

【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 1 2 N 15/113 (2010.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A G

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 25/00

A 6 1 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】0 0 2 3

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 2 3】

【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 Hep G 2 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オエートオリゴヌクレオチドにて Hep G 2 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オエートオリゴヌクレオチドにて Hep G 2 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。

【誤訳訂正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。

【誤訳訂正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CUR1988(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。

【誤訳訂正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 °Cおよび5%のCO₂の増殖培地(DMEM (Mediatech cat# 10-013-CV) + 10% FBS (Mediatech cat# 10-013-CV))で培養される。

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、一晚37℃、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) に換えられ、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 (Vedbaek, 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の濃度に希釈された。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、モックトランスフェクトの対照として使用された。37℃ 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、新鮮な培地へと換えられた。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 VIL0 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) ステップワン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℃を2分、95℃を10分、(95℃を15秒、60℃を1分) を40回といったPCRの周期が使用された。18S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フェクトサンプルの間の18-S標準化dCt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時間後に増加傾向を示すということを示す (図4)。