使用するための、請求項19から21のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項23】

癌の予防または処置のための医薬の製造のための、請求項19から21のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項24】

骨病変の予防または処置のための医薬の製造のための、請求項19から21のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項25】

テネイシンW、および医薬的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含む組成物。

【請求項26】

該テネイシンWが組み換え体である、請求項25に記載の組成物。

【請求項27】

該テネイシンWが、

(a) 配列番号：2または4で説明されるアミノ酸配列；

(b) (a)の配列と少なくとも35%の同一性を有するアミノ酸配列；または

(c) (a)または(b)の配列の少なくとも30個の連続するアミノ酸の部分配列、を有するポリペプチドである、請求項25に記載の組成物。

【請求項28】

配列番号：4で示されるアミノ酸をコード化する該ポリペプチドを含む、請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

薬剤として使用するための、請求項25から28のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項30】

テネイシンWレベルの上昇を必要とする任意の疾病または状態、例えば、血栓症、創傷治癒、またはアテローム性動脈硬化症の処置または予防的処置、または骨形成の促進により改善される状態、例えば、骨折治癒、骨粗鬆症の処置または予防的処置のための医薬の製造のための、請求項25から28のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項31】

テネイシンWレベルの上昇を必要とする疾病または状態、例えば、血栓症、創傷治癒、アテローム性動脈硬化症、骨折治癒、および骨粗鬆症の処置または予防的処置のための方法であって、請求項25から28のいずれか1項に記載の組成物を有効量、該処置の必要な個体に投与することを含む、方法。

【請求項32】

骨細胞への幹細胞分化を誘導する方法であって、適当な幹細胞を、有効量の請求項25から28のいずれか1項に記載の組成物と接触させることを含む、方法。

【請求項33】

該幹細胞が間葉系幹細胞である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

幹細胞マーカーとしてのテネイシンWの使用。

【請求項35】

テネイシンWの機能のモジュレーターを同定する方法であって、試験化合物をテネイシンWを発現する細胞と接触させること、そして次に、該試験化合物が非存在である場合と比較して、

(a) 細胞増殖、例えば、細胞周期のS期に入る細胞のプログレッション；

(b) DNA合成；

(c) 細胞接着；

(d) 細胞伝播；

(e) フィブロネクチンでの病巣接着およびアクチンストレスファイバー形成；または
(f) 細胞の細胞外基質 (ECM) との結合、
の1つ以上での変化を測定することを含む、方法。

【請求項36】

テネイシンW発現の変化を該試験化合物の非存在下および存在下で測定することをさらに含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

該細胞がヒト細胞である、請求項35または36に記載の方法。

【請求項38】

該細胞が組織試料に存在する、請求項35から37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】

該細胞が血液試料に存在する、請求項35から37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】

テネイシンWの機能のモジュレーターを同定する方法であって、

(a) 試験化合物をテネイシンWおよび/または⁸1インテグリンと接触させること、および、該試験化合物が非存在である場合と比較して、

(b) 試験化合物のテネイシンWおよび/または⁸1インテグリンとの結合を測定すること、または

(c) テネイシンWの⁸1インテグリンとの結合の阻害を測定すること、
を含む、方法。

【請求項41】

対照化合物のテネイシンWとの結合を測定することをさらに含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

該テネイシンWが固体表面に結合される、請求項40または41に記載の方法。

【請求項43】

該結合が、蛍光標識、蛍光クエンチャーチャー、放射標識、シンチレーション標識、または酵素で標識された抗体を用いて検出される、請求項41または42のいずれか1項に記載の方法。

【請求項44】

テネイシンWの⁸1インテグリンとの結合の減少が、テネイシンWの機能のインヒビターの指標である、請求項41から43のいずれか1項に記載の方法。

【請求項45】

請求項40から44のいずれか1項に記載の方法により同定される、テネイシンWに依存する疾病または状態の予防または予防的処置のための物質。

【請求項46】

癌を診断または予後診断する方法であって、

(a) 個体から採取された試料をテネイシンWタンパク質または転写物の存在について分析すること、

(b) テネイシンWの存在を好ましくない予後診断または診断と関連づけること、
を含む、方法。

【請求項47】

請求項46に記載の癌を診断または予後診断する方法であって、(b)において、健常組織と比較したテネイシンWタンパク質または転写物レベルの上昇を、好ましくない予後診断または診断と関連づけることを含む、方法。

【請求項48】

該試料が個体由来の血清または血漿である、請求項46または47のいずれか1項に記載の癌を診断または予後診断する方法。

【請求項49】

該試料を⁸インテグリンの発現について分析すること(該⁸インテグリンの存在は

、好ましくない予後診断または診断と関連する)をさらに含む、請求項46から48のいずれか1項に記載の癌を診断または予後診断する方法。

【請求項50】

該試料中の細胞を細胞培養で増殖させることをさらに含む、請求項46から49のいずれか1項に記載の癌を診断または予後診断する方法。

【請求項51】

該テネイシンWタンパク質がテネイシンWに特異的な抗体を用いて検出される、請求項48から50のいずれか1項に記載の癌を診断または予後診断する方法。

【請求項52】

該テネイシンWの転写物がポリメラーゼ連鎖反応法を用いて検出される、請求項48から50のいずれか1項に記載の癌を診断または予後診断する方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0003】

世界の豊かな国では、癌は、5人中約1人の死亡の原因となり、最も一般的な5種類の癌は肺、胃、乳房、大腸／直腸、および子宮頸部である。この種の腫瘍は、たいてい、リンパ管および血管により、転移する。癌は、全ての場合で致命的であるわけではないが、癌を発症する約半数のヒトがそれにより死亡する。癌患者および彼らの医師に直面する問題は、癌を治癒させようとすることは雑草を駆除しようとしていることに似ているということである。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

癌を効果的に処置するための1つの方法は、初期での診断を受けることである。ほとんどの癌は、発症の初期では、広範には血管新生しない(それゆえ、浸潤性でない)。高血管新生、浸潤性、および体中に広がった最終的な転移性癌への移行は、通常、10年以上かかる。浸潤する前に癌が検出されると、癌にかかった組織の外科的除去が効果的な治療となる。しかしながら、癌は、しばしば、臨床的症状が現れた際にのみ検出される。一般的に、該症状は、疾病が十分に確立した場合(しばしば、転移が生じた後)にのみ現れ、患者の予後は、癌にかかった組織の外科的切除後でさえ、悪い。従って、癌の初期での検出は、検出が罹患率を有意に減少させるという点で重要である。初期で癌を診断する、信頼でき、非侵襲性、かつ正確な技術が、多くの命を助けるだろう。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

従って、テネイシンWレベルの増加を必要とする任意の疾病または状態、例えば、血栓症、創傷治癒、またはアテローム性動脈硬化症、ならびに骨形成の促進により改善される状態、例えば、骨折治癒、骨粗鬆症の処置または予防的処置のためのテネイシンWの使用、ならびに、テネイシンWの幹細胞マーカーとしての使用も提供される。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 0 2 6

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 0 2 6】

テネイシンWの機能のモジュレーターを同定する方法も提供され、これは、
(a) 試験化合物をテネイシンWおよび/または 8-1インテグリンと接触させること
、および、該試験化合物が非存在である場合と比較して、
(b) 該試験化合物のテネイシンWおよび/または 8-1インテグリンとの結合を測定
すること、または
(c) テネイシンWの 8-1インテグリンとの結合の開裂を測定すること、
を含む。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 3 2

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 0 3 2】

本発明者は、細胞外基質分子、発生中のその発現、細胞接着、および腫瘍細胞の増殖を調べ、そして、哺乳類テネイシンファミリーの新規メンバーを特徴付けた。本発明より前に、テネイシンWは哺乳類供給源から同定されておらず、その機能は以前は分かっていなかつた。本発明者は、マウスおよびヒトテネイシンWをコード化する完全cDNA配列を同定し、特徴付けた。抗血清は、テネイシンWのフラグメントに対して調製され、そして、腫瘍間質、骨膜、および肝臓組織でのテネイシンWを検出し、かついくつかの哺乳類種由来のテネイシンWと交差反応する。具体的に、本発明者は、テネイシンWが、転移性腫瘍細胞、ならびに骨膜、骨形成のための幹細胞成分で特異的に発現されることを発見した。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 3 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 0 3 3】

従って、1つの態様において、本発明は、

(a) 配列番号：1で説明されるヌクレオチド配列；
(b) 配列番号：2で示されるアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列；
(c) (a)または(b)の配列と少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列；
(d) (a)、(b)、または(c)の配列の50、75、100、200個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドの部分配列；および
(e) (a)、(b)、(c)、または(d)の任意のヌクレオチド配列または部分配列と相補的なヌクレオチド配列、

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する単離核酸分子を含む組成物を提供する。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 3 4

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 0 3 4】

組成物は、例えば、ゲノムDNA、cDNA、およびmRNAを含む、様々な種類の核

酸を含む。本発明の1つの態様において、ヌクレオチド配列を有する単離核酸分子は、好ましくは、(a)の配列(配列番号:1)と少なくとも85%の同一性、より好ましくは、90%の同一性、最も好ましくは、95、98、または100%の同一性を示す。配列番号:2で示されるアミノ酸を有するポリペプチド、または配列番号:2で示されるアミノ酸配列と比較して、アミノ酸欠損、付加(例えば、融合タンパク質)、または置換を含む変異体の様なその変異体をコード化する核酸も包含される。従って、たいていのアミノ酸は1以上の3塩基コドンによりコード化されるから、遺伝子コードの縮重により、該ポリペプチドをコード化できる様々な核酸は異なり得る。該コドンの同一性は、当該技術分野でよく知られており、該情報は、本発明の範囲の核酸の構築のために用いられ得る。変異体は、野生型タンパク質の生物学的活性を増強、付加または減少させる1以上のアミノ酸置換を有する点で、野生型タンパク質と異なる。アミノ酸の変異が選択されると、該変異体をコード化する核酸は、当該技術分野でよく知られた方法に従い、構築される。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

1つの実施態様において、核酸分子は、配列番号:2または配列番号:4で示されるアミノ酸配列、または配列番号:2または4に対応する配列と少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、70%、80%、90%、95%、または100%の同一性を有するアミノ酸を有するテネイシンWをコード化する。核酸分子は、配列番号:1または配列番号:2、またはそれに対する相補鎖の少なくとも10、好ましくは、少なくとも15、20、30、50、75、100個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドである。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0053】

核酸分子は、配列番号:1または配列番号:3と、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸の全部または一部に対するアンチセンス、または配列番号:1または配列番号:3(テネイシンWをコード化する)と低ストリンジエントな条件下でハイブリダイズできる、配列番号:1または配列番号:3と少なくとも70%の同一性を有する配列に対するアンチセンスであってもよい。低ストリンジエントな条件は、約10倍の高濃度を利用する高ストリンジエントと比較して、約0.01×SSCバッファーを利用する。または、アンチセンスRNAは、テネイシンW遺伝子の制御配列、特に、該遺伝子の5'上流配列(プロモーター領域)に対するアンチセンスであってもよい。同様に、低分子RNAiオリゴヌクレオチドが、特定の方法で、テネイシンWの発現を阻害するように設計され得る。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0068】

本発明の腫瘍または腫瘍細胞は、好ましくは、間質でテネイシンWを発現するものである。特に好ましい実施態様において、腫瘍は、固形腫瘍、例えば、骨肉腫、膠芽細胞腫の様な間葉系腫瘍、または乳癌腫、前立腺癌腫、肺癌腫、および結腸直腸癌腫の様な上皮癌である。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0072】

有効用量の決定は、当該技術分野の技術者の能力の十分範囲内である。任意の化合物について、治療上有効な用量は、まず、細胞培養アッセイ、または適当な動物モデルで評価され得る。動物モデルを用いて、好ましい濃度範囲および投与経路ももたらされる。次に、該情報を用いて、ヒトでの投与のための有効用量および経路が決定され得る。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0073】

治療上有効な用量とは、症状または状態を改善する活性薬物の量を意味する。該化合物の治療上の効果および毒性は、細胞培養または実験動物での標準的医薬的手順により決定され得る（例えば、ED₅₀、集団の50%で治療上有効な用量；およびLD₅₀、集団の50%で致死用量）。治療と毒性作用との用量比は治療指数であり、それは、LD₅₀ / ED₅₀ 比としても表され得る。高い治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒト使用のための投与量の範囲を明確にするのに用いられる。該化合物の投与量は、好ましくは、ほとんどまたは全く毒性のないED₅₀を含む循環濃度範囲にある。投与量は、利用される投与形態、患者の感受性、および投与経路に依存して、該範囲内で変化する。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

正確な投与量は、処置されるべき患者を考慮して、個々の医師により選択される。投与量および投与は、十分なレベルの活性部分を提供するために、または所望の効果を維持するために、調整され得る。考慮される、さらなる因子は、疾病状態の重症度（例えば、腫瘍の大きさ、および位置）；患者の年齢、体重、および性別；食事：投与時間および頻度；薬物の組合せ；反応感受性；および治療に対する耐容性／応答性を含む。長期間作用する医薬組成物は、特定の製剤の半減期およびクリアランス速度に依存して、毎日、3から4日毎、週毎、または2週間に1回投与される。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

好ましい態様において、細胞を試験化合物と接触させた後に生じる次の状態：

(a) 細胞増殖の減少；または細胞周期のS期に入る細胞の割合の減少；

(b) DNA合成の減少；

(c) 細胞接着の増加；

(d) 細胞伝播の増加；

(e) フィブロネクチンでの病巣接着およびアクチンストレスファイバー形成の増加；お

よび

(f) 細胞の ECM、好ましくは、フィプロネクチンとの結合の増加、の 1 つ以上が、抗増殖性または抗腫瘍性薬物、または骨芽細胞形成のインヒビターの指標である。

【手続補正 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0087】

または、テネイシン W の機能のモジュレーターを同定する方法も提供され、これは、(a) 試験化合物をテネイシン W および / または 8 1 インテグリンと接触させること、および (b) 該試験化合物のテネイシン W および / または 8 1 インテグリンとの結合を測定すること、または (c) 該試験化合物が非存在である場合と比較して、テネイシン W の 8 1 インテグリンとの結合の開裂を測定すること、を含む。テネイシン W の 8 1 インテグリンとの結合の減少は、該相互作用のインヒビターの指標であり、そして結合の増加は、該試験化合物が 8 1 インテグリンを活性化し、これにより、テネイシン W と 8 1 インテグリン間の相互作用を増加させることを示し得る。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0089】

本発明のアッセイ (スクリーニング) システムの 1 つの成分が、固体粒子または基質と結合される場合、次に、結合されない他の成分の 1 つ以上が、標識される。標識の例は、例えば、¹ ⁴ C または ³ H、ダイ、金属ゾル、酵素、またはビオチン / アビジンを含む。該システムでの該標識の「遊離」成分との接着により、任意の結合アッセイが、当該技術分野でよく知られた方法に従い、溶液中で行われる。成分が反応できた後、固相粒子が、溶液から、例えば、濾過または沈降 (遠心分離を含む) により、分離され得る。ある実施態様において、免疫沈降を用いて、結合と遊離の標識成分とが分離される。普通、抗体を利用して、溶液外に非標識成分 (該成分が、別の標識成分と結合しているかまたはしていないかにかかわらず) を排除する。分離後、溶液中に存在する標識 (遊離)、および固相中または固相上に存在する標識 (結合) が測定される。該結合および遊離データの標準的分析、例えば、スキヤツチャード・プロット、および結合の親和性および阻害定数の決定は、当該技術分野の通常の技術者によく知られている。

【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0105

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0105】

特定の場合に従い、必要とされる、組成物の「治療上有効な用量」が、処置が必要な患者を治療するために、または少なくとも部分的に、疾病およびその合併症を抑制するために十分な用量で投与されるべきである。該使用のための有効量は、疾病的重症度、および患者の一般的な健康状態に依存するだろう。1 回または多数回投与は、患者により必要とされ、かつ耐容される投与量および頻度に依存して、要求される。

【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0112

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0112】

試料の濃縮およびタンパク質の精製方法は、文献 (Scopes, 1987を参照) に記載されている。例えば、必要に応じて、細胞抽出物に存在するテネイシンWが、硫酸アンモニウムでの沈殿により、または市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMilliporeの限外濾過ユニットに抽出物を通すことにより、濃縮され得る。抽出物は、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂の様な適当な濾過マトリックス、またはゲル濾過マトリックスに適用され得るか、または分取ゲル電気泳動法の対象とされ得る。かかる場合、それぞれの精製段階後に生じたテネイシンWおよびタンパク質は、試料中のテネイシンWの量を決定する際に考慮される必要がある。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0120】

全長テネイシンWを、マウステネイシンWに特異的な、上記のマウステネイシンW cDNA由来のプライマー、および上で用いられた同一の胚発生期19日全マウス胚cDNAライブラリーのベクターと一致するプライマーの使用により、クローニングした。完全5'配列を得るために、上記のcDNAを鑄型として用いた次のPCR反応を行った：第1のPCR反応を、プライマーペア5' - A G G A G A T G G T G G C T G T A T T T C G G - 3' (配列番号：9) / 5' - A G C C T C T T G C T G A G T G G A G A T G C C - 3' (配列番号：10) を用いて行い、続いて第2のPCR反応を、プライマーセット5' - T A G A A T T C G G T C A C C T G A T T G G T C A C T A G G - 3' (配列番号：11) / 5' - T T A T G A T G T G C C A G A T T A T G C C - 3' (配列番号：12) により行った。テネイシンW cDNAの3'部分を完成させるため、次のPCR反応を行った：第1の反応では、プライマーペア5' - C T C A A A T T G A T G G C T A C A T T T G A C C - 3' (配列番号：13) / 5' - A A G C C G A C A A C C T T G A T T G G A G A C - 3' (配列番号：14) を用い、続いてプライマーペア5' - T A C C A G T T C C C A A A T G G C A C C G - 3' (配列番号：15) / 5' - A A A C C T C T G G C G A A G A A G T C C - 3' (配列番号：16) を用いた。それぞれの場合で、最長産物をクローニングした。該オーバーラップテネイシンW cDNAクローニングを、1つの全長マウステネイシンW cDNAに集め、発現ベクターpCEP/Pu (Kohfeldt et al. (1997). FEBS Lett. 414:557-61を参照) にクローニングした。テネイシンW cDNAの3'末端において、哺乳類細胞培養で発現した全長マウステネイシンWタンパク質の精製を可能とするために、6×Hisタグを停止コドンの前に挿入した。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0129

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0129】

実施例4：抗体産生、免疫組織化学、および免疫プロット：発生中のテネイシンWの発現
上の実施例1に記載のマウステネイシンWの細菌で発現した組換えフラグメントを、標準的免疫方法を用いて、ウサギでポリクローナル抗血清を生じさせるために用いた。該抗血清を用いて、テネイシンYについて記載 (Hagios, C. et al. (1996) J. Cell Biol. 134, 1499-1512) された方法を用いて、組織抽出物および発生中のマウス胚の凍結切片においてテネイシンWを検出した。抗血清は、ウエスタンプロットにより示される様に、精製全長組換えテネイシンW、ならびにマウス器官の組織抽出物の内在性テネイシンWと特

異的に反応した。両方の場合で、テネイシンWを170kDa分子量種として同定した。

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0137

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0137】

実施例7：接着アッセイ

精製テネイシンWを、MDA-MB435乳癌腫細胞株(ATTCC; HTB-129)、C2C12マウス骨格筋芽細胞(ATTCC; CRL-1772)、T98G膠芽細胞腫細胞(ATTCC; CRL-1690)、およびNIH-3T3線維芽細胞(ATTCC; CRL-1658)の細胞接着研究に用いた。概略、60ウェルマイクロタイタープレート(Nunc)を、2~100μg/mlテネイシンWで37、1時間、コートした。非コートのプラスチック表面を、PBS中の1%加熱不活性化BSAでブロックした。細胞をトリプシン処理し、トリプシンをPBS中の100μg/ml大豆トリプシン阻害剤で壊し、細胞を無血清培地に再懸濁し、カウントした。1ウェル当たり200~500個の細胞を指示した時間点でまき、グルタールアルデヒド(最終濃度2%)の添加により15分間固定し、20%メタノール中の0.1%クリスタルバイオレットで30分間染色した。細胞を顕微鏡(Nikon diaphot)下で観察した。

ほとんどの細胞が、2~100μgでコートされたテネイシンWと接着するが、テネイシンCとの細胞接着は最小であった。

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0140

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0140】

IDGトリペプチドモティーフは、9インテグリンの認識配列であると報告された(Yokosaki et al., 1998)。マウステネイシンWは、3つのIDGモティーフを含有的で、我々は、9インテグリンが、テネイシンWの受容体であり得るか否かを調べた。我々は、空ベクター、または9インテグリンのcDNA(Yokosaki et al. J Biol Chem. 1996 Sep 27; 271(39):24144-50)含有ベクターでトランスフェクションしたSW480大腸癌腫細胞を、テネイシンWでコートしたウェルにまいた。しかしながら、9およびニセのトランスフェクションSW480細胞は、テネイシンWと接着できなかったが、それらは、フィブロネクチンおよびコラーゲンと十分に接着した。

【手続補正24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0144

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0144】

実施例11：免疫蛍光顕微鏡観察

10^4 細胞を、本質的に上記の様に、ECMタンパク質でコートした4ウェルCellstarプラスチックプレート(Greiner)に移す。細胞を、PBS中の4%パラホルムアルデヒド、50mMリン酸バッファー、5mM EDTAで、15分間固定し、PBS中の3%BSA、0.5%Tween-20でブロックし、ブロッキング溶液中の1次抗体および2次抗体と共にインキュベートする。退色防止剤(antifade agent)として2.5%DABC0を含有した10.5%Mowiolに、スライドを埋め込む。細胞を顕微鏡で分析する。該方法は、テネイシンWまたは抗体が入手可能な培地中の細胞によって生産される任意の他のタンパク質の検出に特に有用であり、それぞれの抗原の合成また

は蓄積に影響する物質を分析するために用い得る。