

【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27年11月19日(2015.11.19)

【公表番号】特表2013-523164(P2013-523164A)

【公表日】平成25年6月17日(2013.6.17)

【年通号数】公開・登録公報2013-031

【出願番号】特願2013-503974(P2013-503974)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/113	(2010.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/712	(2006.01)
A 6 1 K	31/7125	(2006.01)
A 6 1 K	31/713	(2006.01)
A 6 1 P	3/10	(2006.01)
A 6 1 P	3/04	(2006.01)
A 6 1 P	3/06	(2006.01)
A 6 1 P	9/12	(2006.01)
A 6 1 P	1/16	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/12	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	7/02	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A G
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/712	
A 6 1 K	31/7125	
A 6 1 K	31/713	
A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/10	1 0 3

【誤訳訂正書】

【提出日】平成27年9月28日(2015.9.28)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 9

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 9】

[配列表の説明]

配列番号1：ホモサピエンス線維芽細胞増殖因子(FGF21)、転写変異体1、mRNA(NCBI登録番号:NM_019113)；配列番号2：天然FGF21アンチセンス配列(Hs.69747)；配列番号3乃至9：アンチセンスオリゴヌクレオチド。
*はホスホロチオエート結合を示す。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0230

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0230】

[結果]：

リアルタイムPCRの結果によれば、MCF-7細胞におけるFGF21のmRNAレベルは、FGF21アンチセンスHs.69747に対して設計されたオリゴで処置して48時間後に有意に増加している(図1)。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0232

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0232】

実施例3で設計された実験を実行するために、ATCC(cat HB 8065)由来のHepG2細胞を、増殖培地(MEM/EBSS(Hyclone cat #SH30024、または、Mediatech cat # MT-10-010-CV)+10%FBS(Mediatech cat# MT35-011-CV)+ペニシリン/ストレプトマイシン(Mediatech cat# MT30-002-CI))で、37、5%CO₂にて増殖した。実験の前日に、細胞を0.5×10⁴/mlの密度で6ウエルプレートに再播種し、37、5%CO₂で一晩インキュベートした。実験の当日に、6ウエルプレート内の培地を新鮮な増殖培地に交換した。凍結乾燥された形態で製造業者から送られて来たオリゴヌクレオチドを、RNase/DNAse-free脱イオン水中、濃度20μMに希釈した。この溶液2μlをOptiMEM培地(Gibco cat#31985-070)400μlおよびLipofectamine 2000(Invitrogen cat#11668019)4μlと室温で20分間インキュベートし、次いでHepG2細胞を含む6穴プレートの1ウエルに液滴で添加した。該オリゴヌクレオチド溶液の代わりに水2μlを含む同様の混合物を偽トランスクレオチド对照に使用した。37、5%CO₂での3~18時間のインキュベーション後、培地を新鮮増殖培地に交換した。アンチセンスオリゴヌクレオチドの添加の48時間後、培地を除去し、Promega製のSV Total RNA Isolation System(cat#Z3105)またはQiagen製のRNeasy Total RNA Isolation kit(cat#74181)を製造者の説明書に従って使用して、RNAを細胞から抽出した。抽出した600ngのRNAを、Thermo Scientific製のVerso cDNAキット(cat#AB1453B)またはHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(cat#4368813)を製造者の説明書に記載のとおり使用して得た逆転写反応物に加えた。この逆転写反応からのcDNAを使用して、ABI Taqman gene Expression Mix(cat#4369510)およびABI(Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assay:Hs01048016_m1:Applied Biosystems Inc., Foster City CA)によって設計されたプライマー/プローブを使用するリアルタイムPCRによって遺伝子発現をモニタリングした。使用したPCR

サイクルは次の通り：50で2分間、95で10分間、（95で15秒間、60で1分間）を40サイクル、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems）を使用。アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した後の遺伝子発現の変化率を、処置サンプルと偽トランスクレクトサンプルの間の18S標準化dCt値の差に基づいて計算した。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0233

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0233】

【結果】：

リアルタイムPCR結果によれば、FGF21アンチセンスHs.69747に対して設計されたオリゴの1つで処置して48時間後に、HepG2細胞中のFGF21のmRNAレベルは有意に上昇している（図2）。