

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02012/070621**

発行日 平成26年5月19日 (2014.5.19)

(43) 国際公開日 **平成24年5月31日 (2012.5.31)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/711 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/711 Z N A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 13/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 13/12	4 C O 8 6
<b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/10	
<b>A 6 1 P 3/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2012-545791 (P2012-545791)	(71) 出願人	599045903 学校法人 久留米大学
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/077062		福岡県久留米市旭町 6 7 番地
(22) 国際出願日	平成23年11月24日 (2011.11.24)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稔
(31) 優先権主張番号	特願2010-262341 (P2010-262341)	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成22年11月25日 (2010.11.25)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100138911 弁理士 櫻井 陽子
		(72) 発明者	深水 圭 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 AGE特異的アプタマーの腎疾患治療用途

## (57) 【要約】

本発明は、A G E 結合アプタマーを有効成分として含む、糖尿病性腎症の治療または予防用組成物を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

A G E 結合アプタマーを含む、糖尿病性腎症の治療用または予防用組成物。

## 【請求項 2】

糖尿病性腎症の進展抑制用組成物である、請求項 1 記載の組成物。

## 【請求項 3】

腎機能悪化抑制用組成物である、請求項 1 記載の組成物

## 【請求項 4】

脂質異常症の治療用または予防用組成物である、請求項 1 記載の組成物。

## 【請求項 5】

血圧低下用組成物である、請求項 1 記載の組成物。

## 【請求項 6】

A G E 結合アプタマーが、A G E - 2 に結合するアプタマーである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 7】

A G E 結合アプタマーが、配列番号 1 ~ 4 1 のいずれかの塩基配列からなる、請求項 6 記載の組成物。

## 【請求項 8】

A G E 結合アプタマーが、配列番号 1 ~ 4 1 のいずれかの塩基配列と 9 0 % 以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、A G E - 2 に結合する一本鎖 D N A である、請求項 6 記載の組成物。

## 【請求項 9】

A G E 結合アプタマーが、配列番号 1 ~ 4 1 のいずれかの塩基配列において 1、2、または 3 個の塩基が欠失、置換、または付加された塩基配列からなり、A G E - 2 に結合する一本鎖 D N A である、請求項 6 記載の組成物。

## 【請求項 10】

A G E 結合アプタマーを含む、糖尿病患者における脂質異常症の治療用または予防用組成物。

## 【請求項 11】

A G E 結合アプタマーを含む、糖尿病患者における血圧低下用組成物。

## 【請求項 12】

A G E 結合アプタマーが以下からなる群から選択される、請求項 10 または 11 記載の組成物。

( a ) 配列番号 1 ~ 4 1 のいずれかの塩基配列からなる一本鎖 D N A ;

( b ) 配列番号 1 ~ 4 1 のいずれかの塩基配列と 9 0 % 以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、A G E - 2 に結合する一本鎖 D N A ; および

( c ) 配列番号 1 ~ 4 1 のいずれかの塩基配列において 1、2、または 3 個の塩基が欠失、置換、または付加された塩基配列からなり、A G E - 2 に結合する一本鎖 D N A 。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、終末糖化産物 ( A G E ) 結合アプタマーを含む糖尿病性腎症の治療用または予防用組成物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

終末糖化産物 ( Advanced Glycation End-products ; A G E ) は、グルコースなどの還元糖のカルボニル基と、タンパク質のアミノ基との非酵素的な反応 ( メイラード反応 ) により生じる高分子物質である。糖尿病などで慢性的に高血糖が続くと、循環血液中や組織で A G E の生成が促進される。糖尿病の合併症の発症および進展に、A G E の関与が示唆されている ( 非特許文献 1 および非特許文献 2 ) 。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 3 】

一方、近年、一本鎖DNAや一本鎖RNAが種々の立体構造をとり、低分子からタンパク質までの種々の化合物を認識して結合して、抗体のような機能を有し得ることが明らかになっている（非特許文献3および非特許文献4）。このような分子をアプタマーと称する。アプタマーは、ランダム配列の中からSELEXという選別方法によって調製することができる（非特許文献4）。

## 【 0 0 0 4 】

アプタマーは、試験管内で大量に合成できること、抗体よりも結合力が強いものが得られる可能性があること、安定化できることなどの利点を有する。そのため、抗体と同様に、研究、検出、医療などに応用され得る。医療などへの応用が検討されている例としては、HIV-1逆転写酵素に対するRNAアプタマー（非特許文献5）等が報告されている。

10

## 【 先行技術文献 】

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 5 】

【非特許文献1】Yamagishi S.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002年, 290巻, 973-978頁

【非特許文献2】Okamoto T.ら, FASEB J., 2002年, 16巻, 1928-1930頁

【非特許文献3】Ellington A.D.およびSzostak J.W., Nature, 1990年, 346巻, 818-822頁

20

【非特許文献4】Tuerk C.およびGold L., Science, 1990年, 249巻, 505-510頁

【非特許文献5】Kensch O.ら, J. Biol. Chem., 2000年, 275巻, 18271-18278頁

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 6 】

本発明は、糖尿病性腎症の治療または予防に有用な医薬組成物を提供することを目的とする。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 7 】

本発明者らは、これまでに、AGEに結合するアプタマーを作成し、これらが網膜周皮細胞のアポトーシスを抑制することを報告している（国際公開2006/080262号公報；Microvascular Research 74 (2007) 65-69）。この度、本発明者らは、AGE結合アプタマーが2型糖尿病モデル動物において腎保護効果を発揮すること等を見出し、本発明を完成させた。

30

## 【 0 0 0 8 】

即ち、本発明は、AGE結合アプタマーを含む、糖尿病性腎症の治療用または予防用組成物を提供する。

## 【 0 0 0 9 】

また、本発明は、AGE結合アプタマーを含む、糖尿病患者における脂質異常症の治療用または予防用組成物を提供する。

40

## 【 0 0 1 0 】

また、本発明は、AGE結合アプタマーを含む、糖尿病患者における血圧低下用組成物を提供する。

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 1 1 】

本発明のAGE結合アプタマーを含む組成物は、糖尿病または糖尿病性腎症に対する医薬として有用である。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 1 2 】

【図1】グリセルアルデヒド由来のAGEであるAGE-2の生成経路を示す図である。

50

【図2】SELEX法の概要を示す工程図である。

【図3】種々の濃度のAGE-2(A)、ならびに100 $\mu$ g/mLのAGE-2に種々の濃度のAGE-2アプタマーを添加した場合(BおよびC)の蛍光スペクトル図である。消光波長を470nmで固定し、励起波長を300~450nmまでスキャンした。いずれも1mL中の質量またはモル数を示す。

【図4】アポトーシス阻害率の算出方法を説明する図である。

【図5】AGE-2アプタマーの糖尿病モデルマウスへの投与方法を説明する図である。

【図6】PCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。図中、各レーンの表示は以下のとおりである。M: マーカー; I: 無投与C57BL/6jマウス血液由来のPCR産物; II: 0.03 $\mu$ M\* AGE-2アプタマー投与3週間後のマウスの血液由来のPCR産物; III: 0.3 $\mu$ M\* AGE-2アプタマー投与3週間後のマウスの血液由来のPCR産物; 3 $\mu$ M\* AGE-2アプタマー投与2週間後のマウスの血液由来のPCR産物(\* AGE-2アプタマーの濃度はアプタマーが血中に順調に移行した場合の予想濃度である)。

10

【図7】尿中のアルブミン排泄量の経時変化を示す図(A)および尿中アルブミン/クレアチニン比率の経時変化を示す図(B)である。

【図8】PAS染色した糸球体の顕微鏡写真を示す。C+BL6jは、コントロールアプタマーを投与したC57BL/6jマウスの糸球体の写真を、A+BL6jは、AGE-2アプタマーを投与したC57BL/6jマウスの糸球体の写真を、C+KK/Ayは、コントロールアプタマーを投与したKK-Ay/Taマウスの糸球体の写真を、A+KK/Ayは、AGE-2アプタマーを投与したKK-Ay/Taマウスの糸球体の写真を示す。コントロールアプタマーを投与したKK-Ay/Taマウスでは糸球体基底膜の肥厚(硬化)が認められる(図中矢印)。

20

【図9】Masson-Trichrome染色した糸球体の顕微鏡写真を示す。C+BL6jは、コントロールアプタマーを投与したC57BL/6jマウスの糸球体の写真を、A+BL6jは、AGE-2アプタマーを投与したC57BL/6jマウスの糸球体の写真を、C+KK/Ayは、コントロールアプタマーを投与したKK-Ay/Taマウスの糸球体の写真を、A+KK/Ayは、AGE-2アプタマーを投与したKK-Ay/Taマウスの糸球体の写真を示す。コントロールアプタマーを投与したKK-Ay/Taマウスでは糸球体の線維化が認められる(図中矢印)。

【図10】糸球体の線維化の程度を示す図である。Masson-Trichrome染色した糸球体の顕微鏡写真を画像解析することにより、線維化の程度を定量した。

30

【図11】糸球体におけるAGE-2沈着を示す図である。Ctrl-aptamer+KK/Ay (diabetes)は、コントロールアプタマーを投与したKK-Ay/Taマウスの糸球体の写真を、AGEs-aptamer+KK/Ay (diabetes)は、AGE-2アプタマーを投与したKK-Ay/Taマウスの糸球体の写真を示す。AGE-2アプタマーの投与により糸球体におけるAGE-2沈着が完全に抑制された。

【図12】尿中の8OHdGの量を示す図である。AGE-2アプタマーの投与により糖尿病モデルマウスにおける8OHdG産生が抑制された。

【図13】配列番号9で表される塩基配列からなる一本鎖DNAの推定される2次構造を示す図である。\*は、ACC(C)または(C)CCAモチーフの存在を示す。

【発明を実施するための形態】

40

【0013】

本発明は、AGE結合アプタマーを含む糖尿病性腎症の治療用または予防用組成物を提供する。

【0014】

終末糖化産物(AGE)とは、グルコースなどの還元糖のカルボニル基と、タンパク質のアミノ基との非酵素的な反応(メイラード反応)により生じる高分子物質の総称である。本発明における「AGE結合アプタマー」は、AGEに結合するアプタマーを意味し、如何なるAGEに結合するアプタマーも包含する。本発明における好ましいAGEは、グリセルアルデヒドに由来する終末糖化産物であるAGE-2である。すなわち、本発明において、AGE結合アプタマーは、AGE-2に結合するアプタマー(以下、AGE-2

50

アプタマーとも称す)であることが好ましい。

【0015】

本発明のアプタマーは、一本鎖DNAまたは一本鎖RNAのいずれであってもよいが、好ましくは一本鎖DNAである。本発明のAGE結合アプタマーは、少なくとも35塩基からなり、好ましくは35塩基～120塩基、より好ましくは50塩基～70塩基である。AGE-2アプタマーは、当該アプタマーを構成する塩基中に、シトシンまたはグアニンのいずれか一方を多く含むことが好ましい。シトシンを多く含む場合、シトシン含有率は、35%～60%、40%～60%、または50%～60%であってよい。グアニンを多く含む場合、グアニン含有率は、32%～50%、35%～50%、または40%～50%であってよい。

10

【0016】

本発明における好ましいAGE結合アプタマーは、配列番号1～41のいずれかの塩基配列を含む一本鎖DNAである。より好ましくは、AGE結合アプタマーは、配列番号1～41のいずれかの塩基配列からなる一本鎖DNAである。配列番号1～24のいずれかの塩基配列からなる一本鎖DNAは、54～58塩基からなり、塩基中のシトシン含有率は35%～60%である。配列番号25～41のいずれかの塩基配列からなる一本鎖DNAは、61～66塩基からなり、塩基中のグアニン含有率は32%～50%である。

【0017】

本発明のAGE結合アプタマーは、アプタマーを得るための一般的な方法であるSELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 法によって調製することができる。一本鎖DNAをライブラリー源とするSELEX法の概要を以下に説明する。まず、任意の2つのプライマー配列で挟まれた適当な長さのランダム配列を含むテンプレートDNAを合成する。本発明においては、ランダム配列の長さは、35塩基～120塩基が適切である。このテンプレートDNAをPCR (Polymerase Chain Reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) で増幅して、ランダムDNAアプタマープールを得る。次いで、このランダムDNAアプタマープールを標的物質と会合させ、結合しなかったDNAを除去し、そして結合したDNAアプタマーを抽出する。得られたDNAアプタマーを、上記プライマー配列を用いるPCRによって増幅する。このとき、5～8mMの $Mg^{2+}$ 存在下でPCRを行って、複製の正確性を低下させて変異を導入しやすくすることにより、標的物質との会合前のDNAアプタマープールに存在しない新たなDNAアプタマーを含むDNAアプタマープールが得られる。新たなDNAアプタマーは、結合力がより強い可能性があり、すなわち、DNAアプタマーが進化する可能性が生じる。この進化したDNAアプタマープールについて、上記の一連の操作を5～15ラウンド繰り返すことによって、標的物質に結合するDNAアプタマーが得られる。最終ラウンドの後、得られたDNAアプタマープールは、当業者が通常行う操作によってクローニングされ、次いで配列決定される。このSELEX法における、テンプレートDNAの合成、PCRなどの操作、ならびにクローニングおよび配列決定は、当業者が通常用いる方法によって行われる。本発明のAGE結合アプタマーは、このようにして決定された配列に基づいて、当業者が通常用いる方法によって化学合成することができる。

20

30

【0018】

本発明におけるAGE結合アプタマーは、AGE-2を標的物質として調製されたものであることが好ましい。例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)のアミノ基とグリセルアルデヒドのアルデヒド基が非酵素的に反応(メイラード反応)して生じた結合体(以下、AGE-2-HSAとも称す)を標的物質とすることができる。AGE-2-HSAは、例えば、培養法、化学合成法などの任意の方法によって調製することができる。培養法で調製する場合、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)を、D-グリセルアルデヒドと数日間インキュベートする。化学合成法によって調製する場合、例えば、Tessierらの方法(Tessier et al., Biochem. J., 2003, 369, 705-719)に従って、アセチル-リジンとグリセルアルデヒドとをリン酸緩衝液(pH 7.4)中で混合し、さらにジエチレントリアミンペンタ酢酸および25%(v/v)メタノールを加えて、37℃で数日間反応させ

40

50

ることによって調製することができる。得られた A G E - 2 は、S E L E X 法において用いる場合は、適切な固相（例えば、ビーズなど）に固定化されていることが好ましい。

【0019】

得られたアプタマーの A G E との結合親和性は、A G E が蛍光を発することを利用して、A G E にアプタマーを添加したときの A G E の蛍光強度の減弱によって測定できる。このようにして、S E L E X 法によって調製したアプタマーのうち、親和性の強いアプタマーを選択することができる。

【0020】

本発明における A G E 結合アプタマーは、その安定性を増加させるため、修飾ヌクレオチドにより構成されていてもよい。例えば、A G E 結合アプタマーは、ヌクレオチド間の結合部位にあるリン酸基の酸素原子が硫黄原子に置換されたホスホロチオエート（S 化）オリゴヌクレオチドであってよい。

【0021】

配列番号 1 ~ 15 で表される塩基配列からなる一本鎖 D N A は、全て、A C C ( C ) または ( C ) C C A なる配列モチーフ（ここで ( C ) は、C が存在しても存在しなくてもよいことを示す）を有する。また、配列番号 1 ~ 15 で表される塩基配列からなる一本鎖 D N A は、全て、その二次構造中に A C C ( C ) または ( C ) C C A なる配列モチーフが 1 または 2 個存在するループを有する。例えば、配列番号 9 で表される塩基配列からなる一本鎖 D N A は、図 13 のような二次構造を有する。よって、さらなる A G E 結合アプタマーの非限定的な例としては、( a ) 二次構造中に A C C ( C ) または ( C ) C C A なる配列モチーフが 1 または 2 個存在するループを有し；( b ) 54 ~ 58 塩基からなり；( c ) 塩基中のシトシン含有率が 35 % ~ 60 % であり；かつ ( d ) A G E - 2 に結合する、一本鎖 D N A、または、( a ' ) 塩基配列中に A C C ( C ) または ( C ) C C A なる配列モチーフが少なくとも 1 個存在し；( b ) 54 ~ 58 塩基からなり；( c ) 塩基中のシトシン含有率が 35 % ~ 60 % であり；かつ ( d ) A G E - 2 に結合する、一本鎖 D N A が挙げられる。なお、上記 ( a ) および ( a ' ) において、A C C ( C ) と ( C ) C C A のモチーフが重複する場合は、1 個と数える。例えば、A C C C A という配列は、A C C C と C C C A の 2 つのモチーフが連続することにより重複する配列であるが、この場合のモチーフの数は 1 個と数える。配列番号 1 ~ 15 で表される塩基配列からなる一本鎖 D N A は、上記 ( a )、( b )、( c )、および ( d ) を満たす例として挙げられる。

【0022】

また、本発明の A G E 結合アプタマーは、配列番号 1 ~ 41 のいずれかで表される塩基配列を改変して得られたものであってもよい。すなわち、A G E 結合アプタマーは、配列番号 1 ~ 41 のいずれかの塩基配列において、1、2、または 3 個の塩基が欠失、置換、または付加された塩基配列を含み、A G E に結合する一本鎖 D N A；配列番号 1 ~ 41 のいずれかの塩基配列において、1、2 または 3 個の塩基が欠失、置換、または付加された塩基配列からなり、A G E に結合する一本鎖 D N A；配列番号 1 ~ 41 のいずれかの塩基配列と 95、90、85、80、75 または 70 % の配列同一性を有する塩基配列を含み、A G E に結合する一本鎖 D N A；または配列番号 1 ~ 41 のいずれかの塩基配列と 95、90、85、80、75 または 70 % の配列同一性を有する塩基配列からなり、A G E に結合する一本鎖 D N A、であってよい。

【0023】

本発明において、塩基配列の「配列同一性」とは、2 つのオリゴヌクレオチド間の配列の類似の程度を意味し、比較対象の塩基配列の領域にわたって最適な状態（配列の一致が最大となる状態）にアラインメントされた 2 つの配列を比較することにより決定される。配列同一性の数値（%）は両方の配列に存在する同一の塩基を決定して、適合部位の数を決定し、次いでこの適合部位の数を比較対象の配列領域内の塩基の総数で割り、得られた数値に 100 をかけることにより算出される。最適なアラインメントおよび配列同一性を得るためのアルゴリズムとしては、当業者が通常利用可能な種々のアルゴリズム（例えば、B L A S T アルゴリズム、F A S T A アルゴリズムなど）が挙げられる。塩基配列の配

10

20

30

40

50

列同一性は、例えば B L A S T、F A S T A などの配列解析ソフトウェアを用いて決定される。

【0024】

アプタマーの A G E に対する結合性は、上記の説明にしたがい、または以下の実施例に記載の方法により、調べることができる。

【0025】

糖尿病性腎症は、糖尿病の合併症の1つであり、糖尿病によって腎臓の糸球体が細小血管障害のため硬化して数を減じていく病気である。本発明における糖尿病には、1型糖尿病、2型糖尿病、遺伝子の異常、肝臓や膵臓の病気、感染症、免疫の異常などの他の病気および薬剤が原因となって惹起される糖尿病、および妊娠糖尿病が含まれる。

10

【0026】

糖尿病性腎症に関する日本糖尿病学会・日本腎臓学会合同委員会の病期分類では、糖尿病性腎症の臨床経過は、1～5期（ステージ）に分類される（日腎会誌2002;44(1):i）（表1参照）。さらに、第3期は、GFR（糸球体濾過量）およびクレアチニン・クリアランスがほぼ正常である前期と、GFR（糸球体濾過量）およびクレアチニン・クリアランスの低下が認められる後期に分けられる。

【表1】

	第1期 (腎症前期)	第2期 (早期腎症)	第3期 (顕性腎症)	第4期 (腎不全期)
診断	糸球体濾過量(GFR)が増加する。	微量のアルブミンが尿に漏れだす。濾過過剰継続。	持続的蛋白尿が認められる。続発性ネフローゼ症候群を呈する。	GFRは低下し、血清クレアチニン値は増加する。
症状	症状なし。	第1期から5～15年で発症。自覚症状なし。	蛋白尿属性。低アルブミン血症による浮腫やうつ血性心不全を生じる。	浮腫、倦怠感、悪心、精神的不安定などの尿毒症症状を生じる。

➡ 第5期  
(透析療法期)へ

20

1型糖尿病における腎症は、微量アルブミン尿の出現により発症し、発症早期にGFRの顕著な増加、糸球体過剰濾過を呈する。そして、年間10～20%尿アルブミンが増加し、通常10～15年後に慢性腎症期（第3期に相当）に移行する。慢性腎症期以降（第3～5期に相当）では、GFR（糸球体濾過量）が低下し、半数以上の症例で10年以内に末期腎不全に至る。生活習慣の欧米化とともに増加しつつある2型糖尿病では、糖尿病発症時期が不明瞭であることや、1型糖尿病に比較して腎症発症前よりすでに高血圧症を合併していることが多い。腎症を発症すれば、その臨床経過は1型糖尿病による腎症に類似するものと考えられる。

30

【0027】

本発明において、疾患または症状の「治療」には、当該疾患または症状の病態の改善および寛解、並びに当該疾患または症状の進展の抑制が含まれる。また、疾患または症状の「予防」には、当該疾患または症状の発症の抑制および遅延が含まれる。

【0028】

本発明の糖尿病性腎症の治療用または予防用組成物は、投与により糖尿病性腎症の進展を抑制しうるものである。よって、本発明の組成物は、糖尿病性腎症の進展抑制用組成物でありうる。

40

【0029】

腎症の進展の抑制の非限定的な例としては、第1期から第2期、第3期（第3期前期または後期であり得る）、第4期、または第5期への進展の抑制、第2期から第3期（第3期前期または後期であり得る）、第4期、または第5期への進展の抑制が挙げられる。

【0030】

本発明の糖尿病性腎症の治療用または予防用組成物は、投与により患者の腎機能の悪化を抑制しうるものである。よって、本発明の組成物は、腎機能悪化抑制用組成物でありうる。

50

## 【0031】

腎機能の指標の非限定的な例としては、尿中アルブミン排出量、尿中アルブミン/クレアチニン比、血中のクレアチニン・クリアランス、血中尿素窒素量、血中クレアチニン量が挙げられる。本発明の腎機能悪化抑制用組成物は、上記糖尿病性腎症の進展に伴い悪化する指標のうち、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または5つ全ての指標の悪化を抑制しうる。これにより腎機能の保護効果が認められるので、本発明の組成物は、腎機能保護用組成物でもありうる。

## 【0032】

本発明の糖尿病性腎症の治療用または予防用組成物は、投与により患者の腎組織を保護しうるものである。よって、本発明の組成物は、腎組織保護用組成物でありうる。

10

## 【0033】

糖尿病性腎症の進展に伴い、メサンギウム基質の増加、糸球体基底膜の肥厚（硬化）、糸球体の線維化、および/または腎肥大（腎臓/体重比の増加）が認められる。本発明の腎組織保護用組成物は、上記のうち、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または4つ全てを抑制しうる。

## 【0034】

本発明の組成物は、糖尿病性腎症を発症しているヒトにも、発症していないヒトにも投与されうる。糖尿病性腎症を発症していないヒトの非限定的な例としては、糖尿病を発症していないものの発症する危険性が高いヒト、糖尿病を発症しているものの糖尿病性腎症を発症していないヒト、過去に糖尿病性腎症を発症したものの治癒または寛解し現在腎症の症状を呈しないヒトが挙げられる。糖尿病を発症していないものの発症する危険性が高いヒトの非限定的な例としては、メタボリックシンドロームを呈するヒトが挙げられる。糖尿病性腎症を発症しているヒトの非限定的な例には、糖尿病性腎症の第1期（腎症前期）、第2期（早期腎症）、第3期（顕性腎症）、または第4期（腎不全期）を呈するヒトが挙げられる。

20

## 【0035】

別の態様において、本発明は、AGE結合アプタマーを含む、糖尿病患者における脂質異常症の治療用または予防用組成物を提供する。AGE結合アプタマーおよび糖尿病については、上記と同様である。脂質異常症の症状としては、血中の総コレステロール量の増加、血中の中性脂肪量の増加および血中の遊離脂肪酸量の増加が挙げられる。脂質異常症の治療および予防には、糖尿病の進展に伴う血中の総コレステロール量、中性脂肪量および/または遊離脂肪酸量の増加の抑制が含まれる。

30

## 【0036】

本発明の脂質異常症の治療用または予防用組成物は、脂質異常症を呈する糖尿病患者にも、脂質異常症を呈さない糖尿病患者にも投与されうる。また、糖尿病患者には、糖尿病性腎症を発症している患者（すなわち、糖尿病性腎症の患者）も、発症していない患者も含まれる。本発明の脂質異常症の治療用または予防用組成物の投与対象の非限定的な例としては、糖尿病を発症しており脂質異常症を呈するヒト、糖尿病を発症しており脂質異常症を呈する危険性が高いヒト、糖尿病性腎症を発症しており脂質異常症を呈するヒト、糖尿病性腎症を発症しており脂質異常症を呈する危険性が高いヒトが挙げられる。

40

## 【0037】

別の態様において、本発明は、AGE結合アプタマーを含む、糖尿病患者における血圧低下用組成物を提供する。AGE結合アプタマーおよび糖尿病については、上記と同様である。糖尿病患者には、糖尿病性腎症を発症している患者（すなわち、糖尿病性腎症の患者）も、発症していない患者も含まれる。本発明の血圧低下用組成物の投与対象の非限定的な例としては、糖尿病を発症しており高血圧であるヒト、糖尿病を発症しており高血圧となる危険性が高いヒト、糖尿病性腎症を発症しており高血圧であるヒト、糖尿病性腎症を発症しており高血圧となる危険性が高いヒトが挙げられる。

## 【0038】

本発明の組成物は、AGE結合アプタマーを医薬として許容される担体と配合し、固形

50



製剤（例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤など）、または液状製剤（例えば、シロップ剤、注射剤など）として製造することができる。医薬として許容される担体としては、例えば、賦形剤（例えば、乳糖、ショ糖、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等）、崩壊剤（例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース等）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム等）、界面活性剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等）、溶剤（例えば、水、食塩水、大豆油等）、保存剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸エステル等）などがあげられるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0039】

本発明の組成物の投与方法は、投与対象の年齢、体重、健康状態等によって適宜選択される。例えば、本発明の組成物は、経口投与、静脈内投与、または皮下投与により投与することができるが、静脈内投与によることが好ましい。本発明の組成物の投与量もまた、投与方法、投与対象の年齢、体重、健康状態等によって適宜選択される。例えば、成人1日当たり、AGE結合アプタマーの量として1mg～100gを投与することができるが、これに限定されない。

10

#### 【0040】

別の態様において、本発明は、AGE結合アプタマーを含む組成物を投与することにより、糖尿病性腎症を治療または予防する方法、糖尿病患者における脂質異常症を治療または予防する方法、および糖尿病患者において血圧を低下する方法を提供する。

#### 【0041】

別の態様において、本発明は、以下の工程を含む、糖尿病または糖尿病性腎症の治療または予防に有用なAGE結合アプタマーをスクリーニングする方法を提供する：

20

- (i) SELEX法を用いてAGE結合アプタマーを得る工程；
- (ii) 得られたAGE結合アプタマーを糖尿病モデル動物に投与する工程；および
- (iii) 前記AGE結合アプタマーを投与された糖尿病モデル動物において、尿中のアルブミン排泄量、腎重量、血中尿素窒素濃度、血中クレアチニン濃度、血中総コレステロール濃度、血中中性脂肪濃度、血中遊離脂肪酸濃度、および血圧からなる群から選択される少なくとも1つを測定する工程。

糖尿病モデル動物は、好ましくは2型糖尿病モデル動物である。2型糖尿病モデル動物の非限定的な例としては、KK-Ay/Taマウスが挙げられる。

#### 【0042】

前記の治療または予防方法およびスクリーニング方法は、本発明の組成物に関する記載を考慮することで、当業者が適宜実施することができる。

30

#### 【0043】

以下、実施例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0044】

##### 実施例1 AGE結合アプタマーの作成(1)

##### (1) 一本鎖ランダムオリゴDNAの作成

34、56、または72残基のランダム領域およびその両側にプライマー部位（配列番号42および配列番号43）を含む一本鎖ランダムオリゴDNAを以下のように合成した。

40

#### 【0045】

まず、3'末端のヌクレオチドが3'水酸基を介して結合されたCPG (controlled pore glass) 担体をカラムに充填した。次いで、リボースの5'位の保護基であるジメトキシトリチル基をトリクロ酢酸によって除去して、脱トリチル化を行った。リボースの3'位の水酸基がリン酸シアノエチルアミダイド誘導体である2番目のヌクレオチドを、脱トリチル化された1番目のヌクレオチドの5'水酸基に、塩基触媒（テトラゾール）を用いてカップリングさせ、未反応の5'水酸基を無水酢酸によってアセチル化した。2つのヌクレオチド間の結合を、ヨードを用いて酸化して、3価のリンから5価のリン酸エス

50

テルへ変換した。上記の脱トリル化からリン酸エステルへの変換までの操作を目的の鎖長になるまで繰り返した。ランダム部分の配列は、カップリング反応の際に、4種のヌクレオチドアミダイド混合物を使用して行った。反応後、カラムからアンモニア処理によってオリゴDNAを切り出し、逆相カートリッジカラムによって精製した。凍結乾燥後、適量の水に溶解し、SELEXライブラリーのテンプレートDNAとした。

【0046】

(2) AGE-2の合成

ヒト血清アルブミン(HSA)(Sigma社製)を無菌状態で、D-グリセルアルデヒドと38にて7日間インキュベートした。未反応の糖を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)の透析によって除去した。使用する前に、Endospecy ES-20Sシステム(生化学工業)を用いて、エンドトキシンがないことを確認した。

10

【0047】

(3) AGE-2のビーズへの結合

上記(2)で得たAGE-2をPIERCE社のSulfoLink(登録商標)カップリングゲル(カタログ番号20401)を使用して製品の指示書に従って、以下のようにビーズに固定化した。

【0048】

まず、カップリングゲルをカラムにとり、カップリング緩衝液(50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH8.5)で平衡化した。AGE-2をカップリング緩衝液に溶解し、カップリングゲルと混合して、室温で1時間インキュベートした。反応終了後、カップリング緩衝液でカラムを数回洗浄した。L-システインをカップリング緩衝液に溶解し、カップリングゲルと混合して、室温で30分間インキュベートした。反応終了後、カップリング緩衝液およびPBSでカラムを数回洗浄した。なお、反応前および反応後の吸光度を測定することによって、AGE-2の固定化量を算出した。固定化後のゲル(ビーズ)を小分けし、使用するまで冷暗所に保存した。

20

【0049】

(4) HSAのビーズへの結合

HSAを、PIERCE社のSulfoLink(登録商標)カップリングゲル(カタログ番号20401)およびUltraLink(登録商標)EDC/DADPA固定化キット(カタログ番号53154)を使用して、ビーズに固定化した。

30

【0050】

(5) SELEX法

上記(1)で合成したランダムオリゴDNAを鋳型にして、forwardプライマー(配列番号42)とreverseプライマー(配列番号43)によるPCR(1サイクル: 94、15秒; 55、15秒; 72、15秒X12サイクル)を行った。増幅後、forwardプライマーのみを用いた非対称PCRによりプラス鎖を増幅した(1サイクル: 94、15秒; 55、15秒; 72、15秒X45サイクル)。増幅したプラス鎖をアガロースゲル電気泳動によって精製し、SELEX用DNAライブラリーとした。このSELEX用DNAライブラリーをPBSに溶かし、95で5分加熱し、室温に戻した。次いで、SELEX用DNAライブラリーと上記(3)で調製したAGE-2を固定化させたビーズとを混合し、室温で30分間インキュベートした。インキュベート後、PBSでビーズを数回洗浄した。適量の水をビーズに加えて混合し、100で5分間加熱し、AGE-2ビーズに結合したDNAを解離させて回収した。回収したDNAと上記(4)で調製したHSAを固定化させたビーズとを混合し、室温で10分間インキュベートした。素通りした(HSAに結合しなかった)DNAを回収して、エタノール沈殿法によって濃縮した。濃縮したDNAを鋳型にして、上記の操作を5~15ラウンド繰り返した。この時、5~8mMのMg<sup>+</sup>存在下でPCRを行って、変異を導入させた。

40

【0051】

(6) クローニング

5~15ラウンド後に得られたDNAを、forwardプライマー(配列番号42)とrever

50

eseプライマー（配列番号43）を用いるPCRによって増幅し、アガロースゲル電気泳動によって精製し、そしてAGE-2特異的DNAを得た。このDNAをクローニングベクター（Invitrogen社：Zero Blunt（登録商標）TOPO（登録商標）PCR Cloning Kit for Sequencing（カタログ番号K2875J10））へ導入し、以下のようにして配列を決定した。

【0052】

まず、AGE-2特異的DNA（PCR産物）とクローニングベクター（TOPOベクター）とを混合し、室温で5分間インキュベートした。反応終了後、反応液の一部をコンピテントセルに加え、氷冷下で30分間インキュベートした。42℃にて30秒間ヒートショックした後、氷上で2分間冷却した。冷却した反応液に、キット中に含まれているSOC培地を加えて37℃にて1時間培養した。適量を寒天プレート（50μg/mLアンピシリンを含むLB培地）に播種し、37℃にて一晩培養した。無作為に数十個のクローンを選び、アルカリ法によってプラスミドDNAを調製した。

10

【0053】

（7）配列決定

上記（6）で得られたプラスミドDNA中のAGE-2特異的DNAの配列を、Applied Biosystem社のABI377を用いてBigDye Terminator Cycle sequence法によって決定した。その結果、34塩基の一本鎖DNAからは、AGE-2に結合するものが得られなかった。56塩基の一本鎖DNAからは、配列番号1～24に示す54～58塩基の一本鎖DNA、すなわちAGE-2アダプターが得られた（表2）。なお、72塩基の一本鎖DNAについてもAGE-2に結合するものが得られたが、配列決定は行っていない。

20

【0054】

【表 2】

配列番号	配列																残基数						含有率									
																	A		G		C		T		A		G		C		T	
																	A	G	C	T	A	G	C	T	A	G	C	T				
1	CGGAAACCAGACCCACCCCAAGGCCACTCGGTGGAACCGGCCAACACTOACCCCA	17	8	28	3	30%	14%	50%	5%																							
2	ACCACTGCACGAGCCCCACCCAGTCCGACTCGCAGGTCCATGGCCCCCAGCCCA	11	9	31	5	20%	16%	55%	9%																							
3	CGCCCCACACACCCGCGCACGCCCAAAATCCCGGAGGTCCCGCGGTCCACAC	11	8	34	3	20%	14%	61%	5%																							
4	CCAGCCTCGATACCATAACCACCAACCCAAACCAGACTCCACACACCCACCGGTCTC	16	5	29	6	29%	9%	52%	11%																							
5	CAAGCGCTCCATCCACCGGACATACCTACCAAAACACTCTCTTGCCTATAAAACCAC	18	4	25	9	32%	7%	45%	16%																							
6	CCCGCCATTCCCTACATAACACCTACCGATGCCCTTCCAGTTAATCACCGG	12	3	27	12	22%	6%	50%	22%																							
7	CCACACTGCACTAAACCAGGTCGCGGACCATCACAACTGTGCCACTAGCCCT	14	7	27	8	25%	13%	48%	14%																							
8	AACTAGCCCGAGCCACAATCCCATAAACAAGCGTGACCACACTATGCTGTCTCC	16	7	22	10	29%	13%	40%	18%																							
9	TAACTCACTCCATAGTCACTTGTGATTGCGCAACAACACACACCCCTTAAACAGTCC	17	4	22	13	30%	7%	39%	23%																							
10	ATAACCCCGGAGCTAGCCGCAACTATGCCAGAACCCGCGCATAAACCACCCAGCTT	17	5	27	7	30%	9%	48%	13%																							
11	CCCAAGCAAAATAGCCACACCCACGACCCACCCCTCATATCCGACCGGCTCC	15	5	28	6	28%	9%	52%	11%																							
12	TCCCGAGCAACAAGCACTGCTTTAAACCCCCACCAACACACCCCGGTAGACCA	19	7	24	6	34%	13%	43%	11%																							
13	CCCTCAACACACCTTAACCAACCTCAGCCGAGCAACACACCCGCCAAACCGGAC	19	3	30	4	34%	5%	54%	7%																							
14	CTGAATACCAACGTACCCCTCCCAAGTCCCGCTACCCACGCTAAACTCAACCTCA	16	4	27	9	29%	7%	48%	16%																							
15	TACAGCCCCCAACCCACCCGCGGTAGATAACCCACCCACCAACGATATCCCACT	17	5	28	6	30%	9%	50%	11%																							
16	GCCATCGGTCCCGGAACTCAGACACCCCATCCGCAACCCGCGCCCACTCCACGGCC	12	6	35	5	21%	10%	60%	9%																							
17	GCGCACATATTACTTCTCAATCAAGCCCAACCGGAACACTCCCGTACACTAGAACC	17	5	25	10	30%	9%	44%	18%																							
18	GGACCGTTCACTCAATTACCCCCCATCACAGCCACAGATAGTACCCCATACACCCA	16	5	26	10	28%	9%	46%	18%																							
19	GTACATACACCCGACCGATCAAGGACGCAACTCACCAAAATGAACCTACACCAAC	24	4	23	5	43%	7%	41%	9%																							
20	GTCCCCATTCCAGCCCTTCTCATTCCACCACTCACACAACCAATACAAACCAGCCCA	16	3	27	11	28%	5%	47%	19%																							
21	GGTGGGTACCCACCCCAACACCCCAACTCCACCCACCTCGCCAACCCCGAAACAC	17	6	30	4	30%	11%	53%	7%																							
22	GCGTGACACCTATCTAACCAACAGCCACCCATCCAACACCCCGCTAACCCCACTCTCG	16	6	27	8	28%	11%	47%	14%																							
23	GCCAAATCGCCCGCACCCCAACCCCTGCCACGGGTAGCAACTGCATCGCAACC	14	9	28	6	25%	16%	49%	11%																							
24	GTACCTGCCCTCCCGCGTTAAATCACACTACAACACACCAACTCGTAGAAAACTAA	21	6	20	10	37%	11%	35%	18%																							

10

20

30

40

【0055】

表 2 に示すように、得られた AGE - 2 アプタマーはいずれも、当該アプタマーを構成する塩基中のシトシン含有率が 35% 以上であった。

【0056】

50

実施例 2 A G E 結合アプタマーの作成 ( 2 )

6 4 残基のランダム領域およびその両側にプライマー部位 ( 配列番号 4 2 および配列番号 4 3 ) を含む一本鎖ランダムオリゴ D N A を鋳型に用いたこと以外は、実施例と同様にして A G E - 2 アプタマーを作成した。その結果、配列番号 2 5 ~ 4 1 に示す 6 1 ~ 6 6 塩基の一本鎖 D N A、すなわち A G E - 2 アプタマーが得られた ( 表 3 )。

【 0 0 5 7 】

【 表 3 】

配列番号	配 列	残基数				含有率			
		A	G	C	T	A	G	C	T
25	GGCCAAGCAGGTAAGTGGGGGTCGGGTTGGTTGTCGGGTCGCGTGCAATATCACGTGT	9	24	13	16	15%	39%	21%	26%
26	GGACAAGCATGGTAGGCTAGGTTCCGCGGGTGGGATGGCATTCGGTGGGATCTTTGGCGGGT	9	30	10	15	14%	47%	16%	23%
27	GGACAAGCAGAGCGGTGAGTCGGTTTGTGGCATGGCGGGTGGTTGCCTGTGTCATCGA	10	26	12	15	16%	41%	19%	24%
28	GGCCAAGCATCGATGCCCGTGTGCCCTGTGCCGGGATGTAGTGTGCCTCGGGTGTGCATGAG	8	27	14	16	12%	42%	22%	25%
29	GGACAAGCTCTTGTGGCGGTTGGCCCTTAGCCCTTAGCCGTTCCGGAGTTCCACAGTCACCGTGGGGTG	8	25	15	16	13%	39%	23%	25%
30	GGCCAAGCTGGTATAAGTATGCAATCTGCCGTGATATCCCATCAGTGTGTTGGCTGTGCTGGCT	12	21	12	21	18%	32%	18%	32%
31	GTGCAAGCTGATGGTTCGGTAGTTCGGATGTTTGTGTCGTTGCTCCGCTTGTGAATGTGCT	7	22	9	24	11%	35%	15%	39%
32	GGCCAAGCATCGATGCCCGTGTGCCCTGTGCCGGGATGTAGTGTGCCCTCGGGTGTGCATGAG	8	27	14	16	12%	42%	22%	25%
33	GGCCAAGCAGGTAAGTGGGGTCCGGTTGGTTGTTCCGGTCTCGCGTGCAATATCACGTGT	9	24	13	16	15%	39%	21%	26%
34	GGCAAGCTGGTATAAGTATGCAATCTGCCGTGATATCCCATCAGTGTGTTGGCTGTGGAT	13	20	10	19	21%	32%	16%	31%
35	GGCAAGCCAGGGCGGTCATGGTTGTTGACTTGATTTGGCCGCTCAGTGCAGCCGA	9	23	14	15	15%	38%	23%	25%
36	GGACAAGCAGAGCGGTGAGTCGGTTTGTGGCATGGCGGGTGGTTGCCCTGTGTCATCGA	10	26	12	15	16%	41%	19%	24%
37	GGACAAGCTCTTGTGGCGGTTGCCCTTAGCCGTTCCGGTTCGGGAGTTCCACAGTCACCGTGGGGTG	8	25	15	16	13%	39%	23%	25%
38	GGGGACGCCGGGAGGATCCGGGGTGTGCTTGGTGGCCGGATGTCCGGTATTGTTGT	5	30	11	16	8%	48%	18%	26%
39	GGCAAGCTGTCCCTAGCCGTTGGTAGCAAGTTCGTGGCCCGCCAGTGTCTTGGCAGTTCC	8	24	16	14	13%	39%	26%	23%
40	GGCCAAGCAGGTAAGTGGGGTCCGGTTGGTTGTTCCGGTCTCGCGTGCAATATCACGTGT	9	24	13	16	15%	39%	21%	26%
41	GGCCAAGCTGGTATAAGTATGCAATCTGCCGTGATATCCCATCAGTGTGTTGGCTGTGGAT	13	20	10	19	21%	32%	16%	31%

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 8 】

表 3 に示すように、得られた A G E - 2 アプタマーはいずれも、当該アプタマーを構成する塩基中のグアニジン含有率が 3 2 % 以上であった。

## 【 0 0 5 9 】

得られた A G E - 2 アプタマーの配列に基づいて、上記実施例 1 ( 1 ) と同様にホスホアミダイド法により、各 A G E - 2 アプタマーを化学合成した。

## 【 0 0 6 0 】

実施例 3 A G E - 2 アプタマーによる A G E - 2 蛍光阻害実験

A G E - 2 の蛍光特性を測定するために、蛍光分光光度計 ( F P - 7 7 7 ; 日本分光 ) を用いて、励起波長および消光波長を決定した。その結果、励起は 3 8 0 n m および消光は 4 7 0 n m で最大蛍光を示した。そこで、2 5 ~ 1 0 0  $\mu$  g / m L の A G E - 2 を用いて、励起波長 3 8 0 n m での蛍光強度を測定して検量線を作成した ( 図 3 A ) 。

次いで、1 0 0  $\mu$  g / m L の A G E - 2 に対して、最終濃度 2 5 ~ 1 0 0 n M となるように各アプタマー ( 配列番号 1 ~ 1 5 ) を添加し、蛍光強度を測定した ( 図 3 B および図 3 C ) 。アプタマーを 2 5 n M 添加したときの A G E - 2 の蛍光強度の減弱に基づいて、アプタマー単位モル数 ( n m o l ) あたりに結合する A G E - 2 の質量 ( n g ) を算出した。結果を表 4 に示す。

## 【 0 0 6 1 】

## 【表 4】

配列番号	1nmolのアプタマーに結合するAGE-2の量(ng)
1	595.8
2	175.2
3	260.0
4	210.3
5	143.1
6	201.5
7	146.0
8	175.2
9	116.8
10	134.3
11	137.3
12	116.8
13	175.2
14	157.7
15	271.0

## 【 0 0 6 2 】

実施例 4 ウシ周皮細胞を用いたアポトーシス実験

ウシ周皮細胞を、屠殺後のウシから調製し、ダルベッコ改変イーグル培地 ( Gibco BRL, Rockville, MD ) に 2 0 % ウシ胎児血清 ( ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH ) を添加した培地中で継代培養した。培養したウシ周皮細胞を、2 0  $\mu$  g / m L の A G E - 2 および 1 0 0  $\mu$  g / m L のアプタマー ( 配列番号 1 ~ 2 2 ) とともに 3 7  $^{\circ}$  C にて 2 日間インキュベートした。コントロールではアプタマーの代わりに H S A を添加して、ならびに陽性コントロールでは A G E - 2 を添加して、上記と同様にインキュベートした。2 日後、細胞をトリプシンで剥離し、[  $^3$  H ] - チミジンの取込実験を行って、生存細胞の数をカウントした。生存細胞数から、図 4 に示すようにして、アポトーシス阻害率を算出した。結果

を表 5 に示す。

【 0 0 6 3 】

【 表 5 】

		蛍光強度		アポトーシス阻害率 (%)
		平均	S.E.	
コントロール		0.265	0.00772	—
AGE-2のみ		0.162	0.00509	100
アプタマー 配列番号	1	0.222	0.0144	58.3
	2	0.223	0.013	59.2
	3	0.186	0.00648	23.3
	4	0.203	0.0111	39.8
	5	0.203	0.00745	39.8
	6	0.203	0.0085	39.8
	7	0.210	0.00712	46.6
	8	0.210	0.0121	46.6
コントロール		0.301	0.0124	—
AGE-2のみ		0.203	0.0128	100
アプタマー 配列番号	9	0.212	0.0102	9.2
	10	0.223	0.0172	20.4
	11	0.218	0.00765	15.3
	12	0.224	0.00886	21.4
	13	0.268	0.017	66.3
	14	0.238	0.00911	35.7
	15	0.244	0.0117	41.8
コントロール		0.251	0.00295	—
AGE-2のみ		0.150	0.00462	100
アプタマー 配列番号	16	0.189	0.00516	38.6
	17	0.183	0.0047	32.7
	18	0.207	0.00598	56.4
	89	0.210	0.00564	59.4
	20	0.199	0.00334	48.5
	21	0.206	0.00747	55.4
	22	0.221	0.0101	70.3

10

20

30

40

【 0 0 6 4 】

表 5 に示すように、AGE-2 のみの添加によって誘発されるアポトーシスが、AGE-2 アプタマーを加えることによって阻害されたことがわかる。このことから、AGE-2 アプタマーが AGE-2 に結合して、その機能を阻害し得ることがわかった。

【 0 0 6 5 】

実施例 4 AGE-2 アプタマーの投与量の決定

( 1 ) 方法

2 型糖尿病モデルマウス KK-Ay/Ta マウス ( 日本クレア、雄性、6 週齢 ) の腹腔内に浸透

50

圧ポンプ (ALZET社) を埋め込んだ。投与後の血中濃度が 0.03、0.3、3  $\mu$ M となるように薬液を浸透圧ポンプに充填し、AGE-2 アプタマー (配列番号 1) を腹腔内持続投与した (2 週間または 3 週間)。AGE-2 アプタマー (配列番号 1) の合成は Operon社に依頼し、その配列は下記のとおりである。

AGE-2 アプタマー

CCGAAACCAGACCACCCACCAAGGCCACTCGGTGCAACCGCCAACACTCACCCCA (配列番号1)

#### 【0066】

投与後、マウスより血液を採取し、採取した血液を下記プライマーおよび酵素 (KOD FX (登録商標) (東洋紡績社)) を含む PCR 反応混合物に添加し (全血の添加量は反応液量 25  $\mu$ L のうち 0.5  $\mu$ L)、PerkinElmer社 GeneAmp PCR System 2400 にて PCR を行った。下記プライマーの合成は Genosys社に依頼した。反応終了後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅断片を検出した。

AGE2 aptamer Forward primer: CCGAAACCAGACCACCCACCA (配列番号44)

AGE2 aptamer Reverse primer: TGGGGTGAGTGTGGCGGTTT (配列番号45)

Control aptamer Forward primer: CTGTCATAGGAACAGTCAGACTCAGCGTCCG (配列番号46)

Control aptamer Reverse primer: GTGCTAAGTGCCCTGAACTGCGA (配列番号47)

#### 【0067】

(2) 結果

投与後の血中濃度が 0.03、0.3、3  $\mu$ M となるように設計された薬液の持続投与により、AGE-2 アプタマー (配列番号 1) の血中移行が確認された (図 6)。

#### 【0068】

実施例 5 AGE-2 アプタマーの糖尿病モデルマウスを用いた薬効評価 (1)

(1) 方法

2 型糖尿病モデルマウス KK-Ay/Ta マウス (日本クレア、雄性、6 週齢) および C57BL/6j マウス (日本クレア、雄性、6 週齢) の腹腔内に浸透圧ポンプ (ALZET社) を埋め込んだ。AGE-2 アプタマー (配列番号 1) および下記配列を有するコントロールアプタマー (配列番号 48) を、投与後の血中濃度が 3.334  $\mu$ M となるように薬液を浸透圧ポンプに充填し (0.1 mg / 20 g 体重)、腹腔内に持続投与した。

コントロールアプタマー

GTTAICTGTTCATAGGAACAGTCAGACTCAGCGTCGCAGTTCAGGGCACTTTAGCAC (配列番号48)

コントロールアプタマーは、Operon社に合成を依頼し、入手した。アプタマーの投与は、KK-Ay/Ta マウスにおいて糖尿病合併症の発症が認められる 8 週齢から、腎障害 (結節性病変)、尿中アルブミンが認められる 16 週齢まで実施した。

#### 【0069】

経時的に体重、血圧を測定した。また、経時的に尿を採取し、尿量、尿中のアルブミン量およびクレアチニン量を測定した。16 週齢において、血糖値、血中の HbA1c、総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸、尿素窒素、およびクレアチニンの量、並びに腎重量を測定した。HbA1c は、グリコヘモグロビンのうち、ヘモグロビンの鎖の N 末端にグルコースが結合した糖化蛋白質であり、AGE の 1 種である。また、腎臓組織からパラフィン切片を作成し、PAS (periodic acid Schiff) 染色および Masson-Trichrome 染色を行った。糸球体の線維化を定量化するために、Masson-Trichrome 染色した組織切片の画像をコンピューターに取り込み、染色された面積を測定した。

#### 【0070】

(2) 結果

AGE-2 アプタマー (配列番号 1) 投与により、KK-Ay/Ta マウスにおいて尿中のアルブミン排泄量の増加が顕著に抑制された (図 7 (A))。尿中のアルブミン / クレアチニン比率は、AGE-2 アプタマー投与 (配列番号 1) により 12 週齢に比べ 16 週齢では改善傾向が認められた (図 7 (B))。また、AGE-2 アプタマー (配列番号 1) 投与



KK-Ay/Taマウスの腎臓組織においては、メサンギウム基質の増加、糸球体基底膜の肥厚（硬化）、および糸球体の線維化は認められず、コントロールマウスと変わらぬ正常な組織構造が認められた（図8、9、および10）。さらに、AGE-2アプタマー（配列番号1）投与により、コントロールアプタマー（配列番号48）投与と比較し、KK-Ay/Taマウスにおいて、腎肥大の抑制、尿素窒素およびクレアチニンの血中濃度の増加抑制、総コレステロール、中性脂肪、および遊離脂肪酸の血中濃度の増加抑制、および血圧の低下（表6）が認められた。一方、血糖値およびHbA1cについては、AGE-2アプタマー（配列番号1）投与による増加抑制は認められなかった（表7）。

【0071】

尿素窒素およびクレアチニンの測定結果から、AGE-2アプタマー（配列番号1）を投与したKK-Ay/Taマウスの腎機能は正常であり、AGE-2アプタマー（配列番号1）投与により腎機能の悪化が抑制されたことが明らかとなった。また、総コレステロール、中性脂肪、および遊離脂肪酸の測定結果から、AGE-2アプタマー（配列番号1）投与により糖尿病モデルマウスにおける脂質異常が抑制されたことが明らかとなった。

【表6】

	16週齢コントロールマウス (C57BL/6jマウス)		16週齢2型糖尿病モデルマウス (KK-Ay/Taマウス)	
	コントロールア プタマー投与	AGE-2アプ タマー投与	コントロールア プタマー投与	AGE-2アプ タマー投与
n	3	4	6	6
平均血圧 (mmHg)	76.4±2.3	77.5±4.3	78.1±1.9	69.8±1.3*#
腎臓/体重比 ( $\times 10^{-3}$ )	12±0.3	13±0.8	20±2.5	15±0.7*#
尿素窒素 (mg/dL)	28.9±2.7	26.8±1.6	33.1±12.6	27.5±1.7#
クレアチニン (mg/dL)	0.12±0.017	0.10±0.003	0.15±0.061	0.09±0.003*##
総コレステロー ル (mg/dL)	62.7±1.5	62.3±1.5	98.3±48.9*	79.7±6.3*#
中性脂肪 (mg/dL)	43.0±11.0	25.8±5.1	261.3±368.3*	200.8±42.5**
遊離脂肪酸 (mg/dL)	948±354.4	645±100.4	1032±1056.9	1016±63.3**

\* p<0.05 vs 対応するコントロールマウス

\*\*p<0.01 vs 対応するコントロールマウス

#p<0.05 vs コントロールアプタマー投与 KK-Ay/Ta マウス

##p<0.01 vs コントロールアプタマー投与 KK-Ay/Ta マウス

【表 7】

	7週齢コントロールマウス (C57BL/6j マウス)		7週齢2型糖尿病モデルマウス (KK-Ay/Ta マウス)	
	コントロールア プタマー投与	AGE-2アブ タマー投与	コントロールア プタマー投与	AGE-2アブ タマー投与
体重 (g)	21.9±0.17	22.2±0.90	33.3±1.54	33.0±1.68
血糖値 (mg/dL)	153±36.0	132±22.2	207±71.3	206±63.0
尿量 (μL)	825±377.5	480±288.7	1050±374.2	1225±310.5
	16週齢コントロールマウス (C57BL/6j マウス)		16週齢2型糖尿病モデルマウス (KK-Ay/Ta マウス)	
血糖値 (mg/dL)	184±12.7	176±7.6	298±59.6	372±84.3**
HbA1c (%)	3.9±0.09	4.0±0.09	5.8±0.52*	6.3±0.40**

\* p&lt;0.05 vs 対応するコントロールマウス

\*\*p&lt;0.01 vs 対応するコントロールマウス

#p&lt;0.05 vs コントロールアプタマー投与 KK-Ay/Ta マウス

##p&lt;0.01 vs コントロールアプタマー投与 KK-Ay/Ta マウス

10

20

## 【0072】

実施例 6 AGE-2アプタマーの糖尿病モデルマウスを用いた薬効評価(2)

実施例 5 と同様にして、AGE-2アプタマー(配列番号 1)の薬効評価を行った。結果を表 8 に示す。また、糸球体における AGE-2沈着を検討するため、腎臓切片をポリクローナル抗 AGE-2抗体(Molecular Medicine 6(2): 114-125, 2000に記載の方法により作製)(1:1000)で染色した。その結果、AGE-2アプタマー(配列番号 1)を投与した KK-Ay/Ta マウスでは、糸球体における AGE-2沈着が観察されなかった(図 11)。さらに、尿中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の量を測定したところ、AGE-2アプタマー(配列番号 1)の投与により 8-OHdG 産生の抑制が認められ、酸化ストレスの亢進が抑制されたことが示された(図 12)。

30

【表 8】

	Ctrl + C-apt	Ctrl + A-apt	DM + C-apt	DM + A-apt
N	7	9	9	10
体重 (g)	24.9±1.5	25.1±1.1	45.5±1.2*	43.2±1.2*
平均血圧 (mmHg)	76.4±2.3	77.5±4.3	79.7±1.4	72.7±1.5#
血糖値 (mg/dL)	177.0±9.9	185.4±9.8	297.9±42.4*	328.2±53.3*
HbA1c (%)	4.0±0.05	4.0±0.08	6.0±0.4*	6.3±0.3*
総コレステロール (mg/dL)	62.7±1.5	62.3±1.5	98.3±8.1*	79.7±6.3#
尿素窒素 (mg/dL)	28.9±2.7	26.8±1.6	33.1±2.1	27.5±1.7#
クレアチニン(mg/dL)	0.12±0.02	0.10±0.003	0.15±0.01	0.09±0.003#
腎臓/体重比 (X 10 <sup>-3</sup> )	13.6±0.7	13.7±0.4	20.3±2.5*	14.8±0.7#

\* vs Ctrl+C-apt p<0.05

# vs DM+C-apt p<0.05

Ctrl+C-apt: コントロールアプタマーを投与したC57BL/6jマウス; Ctrl+A-apt: AGE-2アプタマーを投与したC57BL/6jマウス; DM+C-apt: コントロールアプタマーを投与したKK-Ay/Taマウス; DM+A-apt: AGE-2アプタマーを投与したKK-Ay/Taマウス。

【産業上の利用可能性】

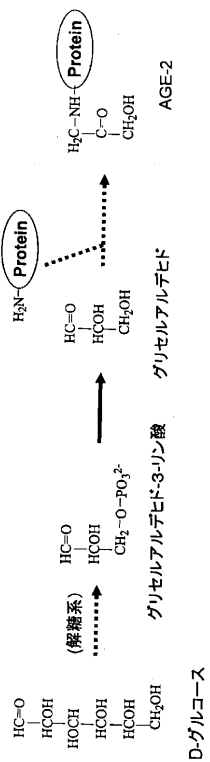
【0073】

本発明で提供されるAGE結合アプタマーを含む組成物は、糖尿病性腎症治療等に有用である。

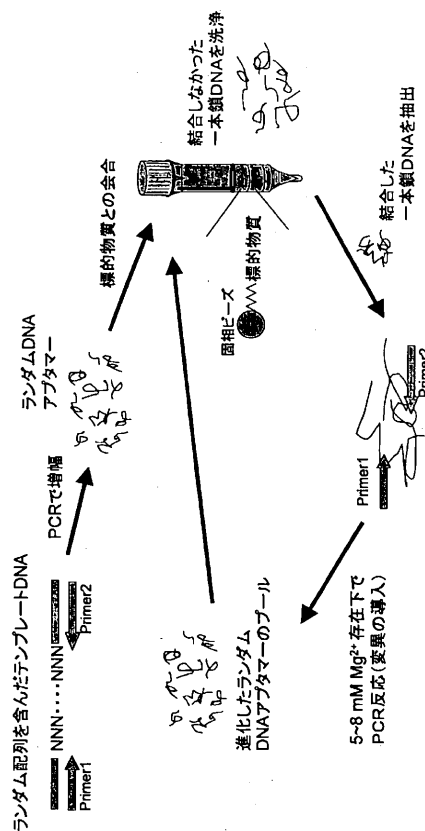
10

20

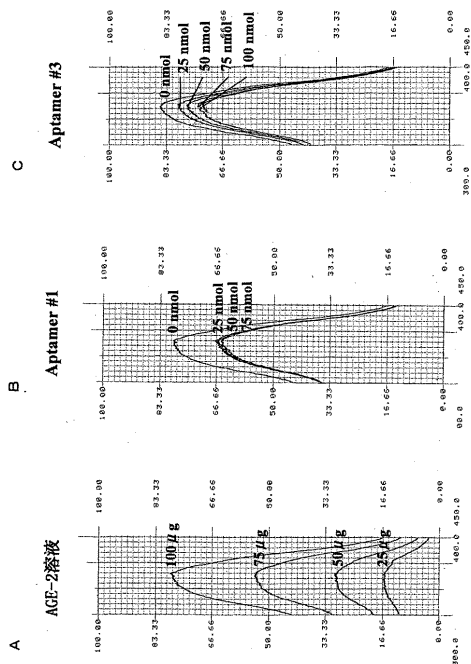
【 図 1 】



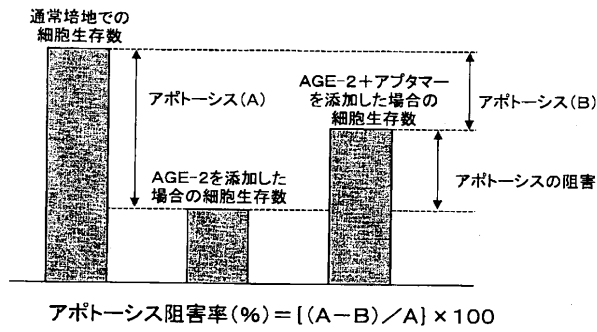
【 図 2 】



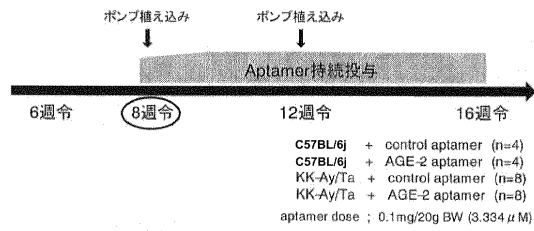
【 図 3 】



【 図 4 】

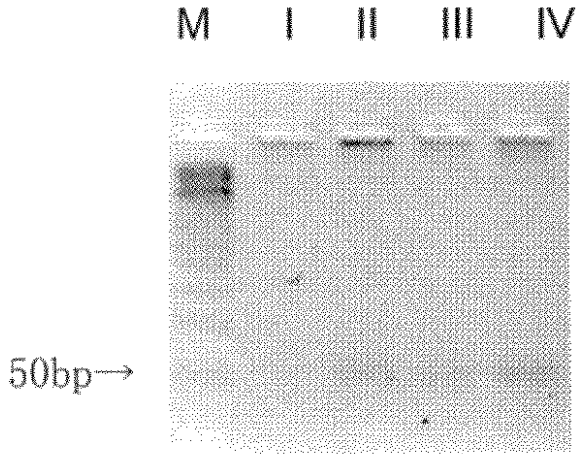


【 図 5 】

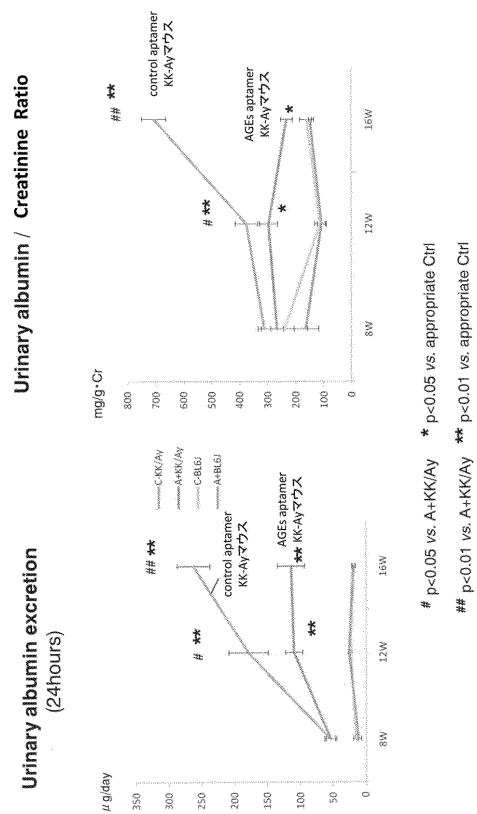


AGE-2 aptamer, 56mer, Mw=17209.9 (配列番号1)  
 CCGAAACCAGACCCACCCAGCAAGGGCACTGGGTCGGAACCCCAAGCACTACCCCA  
 Control aptamer, 56mer, Mw=17239.3 (配列番号48)  
 GTTATCTGTCATAGGAACAGTCAGACTCAGCGTCGCAGTTCAGGGCACTTAGCAC

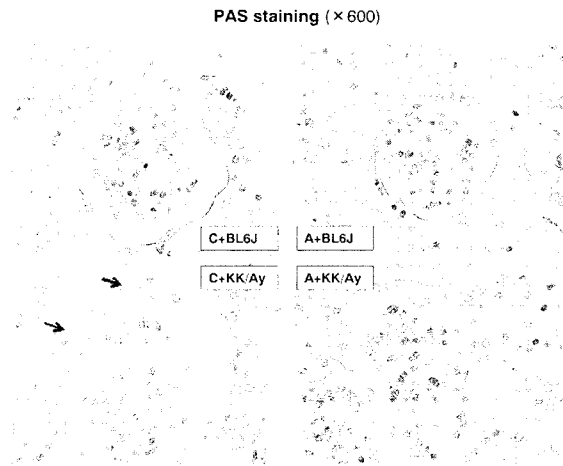
【 図 6 】



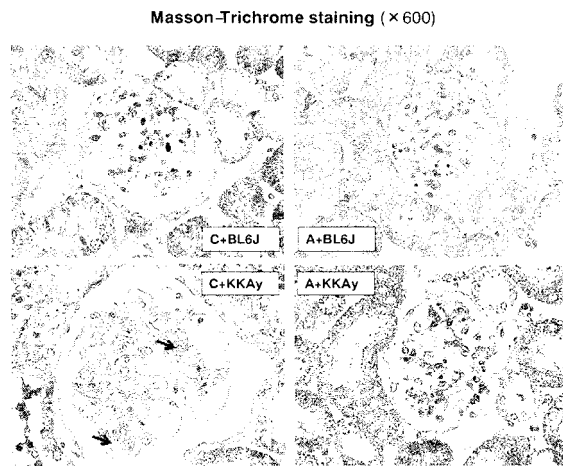
【 図 7 】



【 図 8 】

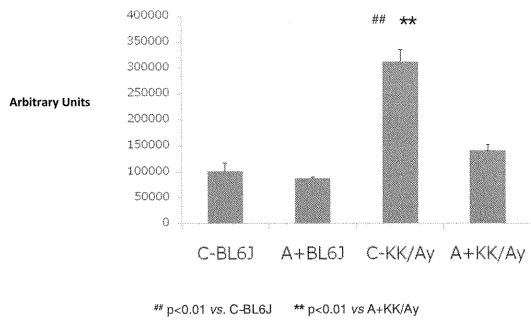


【 図 9 】

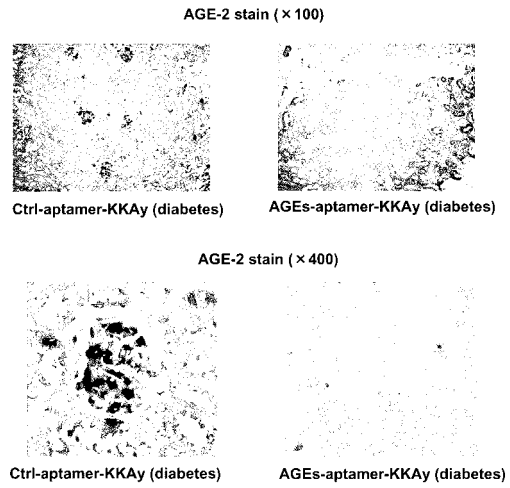


【 図 1 0 】

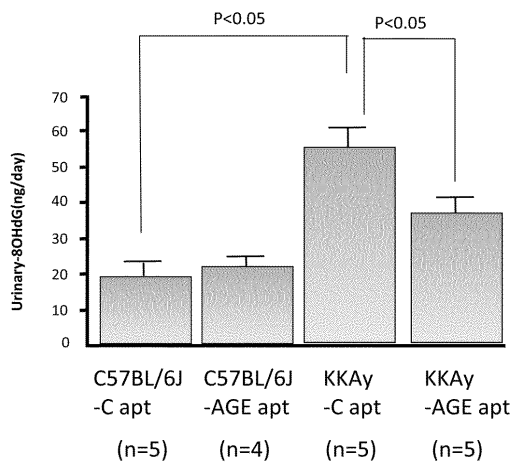
### Glomerular fibrosis Index



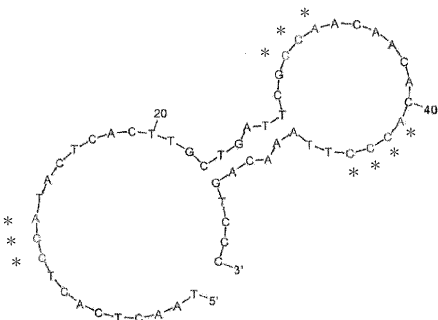
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【配列表】

2012070621000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2011/077062
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K31/711(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K31/711, A61K48/00, A61P3/06, A61P3/10, A61P9/12, A61P13/12  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2006/080262 A1 (Kurume University), 03 August 2006 (03.08.2006), claims; page 1, 3rd paragraph; page 19, 2nd paragraph; examples & US 2009/0023672 A1	1-3, 6-9 4, 5, 10-12
Y	JP 2006-63076 A (Iskra Industry Co., Ltd.), 09 March 2006 (09.03.2006), paragraphs [0007], [0021] to [0022]; examples; fig. 1 & JP 2010-180250 A	4, 10, 12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 January, 2012 (24.01.12)		Date of mailing of the international search report 31 January, 2012 (31.01.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077062

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Figarola, J.L. et al., Renoprotective and Lipid-Lowering Effects of LR Compounds, Novel Advanced Glycation End Product Inhibitors, in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, Vol. 1043, pp.767-776, Abstract	4,10,12
Y	Mizutani, K. et al., Inhibitor for advanced glycation end products formation attenuates hypertension and oxidative damage in genetic hypertensive rats, Journal of Hypertension, 2002, Vol.20, Issue 8, pp.1607-1614, Abstract	5,11,12
P,X	Kei FUKAMI, "AGEs as a novel therapeutic target for the pathogenesis of CKD", The Journal of the Kurume Medical Association, 2011.05, vol.74. no.3/5, pages 95 to 100, page 98, right column, 2nd paragraph and thereafter 'AGEs o Target to shita Tonyobyoseijinsho no Chiryō Senryaku'	1-3,6-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 7 0 6 2													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/711(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/711, A61K48/00, A61P3/06, A61P3/10, A61P9/12, A61P13/12															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2012年														
日本国実用新案登録公報	1996-2012年														
日本国登録実用新案公報	1994-2012年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号													
X	WO 2006/080262 A1 (学校法人久留米大学) 2006.08.03, 請求の範囲, 第1頁第3段落, 第19頁第2段落, 実施例	1-3, 6-9													
Y	& US 2009/0023672 A1	4, 5, 10-12													
Y	JP 2006-63076 A (イスクラ産業株式会社) 2006.03.09, [0007], [0021]-[0022], 実施例, 図1 & JP 2010-180250 A	4, 10, 12													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 24.01.2012		国際調査報告の発送日 31.01.2012													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 安居 拓哉	4C 3437												
		電話番号 03-3581-1101 内線	3452												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/077062
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Figarola, J.L. et al., Renoprotective and Lipid-Lowering Effects of LR Compounds, Novel Advanced Glycation End Product Inhibitors, in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, Vol.1043, pp.767-776 Abstract	4, 10, 12
Y	Mizutani, K. et al., Inhibitor for advanced glycation end products formation attenuates hypertension and oxidative damage in genetic hypertensive rats, Journal of Hypertension, 2002, Vol.20, Issue 8, pp.1607-1614 Abstract	5, 11, 12
P, X	深水圭, 終末糖化産物からみた慢性腎臓病(CKD)の病態解明と治療戦略, 久留米医学会雑誌, 2011.05, Vol.74. No.3/5, pp.95-100 第98頁右欄第2段落以降「AGEsをターゲットとした糖尿病性腎症の治療戦略」	1-3, 6-9

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P</b>	<b>9/12</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	9/12
C 1 2 N	15/115	(2010.01)	C 1 2 N	15/00 H

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 東元 祐一郎  
 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内

(72) 発明者 山岸 昌一  
 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内

(72) 発明者 奥田 誠也  
 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内

(72) 発明者 井上 浩義  
 神奈川県横浜市港北区箕輪町 1 - 1 4 - 1 - 3 1 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 HA17  
 4C084 AA13 NA14 ZA421 ZA811 ZC331 ZC351  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA42 ZA81 ZC33 ZC35

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。