

【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28年3月24日(2016.3.24)

【公表番号】特表2014-502147(P2014-502147A)

【公表日】平成26年1月30日(2014.1.30)

【年通号数】公開・登録公報2014-005

【出願番号】特願2013-535088(P2013-535088)

【国際特許分類】

C 12 N	15/113	(2010.01)
A 61 K	48/00	(2006.01)
A 61 K	31/7088	(2006.01)
A 61 P	43/00	(2006.01)
A 61 P	25/00	(2006.01)
A 61 P	25/28	(2006.01)

【F I】

C 12 N	15/00	Z N A G
A 61 K	48/00	
A 61 K	31/7088	
A 61 P	43/00	1 1 1
A 61 P	25/00	
A 61 P	25/28	

【誤訳訂正書】

【提出日】平成28年1月28日(2016.1.28)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0023

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0023】

【図1】図1は、対照と比較した、Lipofectamine 2000を使用して導入されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドにてHepG2細胞を処置した後の、IDUAのmRNAの倍率変化+標準偏差を示すリアルタイムPCRの結果のグラフである。CUR-1820～CUR-1823と表示されたバーは、それぞれ配列番号10～配列番号13で処置されたサンプルに対応する。

【図2】図2は、対照と比較した、Lipofectamine TM 2000を使用して導入されたホスホロチエートオリゴヌクレオチドにてHepG2細胞を処置した後の、IDUAのmRNAの倍率変化+標準偏差を示すリアルタイムPCRの結果のグラフである。CUR-1973、CUR-1975、CUR-1976、CUR-1978、CUR-1981、CUR-1984、CUR-1985、CUR-1987、CUR-1988と表示されたバーは、それぞれ配列番号14～配列番号22で処置されたサンプルに対応する。

【図3】図3は、対照と比較した、Lipofectamine TM 2000を使用して導入されたホスホロチエートオリゴヌクレオチドにてHepG2細胞を処置した後の、IDUAのmRNAの倍率変化+標準偏差を示すリアルタイムPCRの結果のグラフである。CUR-1974、CUR-1977、CUR-1986、CUR-1983、CUR-1979およびCUR-1982と表示されたバーは、それぞれ配列番号23～配列番号28で処置されたサンプルに対応する。

【図4】図4は、対照と比較した、Lipofectamine TM 2000を使用

して導入されたホスホロチエートオリゴヌクレオチドにてSK-N-AS細胞を処置した後の、ヒトIDUAのmRNAの倍率変化+標準偏差を示すリアルタイムPCRの結果のグラフである。CUR-1973、CUR-1975、CUR-1976、CUR-1978、CUR-1981、CUR-1984、CUR-1985、CUR-1987、CUR-1988と表示されたバーは、それぞれ配列番号14～配列番号22で処置されたサンプルに対応する。

【図5】図5（配列番号8）は、クローンオープンバイオシステムの（Clone open biosystems）のNAE04B03を使用した、元のイヌの配列DN876121配列（配列番号5）（鮮明な部分）における578ヌクレオチド（灰色）の伸長を示している。

【誤訛訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0024

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0024】

[配列表の説明]

配列番号1：ヒト L イズロニダーゼ（IDUA）、mRNA（NCBI登録番号NM_000203）；配列番号2：天然のIDUAアンチセンス配列（HS.656285）；配列番号3：天然のIDUAアンチセンス配列（CR626108）；配列番号4：天然のIDUAアンチセンス配列（DN334757）；配列番号5：天然のIDUAアンチセンス配列：（DN876121）；配列番号6：天然のIDUAアンチセンス配列（DN744190）；配列番号7：天然のIDUAアンチセンス配列（DN330918）；配列番号8：天然のIDUAアンチセンス配列（DN876121-伸長）；配列番号9：伸長されたヒトの天然のIDUAアンチセンス配列；配列番号10～配列番号28：アンチセンスオリゴヌクレオチド。*はホスホチオアート結合を示す；配列番号29～配列番号45：UniGeneクラスターHS656285。

【誤訛訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0236

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0236】

[結果]：リアルタイムPCRの結果は、HepG2細胞でのIDUAのmRNAレベルが、オリゴ類CUR-1820およびCUR-1821（図1）、オリゴ類CUR-1978、CUR-1984、CUR-1985、CUR-1987およびCUR-1988（図2）並びにオリゴ類CUR-1974およびCUR-1986（図3）を備えたヒトの天然のIDUAアンチセンスHS.656285に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドでの処置から48時間後に顕著に増殖することを示している。

【誤訛訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0238

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0238】

[結果]：

物質および方法

ATCC（cat# CRL-2137）からの、SK-N-AS細胞培養株、SK-N-AS神経芽細胞腫は、37 および5%のCO₂の増殖培地（DMEM（Mediatech cat# 10-013-CV）+10% FBS（Mediate

ch cat# MT35-011-CV) + ペニシリン/ストレプトマイシン (Mediatech cat# MT30-002-CI) + 非必須アミノ酸類 (NEAA) (Hyclone SH30238.01)) にて増殖した。この細胞は、以下の方法の内の1つを使用してアンチセンスオリゴヌクレオチド類を処置した。次の日の方法のため、この実験の前日に、細胞は、約 3×10^5 ウェルの密度にて増殖培地中の6ウェルプレートへ再播種され、一晩 37 °C、CO₂ 5%にてインキュベートされた。次の日、6ウェルプレートの培地は、新鮮な増殖培地 (1.5 ml / ウェル) に変えられ、この細胞は、アンチセンスオリゴヌクレオチド類を投与される。すべてのアンチセンスオリゴヌクレオチド類は、IDT Inc. (Coralville, IA) もしくは Exiqon (Vedbæk, デンマーク) により製造された。すべてのオリゴヌクレオチド類の配列は、表1に示されている。オリゴヌクレオチド類の原液は、DNase / RNase-free sterile waterにて 20 μM の濃度に希釀された。1つのウェルに投与するために、この溶液 1 μl を、室温にて 20 分間、200 μl Opti-MEM 培地 (Gibco cat# 31985-070) および 2 μl の Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat# 11668019) とインキュベートし、細胞と共に、24ウェルプレートの1つのウェルに液滴適用した。オリゴヌクレオチド溶液の変わりに 1 μl の水を含む類似の混合物が、モックトランスクレオチドの对照として使用された。37 °C および 5% の CO₂ で 18 時間インキュベートした後、この培地は、新鮮な培地へと変えられた。アンチセンスオリゴヌクレオチド類の添加から 48 時間後、製造者の指示に従って、Promega (cat # Z3105) から SV Total RNA Isolation System を使用して細胞から、RNA が抽出された。600 ナノグラムの精製された総 RNA は、製造者の手順に記載されている Invitrogen (cat# 11754-250) からの SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit を使用して行われる逆転写反応に加えられた。この逆転写反応からの cDNA は、ABI Taqman Gene Expression Mix (cat# 4369510) および ABI (assays Hs00164940_m1) により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 による遺伝子発現を管理した。3つすべてのアッセイを使用して得られた結果は非常に類似していた。以下の、(Biosystems を適用した) ステップワープラスリアルタイム PCR システム (StepOne Plus Real Time PCR system) を使用して、50 °C を 2 分、95 °C を 10 分、(95 °C を 15 秒、60 °C を 1 分) を 40 回といった PCR の周期が使用された。18 S のアッセイは、ABI (cat# 4319413E) により製造された。アンチセンスオリゴヌクレオチド類との処置後の遺伝子発現の倍率変化は、処置されたサンプルおよびモックトランスクレオチドサンプルの間の $\Delta\Delta C_t$ 値の差異に基づき計算された。

結果

リアルタイム PCR の結果は、SK-N-AS 細胞の IDUA の mRNA レベルが、ヒト IDUA の天然のアンチセンス Hs.656285 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド類 CUR-1976、CUR1978 および CUR-1987 での処置から 48 時間に増加傾向を示すということを示す (図 4)。