

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/039469

発行日 平成26年2月3日 (2014.2.3)

(43) 国際公開日 平成24年3月29日 (2012.3.29)

| (51) Int.Cl.            | F I                | テーマコード (参考) |
|-------------------------|--------------------|-------------|
| GO 1 N 33/15 (2006.01)  | GO 1 N 33/15 Z     | 2 G O 4 5   |
| GO 1 N 33/68 (2006.01)  | GO 1 N 33/68 Z N A | 4 C O 8 6   |
| GO 1 N 33/566 (2006.01) | GO 1 N 33/566      | 4 H O 4 5   |
| GO 1 N 33/50 (2006.01)  | GO 1 N 33/50 Z     |             |
| CO 7 K 14/47 (2006.01)  | CO 7 K 14/47       |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁) 最終頁に続く

|   |   |
|---|---|
| 出願番号 特願2012-535076 (P2012-535076)         | (71) 出願人 504147243<br>国立大学法人 岡山大学<br>岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号             |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP2011/071669             |   |
| (22) 国際出願日 平成23年9月22日 (2011.9.22)         |   |
| (31) 優先権主張番号 特願2010-214019 (P2010-214019) | (74) 代理人 100088904<br>弁理士 庄司 隆                                      |
| (32) 優先日 平成22年9月24日 (2010.9.24)           | (74) 代理人 100124453<br>弁理士 資延 由利子                                    |
| (33) 優先権主張国 日本国 (JP)                      | (74) 代理人 100135208<br>弁理士 大杉 卓也                                     |
|   | (74) 代理人 100152319<br>弁理士 曾我 亜紀                                     |
|   | (72) 発明者 西堀 正洋<br>岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号<br>国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合<br>研究科内 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法

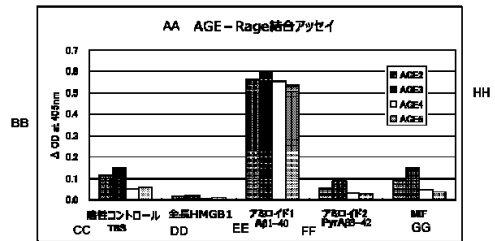
(57) 【要約】

アミロイドペプチドの新規活性に着目したRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法を提供する。

アミロイドペプチドがRAGEとAGEの結合を高親和性に変化させることを初めて見出したことにより、アミロイドペプチドのRAGEとAGEの結合親和性に及ぼす活性を阻害する候補化合物を選別することによる、RAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法により得られた結合抑制剤は、

アミロイドペプチドが関わるRAGEとAGEの結合により生じるあらゆる疾患や症状の治療剤として使用することができる。とりわけ、新規メカニズムに着目したアルツハイマー病治療薬の開発に貢献しうる。

【図7】



AA AGE-Rage binding assay  
 BB Δ OD at 405 nm  
 CC Negative control  
 DD Full-length HMGB1  
 EE Amyloid 1 Aβ1-40  
 FF Amyloid 2 PyrAβ3-42  
 GG MIF  
 HH AGE2, AGE3, AGE4, AGE5

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

RAGE (Receptor for advanced glycation endproducts)、AGE (advanced glycation end products) 及び アミロイドペプチドを含む検査系において、RAGEとAGEの結合を抑制しうる候補物質を選別することによるRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法。

## 【請求項 2】

以下の工程を含む、請求項 1 に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法：

- 1) AGE化蛋白質を固定した固相を準備する工程；
- 2) 候補物質を含む溶液を固相に加える工程；
- 3) アミロイドペプチドを含む溶液を固相に加える工程；
- 4) 可溶化したRAGEを含む溶液を固相に加える工程；
- 5) 上記 4) の工程の後、固相に固定したAGE化蛋白質に結合したsRAGEの量を測定してRAGEとAGEの結合親和性を測定し、RAGEとAGEの結合を抑制しうる候補物質を選別する工程。

10

## 【請求項 3】

候補物質と アミロイドペプチドを反応させた後、RAGEとAGEの結合親和性を測定することを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法。

## 【請求項 4】

アミロイドペプチドが、以下の配列番号 1 に示すアミノ酸配列、又は配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうちC末端側のアミノ酸が 1 ~ 2 個欠失又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法：

20

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVIA (配列番号 1)

## 【請求項 5】

AGEのサブタイプが、AGE2、AGE3、AGE4及びAGE5より選択されるいずれか 1 種又は 2 種以上である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法。

## 【請求項 6】

RAGEとAGEの結合抑制剤が、アルツハイマー病治療薬、糖尿病合併症治療薬、動脈硬化治療薬のいずれかである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法。

30

## 【請求項 7】

固相、AGE化蛋白質、アミロイドペプチド、及び可溶化RAGEを構成として含む、RAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング用キット。

## 【請求項 8】

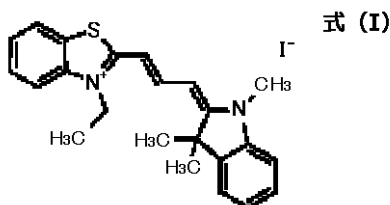
請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法により選別されるRAGEとAGEの結合抑制剤。

## 【請求項 9】

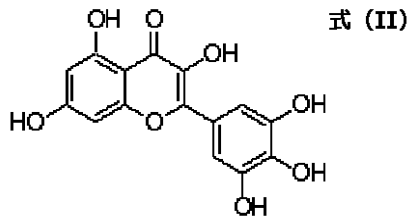
選別されるRAGEとAGEの結合抑制剤が、以下の式(I) ~ (III)のいずれかで示す化合物である、請求項 8 に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤。

40

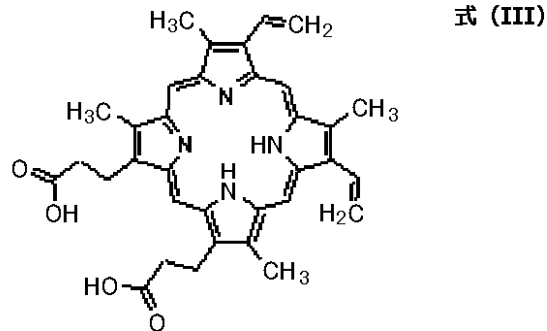
## 【化 1】



## 【化2】



## 【化3】



10

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アミロイドペプチドの新規活性を利用したRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法に関する。より具体的には、アミロイドペプチドの新規活性を利用したアルツハイマー病治療薬のスクリーニング方法に関する。

## 【0002】

本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願、特願2010-214019号優先権を請求する。

## 【背景技術】

30

## 【0003】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease) は、進行性の認知機能障害をきたす神経性疾患であり、大脳の神経細胞の脱落のために発症すると考えられている。アルツハイマー病の成因については、現在アミロイドペプチド学説が最も有力である。この学説は、アルツハイマー病脳では老人斑とよばれる変性蛋白沈着構造が多数見いだされ、老人斑の主要な構成成分として、アミロイドペプチドが同定されていること、家族性アルツハイマー病の解析で見つかったアミロイド前駆体蛋白 (Amyloid Precursor Protein: APP) とプレセニン1/2 (Presenilin 1/2) の変異が、アミロイドペプチドの産生増加に働くことがわかっていること、さらにアミロイドペプチドのオリゴマーあるいはシート構造の重合体が神経毒性効果を有するとの知見に基づいている。

40

## 【0004】

上記のような知見から、脳内アミロイドペプチドの産生を抑制し、代謝を促進する薬物、抗アミロイドペプチド抗体、アミロイドペプチドのオリゴマー化・重合化阻害薬の開発が続けられている。例えば、アミロイドペプチドの形成を阻害するアルツハイマー病治療用化合物 (新規ジenseノシド化合物) について開示がある (特許文献1: 特表2008-506686号公報)。アルツハイマー病と他のアミロイド蛋白原線維形成障害の治療のための低分子量ペプチドについて開示がある (特許文献2: 特表2007-535494号公報)。アミロイド蛋白質の凝集を抑制する物質とその作用として、リボカリン型プロスタグランジンD合成酵素 (L-PGDS) に着目した薬剤について開示がある (特許文献3: 特開2007-284351号公報)。アミロイドペプチド及びそれを用いたアルツハイマー病治

50

療薬又は予防薬のスクリーニング方法について開示がある（特許文献4：特開2006-26518号公報）。また、アルツハイマー病治療薬のスクリーニング方法として、アミロイド(1-40)の輸送活性を指標とするものについても開示がある（特許文献5：特許第4270976号公報）。その他、アミロイドペプチドは、アミロイド前駆蛋白にセクレターゼやセクレターゼが作用して生成されることに着目したセクレターゼ(BACE)阻害剤やセクレターゼ阻害剤や、アミロイドペプチドそのものを阻害する抗アミロイドペプチド抗体の開発が進められている（図1参照）。しかしながら、そのような努力が鋭意なされているにも関わらず、有望な新薬候補は登場してきていない。

【0005】

アミロイドペプチドは、それ自身がオリゴマーあるいは重合体線維化物を形成し、ある種の受容体構造に働き、神経毒を発揮すると考えられている。この受容体のひとつとして挙げられるのが、RAGE (Receptor for advanced glycation endproducts) である。この受容体は、その名の通りAGE (advanced glycation endproducts) に対する受容体として同定されてきたが、アミロイドペプチドもRAGEの生体内リガンドのひとつと考えられている（非特許文献1～3）。AGEは、還元糖と蛋白質との間の非酵素的糖化反応（メイラード反応ともいう）の後期段階で生成する構造体の総称である（図2参照）。AGE及びRAGEが、糖尿病血管合併症のみならず、動脈硬化症、腫瘍の増殖・転移・炎症反応やアルツハイマー病にも関与することが明らかになってきている。また、RAGEとAGEの試験管結合実験系によるアッセイ方法（測定方法）についても報告されている（非特許文献4）。しかしながら、アミロイドペプチドとRAGEとの関係において、アルツハイマー病にどのように関わっているかについては、十分に解明されているとは言えない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特表2008-506686号公報

【特許文献2】特表2007-535494号公報

【特許文献3】特開2007-284351号公報

【特許文献4】特開2006-265189号公報

【特許文献5】特許第4270976号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Nature, Vol.382, 22, 685-691 (1996)

【非特許文献2】Proc. Natl. Acd. Sci. USA, Vol.94, 5296-5301 (1997)

【非特許文献3】Nature Medicine, Vol.9, 7, 907-913 (2003)

【非特許文献4】Nature, Vol.382, 22, 685-691 (1996)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、アミロイドペプチドの新規活性に着目したRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記のアミロイドペプチドは正常脳においても産生され、健常人でもある程度の老人斑は生じていることがわかっている。しかしながら、アルツハイマー病の最大の危険因子は実は加齢である。そこで、本発明者らはアミロイドペプチドのみならず加齢の要素がアルツハイマー病の発症に重要である点に着目し、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、アミロイドペプチドがRAGEとAGEの結合を高親和性に変化させることを初めて見出した。そこで、アミロイドペプチドのRAGEとAGEの結合を抑制する物質を選別することによる、RAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法に関する本発明を完成した。

10

20

30

40

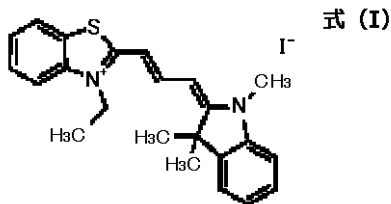
50

## 【 0 0 1 0 】

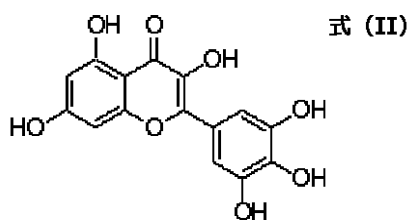
すなわち本発明は、以下よりなる。

1. RAGE、AGE及び アミロイドペプチドを含む検査系において、RAGEとAGEの結合を抑制しうる候補物質を選別することによるRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法。
2. 以下の工程を含む、前項1に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法：
  - 1) AGE化蛋白質を固定した固相を準備する工程；
  - 2) 候補物質を含む溶液を固相に加える工程；
  - 3) アミロイドペプチドを含む溶液を固相に加える工程；
  - 4) 可溶化したRAGEを含む溶液を固相に加える工程；
  - 5) 上記4)の工程の後、固相に固定したAGE化蛋白質に結合したsRAGEの量を測定してRAGEとAGEの結合親和性を測定し、RAGEとAGEの結合を抑制しうる候補物質を選別する工程。
3. 候補物質と アミロイドペプチドを反応させた後、RAGEとAGEの結合親和性を測定することを特徴とする、前項1又は2に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法。
4. アミロイドペプチドが、以下の配列番号1に示すアミノ酸配列、又は配列番号1に示すアミノ酸配列のうちC末端側のアミノ酸が1～2個欠失又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである、前項1～3のいずれか1に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法：  
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (配列番号1)
5. AGEのサブタイプが、AGE2、AGE3、AGE4及びAGE5より選択されるいずれか1種又は2種以上である、前項1～4のいずれか1に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法。
6. RAGEとAGEの結合抑制剤が、アルツハイマー病治療薬、糖尿病合併症治療薬、動脈硬化治療薬のいずれかである、前項1～5のいずれか1に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法。
7. 固相、AGE化蛋白質、 アミロイドペプチド、及び可溶化RAGEを構成として含む、RAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング用キット。
8. 前項1～6のいずれか1に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法により選別されるRAGEとAGEの結合抑制剤。
9. 選別されるRAGEとAGEの結合抑制剤が、以下の式(I)～(III)のいずれかで示す化合物である、前項8に記載のRAGEとAGEの結合抑制剤。

## 【化1】



## 【化2】



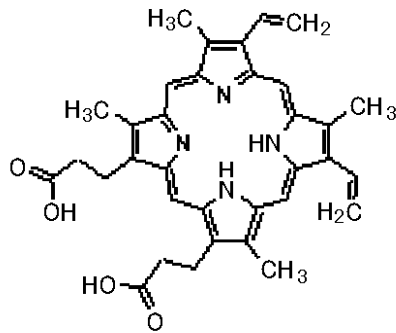
10

20

30

40

## 【化 3】



式 (III)

10

## 【発明の効果】

## 【0011】

本発明において、アミロイドペプチドはRAGEとAGEの結合親和性を増強しうることが確認された。アミロイドペプチドは、背景技術の欄でも示したように、アルツハイマー病の危険因子と考えられている。本発明により、アミロイドペプチドの新規活性（新規機能）が確認された。本発明のスクリーニング方法により得られたRAGEとAGEの結合抑制剤は、アミロイドペプチドが関わるRAGEとAGEの結合により生じるあらゆる疾患や症状の治療剤として使用することができる。とりわけ、新規メカニズムに着目したアルツハイマー病治療薬の開発に貢献しうる。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0012】

【図1】現在開発中のアルツハイマー病治療薬の作用機序を示す図である。

【図2】AGEの説明図である。

【図3】BIACORE™を用いたRAGE-リガンド結合解析の模式図である。（参考例1）

【図4】マイクロタイタープレートを用いたAGEとRAGEの結合親和性測定の際の試験管内結合実験を説明する図である。（参考例2）

【図5】各種サブタイプのAGEとRAGEの結合親和性測定結果を示す図である。（参考例2）

【図6】アミロイドペプチド（A 1-40）とその代謝後のペプチド（PyrA 3-42）の構造を示す図である。配列番号1は、アミロイドペプチド（A 1-42）を示すが、本実施例では1-40部分のペプチド（A 1-40）を用いた。（実施例1）

30

【図7】アミロイドペプチド（A 1-40）、代謝後のペプチド（PyrA 3-42）等を含む系でのAGEとRAGEの結合親和性測定結果を示す図である。（実施例1）

【図8】本発明のスクリーニング方法により得られた化合物A～Cによる、AGEとRAGEの結合抑制作用を示す図である。（実施例2）

## 【発明を実施するための形態】

## 【0013】

本発明は、RAGE（Receptor for advanced glycation endproducts）、AGE（advanced glycation endproducts）及びアミロイドペプチドを含む検査系において、RAGEとAGEの結合を抑制しうる候補物質を選別することによる、RAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法に関する。本発明において、RAGEとAGEの結合を抑制しうるとは、アミロイドペプチドにより増強合されるRAGEとAGEの結合親和性を、阻害又は低減化しうることをいう。本発明のスクリーニング方法では、候補物質及びアミロイドペプチドを含む系でRAGEとAGEの結合親和性を測定し、アミロイドペプチドのみをRAGEに加えた場合のRAGEとAGEの結合親和性を比較することにより、候補物質からRAGEとAGEの結合抑制剤を選別することができる。

40

## 【0014】

RAGEとAGEの結合親和性は、自体公知の方法により測定することができ、例えば表面プラズモン共鳴法によるBIACORE™システム（GEヘルスケアジャパン株式会社）を用いて測

50

定することができる。しかしながら、BIACORE™システムのような装置がなくとも、例えば非特許文献4に記載の方法により簡便にRAGEとAGEの結合親和性を測定することができる。

【0015】

具体的には、以下の工程を含む方法によりRAGEとAGEの結合親和性を測定することができる。

- A) AGE化蛋白質を固定した固相を準備する工程；
- B) 可溶性RAGE (sRAGE) を固相に加える工程；
- C) 固相に固定したAGE化蛋白質に結合したsRAGEの量を測定する工程。

上記A)の工程では例えば、マイクロタイタープレート等の各ウェル(固相)に、各濃度のAGE化蛋白質を固定することができる。B)の工程では、一定量のsRAGEを加え、各濃度のAGE化蛋白質とsRAGEを一定時間反応させる。使用されるsRAGEには、何らかのマーカ物質が付加されていることが好ましい。マーカ物質の例として、His tagやFLAG tagのようなペプチドタグや、何らかの標識物質、例えばフルオレセイン、FITCのような蛍光標識、ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼのような酵素標識、フェロセン又はその誘導体、キノン又はその誘導体、コバルト化合物等の標識物質を例示することができる。C)の工程では、固相に固定された標識物質を計測することで、AGE化蛋白質に結合したsRAGEの量を測定することができ、その結果、AGEとRAGEの結合親和性を測定することができる。

【0016】

本発明のスクリーニングは、上記RAGEとAGEの結合親和性の測定系に、アミロイドペプチドや候補物質を加えて結合親和性を比較する系、例えば、以下の工程を含む方法により行うことができる。

- 1) AGE化蛋白質を固定した固相を準備する工程；
- 2) 候補物質を固相に加える工程；
- 3) アミロイドペプチドを固相に加える工程；
- 4) sRAGEを固相に加える工程；
- 5) 上記4)の工程の後、固相に固定したAGE化蛋白質に結合したsRAGEの量を測定してRAGEとAGEの結合親和性を測定し、RAGEとAGEの結合を抑制しうる候補物質を選別する工程。

【0017】

本発明のスクリーニング方法では、上記において、2)及び3)の工程は、いずれが先であって、同時であってもよく、特に限定されない。また、2)~4)の工程を同時に行ってもよい。各物質を固相に加える場合には、適宜必要な溶解液に溶解して、固相上に加えることができる。

【0018】

本発明のスクリーニング方法では、上記において、候補物質とアミロイドペプチドを反応させた後、RAGEとAGEの結合親和性を測定するのであれば、候補物質とアミロイドペプチドの反応は、固相上で行っても良いし、別途別の容器内で反応させた後の溶液を固相に加えても良い。さらに、候補物質、アミロイドペプチドとsRAGEを、別の容器内で反応させた後の溶液を固相に加えても良い。

【0019】

本発明のスクリーニング方法に使用されるAGE化蛋白質としては、メイラード反応の後期段階反応に見られる3つの特徴的な現象(蛍光性、褐色変化、及び分子内/分子間架橋形成)の少なくとも1つを伴う反応生成物が付加した蛋白質であればよい。かかるAGE化された蛋白質の種類としては特に限定はされないが、例えば、血中濃度の高いアルブミン、寿命の長いヘモグロビン、沈着アミロイドの主要成分である2マイクログロブリン(2M)、動脈硬化の発症と関連の深い低密度リポ蛋白質(LDL)や高密度リポ蛋白質(HDL)等が挙げられる。本発明では、入手の容易さを考慮して、AGE化アルブミンが特に好適である。本発明のスクリーニング方法では、AGE化蛋白質とRAGEの結合親和性を定量的に測定することが必要であるため、固相に固定するAGE化蛋白質の濃度は、段階的希釈系列

10

20

30

40

50

により適宜決定することができる。

【0020】

本発明のスクリーニング方法に使用される アミロイドペプチドは、 アミロイドペプチド(A 1-42) (配列番号1) 又は配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるペプチドのうち、C末端側のアミノ酸が1~2個程度欠失又は付加されたペプチドである。本発明のスクリーニング方法で使用可能な アミロイドペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、N末端側のグルタミン酸がピログルタミル化されていない配列であることを要する。上記配列のペプチドが、AGEとRAGEの結合親和性を増強する効果を有することを、本発明により初めて見出したからである。一方、N末端側のグルタミン酸がピログルタミル化されている配列からなるペプチドは、いわゆるA 1-42より代謝されたペプチドであるが、そのような代謝ペプチドを、AGEとRAGEの測定系に加えても、結合親和性の増強が認められないことが、本発明において確認された(図7参照)。

10

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (配列番号1)

【0021】

AGEのサブタイプとしては、AGE1、AGE2、AGE3、AGE4及びAGE5などが公知である(非特許文献4参照)。本発明のスクリーニング方法に使用されるAGEのサブタイプとしては、AGE2、AGE3、AGE4及びAGE5から選択される1種であればよく、さらに2種以上のサブタイプを含むものであってもよい。RAGEと結合性の高いAGEのサブタイプは、AGE2、AGE3、AGE4及びAGE5であり、なかでも特にAGE2及びAGE3が、RAGEとの結合親和性が高いことが、本発明において確認されている。さらに、上述の アミロイドペプチドを加えた系では、AGE2、AGE3、AGE4及びAGE5のいずれのサブタイプのAGEであってもRAGEとの結合親和性が増強することが確認された(図7参照)。

20

【0022】

本発明のスクリーニング方法に使用されるRAGEは、可溶化されたRAGE(sRAGE)を用いるのが好適である。生体内では、RAGEポリペプチドには膜結合型のものと可溶型のものが存在する。膜結合型RAGEにAGEが結合すると、マクロファージ、血管内皮細胞、神経細胞ミクログリア、血管平滑筋、血小板などにおいて、活性酸素種の産生を経て転写因子NF Bの活性化等を引き起こし、炎症反応誘導、アポトーシスや各種障害が生じると考えられている。本発明のスクリーニング方法で用いられるsRAGEは、測定系の形態により便宜上可溶化したものであるが、生体内に存在する膜結合型RAGEとAGEの結合親和性を低減化する物質をスクリーニングすることを意図して用いられるものである。

30

【0023】

本発明のスクリーニング方法では、RAGEとAGEに アミロイドペプチドを加えた系でのRAGEとAGEの結合親和性を100とした場合に、さらに候補物質を加えた系でのRAGEとAGEの結合親和性が100より低い値を示す場合に、当該候補物質をRAGEとAGEの結合抑制剤として選別することができる。

【0024】

また、本発明のスクリーニング方法を実施するための測定系において、使用されるRAGEには、何らかのマーカ物質が付加されていることが好ましい。マーカ物質の例として、His tagやFLAG tagのようなペプチドタグや、何らかの標識物質、例えばフルオレセイン、FITCのような蛍光標識、ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼのような酵素標識、フェロセン又はその誘導体、キノン又はその誘導体、コバルト化合物等の標識物質を例示することができる。固相に固定した各種濃度のAGE化蛋白質に結合したRAGEを検出することで、AGEとRAGEの結合親和性を測定することができるが、上記マーカ物質を検出することで、AGEに結合したRAGEを検出することができる。上記マーカ物質の検出は、例えば発光度や吸光度を測定することにより、行うことができる。

40

【0025】

本発明のスクリーニング方法では、 アミロイドペプチドによるRAGEとAGEの結合親和性の増強作用を抑制するRAGEとAGEの結合抑制剤をスクリーニングすることを目的と

50



される。ここにおいて、本発明のRAGEとAGEの結合抑制剤は、アミロイドペプチドの作用によりRAGEとAGEの結合が増強し、その結果生じる疾患や症状に対して、有効に作用するものと考えられる。したがって、本発明のスクリーニング方法により選別されるRAGEとAGEの結合抑制剤は、アルツハイマー病治療薬、糖尿病合併症治療薬（例えば糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性ニューロパシー、末梢神経障害）、動脈硬化治療薬の他、悪性腫瘍、神経変成疾患、炎症性疾患等の疾患治療薬としても使用することができる。

【0026】

本発明は、RAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング用キットにも及ぶ。当該スクリーニング用キットには、固相、AGE化蛋白質、アミロイドペプチド、及びsRAGEを少なくとも構成として含む。AGE化蛋白質は、予め固相に固定していてもよいし、必要に応じて濃度を選択できるように、用時に固定してもよい。

10

【0027】

本発明のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング用キットに用いられる固相の材料としては、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル、ポリアミド、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート及びニトロセルロースなどの有機材料、ガラス及びシリカなどの無機材料、並びに、金、銀及び銅などの金属材料などが挙げられる。これらの中でも成形加工性が容易である点から、有機材料が好ましく、さらに好ましくは、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル及びポリアミドであるが、これに限定されるものではない。また、固相としてはマイクロプレートやビーズのような形状とすることができる。たとえば、96ウェルのマルチタイタープレートを用いることにより、ハイスループットにスクリーニングを行うことができる。

20

【0028】

当該スクリーニング用キットには、AGE化蛋白質、アミロイドペプチド、及び/又はsRAGEなどの物質を水溶液に溶かした溶液を、試薬として含めることもできる。また、前記各物質を適当な溶液、例えば緩衝液、生理食塩液若しくは注射用蒸留水等を用いて用時溶解して用いることができる。当該スクリーニング用キットには、緩衝液、生理食塩液若しくは注射用蒸留水等の溶解液や希釈用溶液を適宜構成として含めることができる。

【0029】

本発明は、本発明のRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法により選別されるRAGEとAGEの結合抑制剤にも及ぶ。

30

【実施例】

【0030】

本発明の理解を助けるために、本発明を実施するまでの予備検討結果を参考例として示し、さらに実施例を示して具体的に本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものでないことはいうまでもない。

【0031】

(参考例1) 表面プラズモン共鳴法によるRAGE-リガンド結合解析

本参考例では、RAGEのリガンドとして公知のAGE2/3、HMGB1 (High mobility group box 1) 及びアミロイドペプチドの3種について、sRAGEとの結合能を解析した。解析には、表面プラズモン共鳴法によりBIAcore™(GEヘルスケアジャパン株式会社)を用いた。

40

【0032】

1) 材料について

(a) sRAGEの作製方法

本実施例では、ヒト1回膜貫通型受容体であるRAGE (Accession No. NM\_001136.3) のうち、細胞外領域のみで構成されるsRAGE (RAGEを構成するアミノ酸のうち23番-331番アミノ酸残基を有する蛋白質) を作製するために、細胞外領域をコードする遺伝子のみを増幅するプライマーを設計し、Cap Site cDNA dt (human liver由来)cDNAライブラリー(Nippon gene社)を鋳型にPCR反応を行い、sRAGE DNAを増幅した。当該増幅したsRAGE DNAとpASK-IBA32 vector(C末端にHis tagを付加)(IBA社)をライゲーションし、pASK-IBA32-sRAGE発現プラスミドを構築した。発現プラスミドを大腸菌株BL21(DE3)に形質転換し、テト

50

ラサイクリン誘導によりHis-sRAGE蛋白質を発現させた。発現誘導した大腸菌の破碎上清よりNi-NTAアガロースを用いて精製を行い、His tagged recombinant human sRAGE蛋白質溶液を得た。

【 0 0 3 3 】

(b) HMGB1の作製方法

HMGB1 (Accession No. NM\_002128.4) をコードする遺伝子の特異的に増幅するプライマーを設計し、Cap Site cDNA dt (human liver由来)cDNAライブラリー(Nippon gene社)を鋳型にPCR反応を行い、HMGB1 DNAを増幅した。増幅したHMGB1 DNAをpFastBac HTA vector (N末端にHis tagを付加) (Invitrogen社) とライゲーションし、pFastBac HTA-HMGB1プラスミドを構築した。Bac-to-Bac<sup>(R)</sup> Baculovirus Expression System (Invitrogen社) を用いてHMGB1発現用バクミドを構築し、SF9昆虫細胞にトランスフェクションを行い、HMGB1発現バキュロウイルスを得た。このウイルスをさらにSF9昆虫細胞に感染させ、72時間後に感染SF9細胞破碎上清よりNi-NTAアガロースを用いて精製を行い、His tagged recombinant human HMGB1蛋白質溶液を得た。

10

【 0 0 3 4 】

(c) AGE2及びAGE3のAGE化蛋白質の作製方法

BSAを50 mg/mlの濃度になるよう0.2 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。BSA溶液10 mlに、各10 mlのAGE溶液 (AGE2は0.2 M D-glyceraldehyde、AGE3は0.2 M D-glycoaldehydeに溶解したものを) を加え、それぞれをフィルターにより滅菌した。37 °Cで7日間静置し、反応終了後、それぞれを透析膜に入れ、500 mlのPBSに対して4 °Cで4回透析し、各サブタイプ(AGE2/3)のAGE化蛋白質 (AGE化ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin: BSA)) を得た。

20

【 0 0 3 5 】

2) 表面プラズモン共鳴法

BIACORE<sup>TM</sup> Sensor chip CM5 (GEヘルスケアジャパン株式会社) に、アミノカップリング法を用いて上述のsRAGEを固定化した。各リガンド物質をBIACORE<sup>TM</sup>のマイクロ流路系にアナライトとして500 µg/mlの濃度で添加した。その結果、AGE2/3では非常に高い結合親和性を示し、HMGB1では高い結合親和性を示したが、アミロイドペプチドについては低い結合親和性であった (図3参照)。

30

【 0 0 3 6 】

(参考例2) マイクロタイタープレートを用いたAGE-BSAとRAGEの結合実験

本参考例では、AGEとsRAGEの結合能を、マイクロタイタープレートを用いて測定した。AGEには、産生経路により複数のサブタイプがある (非特許文献4参照)。本参考例では、AGE1、AGE2、AGE3、AGE4、及びAGE5について、RAGEとの結合能を確認した。各AGE化蛋白質は、ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin: BSA)に付加し、AGE化BSAとした。本参考例において、sRAGEは、参考例1の手法に従って作製した。

【 0 0 3 7 】

1) 各サブタイプ(AGE1-AGE5)のAGE化蛋白質(AGE化BSA)の作製方法

BSAを50 mg/mlの濃度になるよう0.2 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。BSA溶液10 mlに、各10 mlのAGE溶液 (AGE1は1 M グルコース液、AGE2は0.2 M D-glyceraldehyde、AGE3は0.2 M D-glycoaldehyde、AGE4は0.2 M methylglyoxal、AGE5は0.2 M glyoxal (0.2 Mリン酸緩衝液、pH 7.4) に溶解したものを) を加え、それぞれをフィルターにより滅菌した。AGE1は37 °Cで8週間、AGE2~5は7日間静置した。反応終了後、それぞれを透析膜に入れ、500 mlのPBSに対して4 °Cで4回透析し、各サブタイプ(AGE1-AGE5)のAGE化BSAを得た。

40

【 0 0 3 8 】

2) AGEとsRAGEの結合親和性測定方法

96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに、各種AGE(AGE化BSA)溶液(0.05 ml)を0.3125~20 µg/ml濃度で加え、4 °C、16時間インキュベートした。洗浄液 (0.05% Tween20を含む10 mM Tris緩衝生理食塩水、pH 7.5) (0.2 ml)で3回洗浄後、10% BSA (0.1 ml)で

50

4、16時間インキュベートし、ブロッキングを行った。3回洗浄後、ペプチド試料ならびにHis tagを付加したsRAGEを2.7 µg/ml含む10 mM Tris緩衝生理食塩水(0.05 ml)をさらに加え、4で16時間インキュベートした。3回洗浄後、Ni-NTA-HRP(自家調製)(0.05 ml)を加え、室温にて1時間反応させた。その後、0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及び2.5 mM 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid Ammonium Salt)(東京化成工業)(0.05 ml)を含む0.1 Mクエン酸緩衝液(pH 4.0)を反応させ、405 nmの吸光度を測定した。

【0039】

上記の結果、AGE1についてはsRAGEとの結合親和性はほとんど認められなかったが、AGE2及びAGE3については強い結合親和性を認めた。AGE4及びAGE5については、AGE2及びAGE3に比べてやや弱いものの、結合親和性を認めた。

10

【0040】

(実施例1) アミロイドペプチドのRAGEとAGEの結合親和性に及ぼす影響

本実施例では、アミロイドペプチドのRAGEとAGEの結合親和性に及ぼす影響を確認した。アミロイドペプチドとしてのアミロイド1(A 1-40)(配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、1-40の部分)と、その代謝ペプチドであるアミロイド2(Pyra 3-42:配列番号2)を用いた(図6参照)。比較対照のため、陰性コントロールとしてTris緩衝液(Tris-Buffered Saline:TBS)、他のリガンドとして全長HMGB1、他の蛋白質として、マクロファージ遊走阻止因子(macrophage migration inhibitory factor:MIF)についても同様の測定を行った。

20

【0041】

1)材料について

アミロイド1(A 1-40)及びアミロイド2(Pyra 3-42)は、(株)ペプチド研究所(箕面市)から購入した。対照としてのHMGB1は、参考例1の1)(b)に記載の方法で作製したものを、MIFについてはウシ脳より精製(Nishibori et al., Japanese Journal of Pharmacology, 1996 Jul;71(3):259-62.)したものを、MIFを用いた。

【0042】

2)測定方法について

参考例2の測定方法において、アミロイド1及び2(各々265 µg/ml)、全長HMGB1(50 µg/ml)、MIF(24 µg/ml)を加えたのち、His tagを付加したsRAGEを2.7 µg/ml含む10 mM Tris緩衝液をさらに加え、4で16時間インキュベートし、その他の方法は同手法により行った。

30

【0043】

上記の結果、アミロイド1は、RAGEとAGEの結合親和性を強固に増強しうることが確認された。また、その効果に関してはAGEのサブタイプ(AGE2、AGE3、AGE4、及びAGE5)において、ほとんど差を認めなかった。一方、RAGEのリガンドであるHMGB1ホールは、緩衝液(TBS)の場合よりも低い値を示し、RAGEとAGEの結合親和性を抑制する作用を有すると考えられた。また、アミロイド1の代謝ペプチドであるアミロイド2及び他の蛋白質であるMIFについては、緩衝液(TBS)の場合とほぼ同様の値を示し、AGEのサブタイプについて、AGE2及びAGE3ではやや高く、AGE4及びAGE5でやや低い結合親和性を示す傾向についても同様であった。

40

【0044】

(実施例2) sRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング

本実施例では、以下のa)~e)の工程を含む方法により、sRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニングを行った。

- a) AGE化蛋白質を固定した固相を準備する工程；
- b) 候補物質を含む溶液を固相に加える工程；
- c) アミロイドペプチドを含む溶液を固相に加える工程；
- d) sRAGEを含む溶液を固相に加える工程；
- e) 上記d)の工程の後、固相に固定したAGE化蛋白質に結合したsRAGEの量を測定してRAGEとAGEの結合親和性を測定し、RAGEとAGEの結合を抑制しうる候補物質を選別した。

50

候補物質は、化合物ライブラリーより選択した。 -アミロイドペプチドとして、アミロイド 1 (A 1-40) を用いた。AGEとしてAGE2を用いた。

【 0 0 4 5 】

1) 材料について

以下の測定系で測定した。

- (1) BSA + sRAGE
- (2) AGE2 + sRAGE
- (3) AGE2 + sRAGE + DMSO
- (4) AGE2 + sRAGE + DMSO + アミロイド 1 (A 1-40)
- (5) AGE2 + sRAGE + DMSO + アミロイド 1 (A 1-40) + 化合物 A
- (6) AGE2 + sRAGE + DMSO + アミロイド 1 (A 1-40) + 化合物 B
- (7) AGE2 + sRAGE + DMSO + アミロイド 1 (A 1-40) + 化合物 C

10

sRAGE及びAGE2は、参考例 1 に従い調製したものをを用いた。アミロイド 1 (A 1-40) は実施例 1 と同様に (株) ペプチド研究所 (箕面市) から購入した。AGEとsRAGEの結合親和性測定方法は、参考例 2 に従った。

【 0 0 4 6 】

2) 測定方法について

参考例 2 の測定方法において、アミロイド 1 (各々270 µg/ml)、各化合物 (10 µM) を加えたのち、His tagを付加したsRAGEを27mg/ml含む10 mM Tris緩衝液をさらに加え、4

20

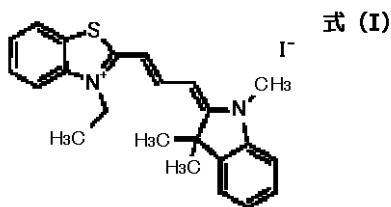
【 0 0 4 7 】

3) 結果

上記の結果、候補化合物のうち、以下の化合物 A ~ C は、RAGEとAGEの結合を抑制しうることが確認された (図 8)。これにより、本発明の方法によると、RAGEとAGEの結合抑制剤をスクリーニングしうることが確認された。本発明のスクリーニング方法により選別された化合物 A は以下の式(I)で示す構造式からなり、2-[3-(1,3-Dihydro-1,3,3-trimethyl-2H-indol-2-ylidene)-1-propenyl]-3-ethyl-benzothiazolium iodideともいう。化合物 B は、3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavone 3-O-β-L-rhamnopyranosideであり、以下の式(II)で示す構造式からなり、別名 Myricetinともいう。化合物 C は、以下の式(III)で示す構造式からなり、protoporphyrin IXともいう。

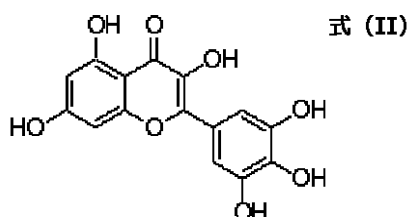
30

【化 1】



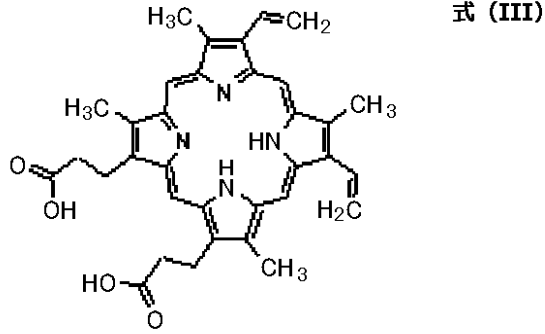
40

【化 2】



50

【化3】



【産業上の利用可能性】

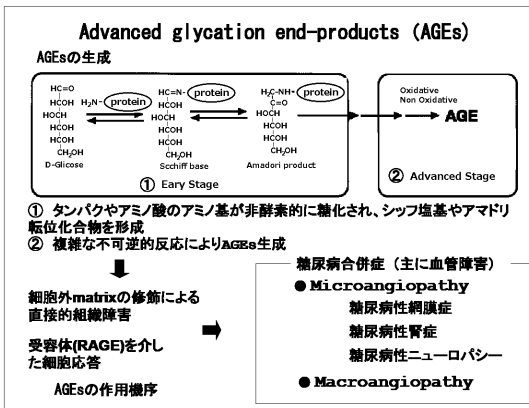
【0048】

以上詳述したように、アミロイドペプチドはRAGEとAGEの結合親和性を増強しうることが確認された。アミロイドペプチドは、背景技術の欄でも示したように、アルツハイマー病の危険因子と考えられている。本発明により、アミロイドペプチドの新規活性（新規機能）が確認されたことで、アミロイドペプチドによって増強されたRAGEとAGEの結合親和性を抑制しうる物質、すなわちRAGEとAGEの結合抑制剤をスクリーニングすることができる。本発明のスクリーニング方法により得られた結合抑制剤は、アミロイドペプチドが関わるRAGEとAGEの結合により生じるあらゆる疾患や症状の治療剤として使用することができる。とりわけ、新規メカニズムに着目したアルツハイマー病治療薬の開発に貢献しうる。

10

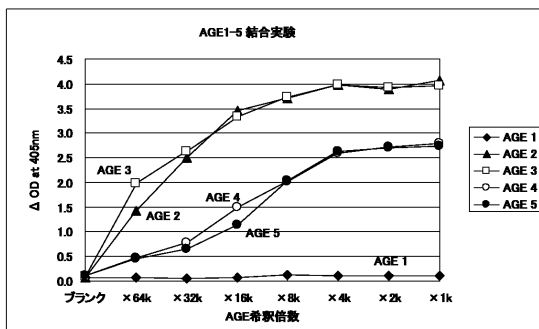
20

【図2】

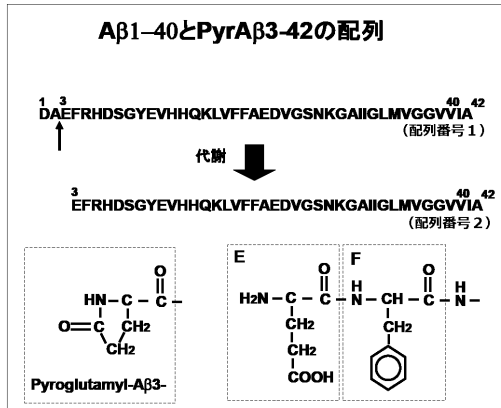


【図5】

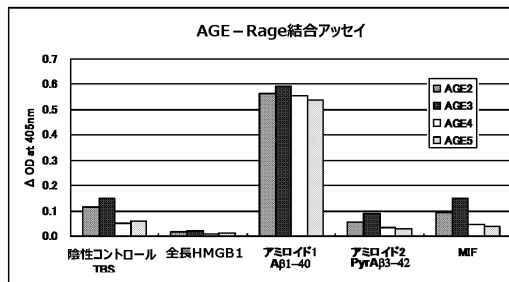
試験管内 sRAGE-AGE 結合実験系



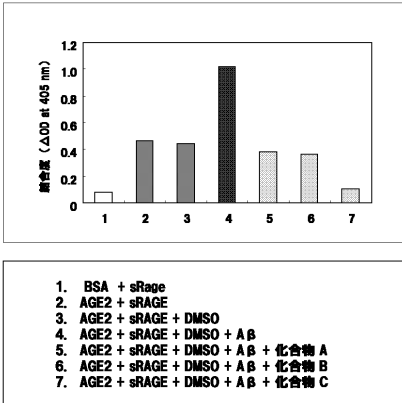
【図6】



【図7】

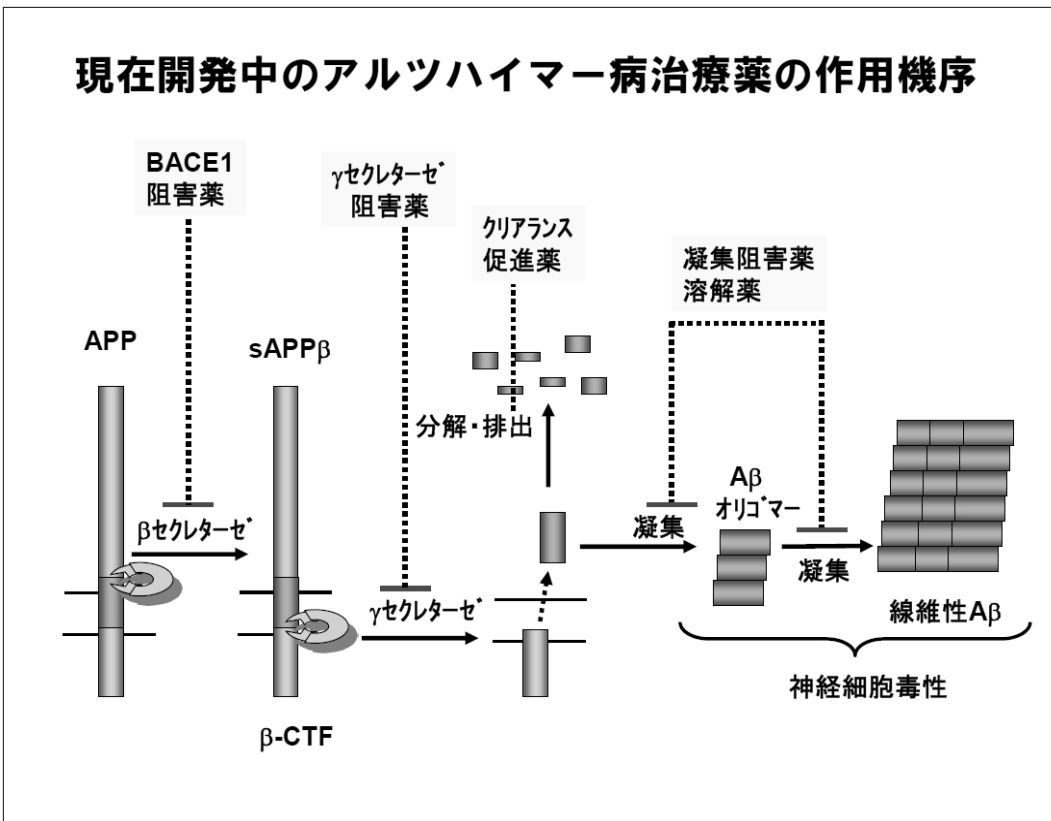


【 図 8 】



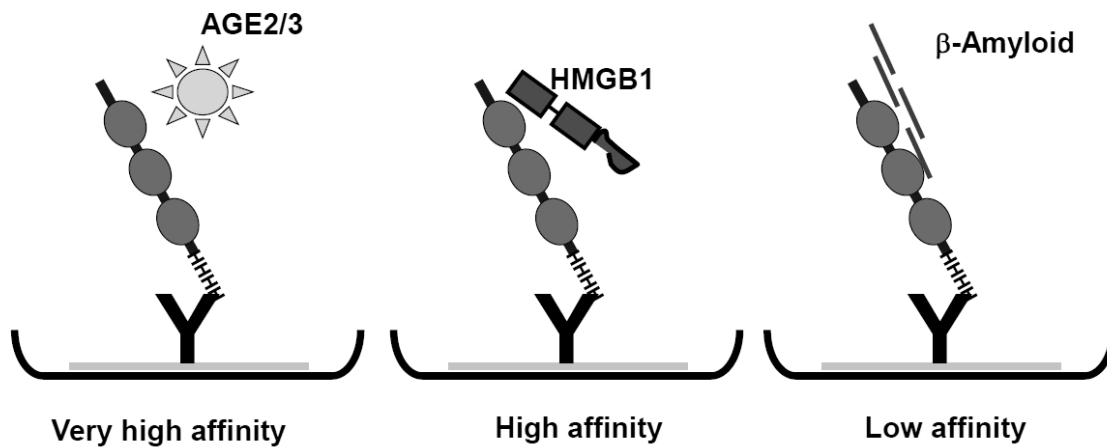
(Aβ濃度: 0.27mg/mL, 化合物濃度: 10μM)

【 図 1 】



【 図 3 】

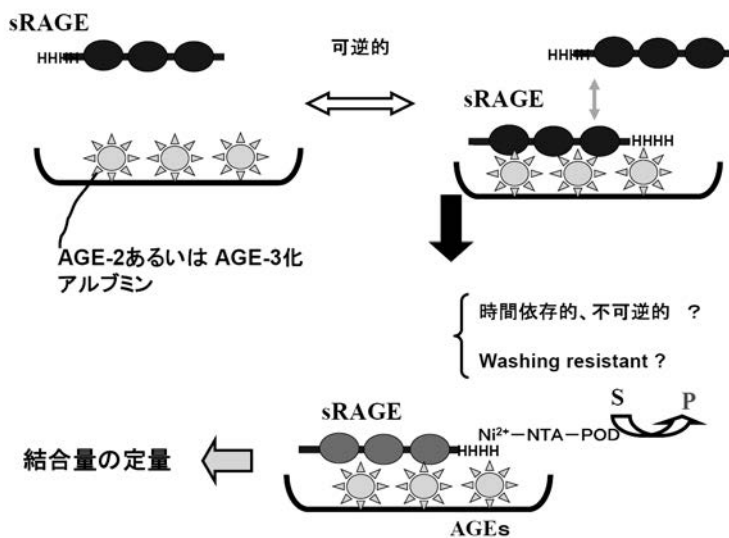
### Biacore を用いたRAGE-Ligand 結合解析



- 表面プラズモン共鳴法で、RAGEの個々のリガンドとの結合が測定され、それぞれの親和性が求められた。

【 図 4 】

### マイクロタイタープレートを用いた試験管内結合実験の概要



【 配列表 】

2012039469000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成24年7月19日(2012.7.19)

【 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】**

RAGE (Receptor for advanced glycation end products)、AGE (advanced glycation end products) 及び アミロイドペプチドを含む検査系において、RAGEとAGEの結合を抑制する候補物質を選別することによるRAGEとAGEの結合抑制剤のスクリーニング方法。

**【請求項 2】**

以下の工程を含む、請求項 1 に記載の RAGE と AGE の結合抑制剤のスクリーニング方法：

- 1) AGE 化蛋白質を固定した固相を準備する工程；
- 2) 候補物質を含む溶液を固相に加える工程；
- 3) アミロイドペプチドを含む溶液を固相に加える工程；
- 4) sRAGE を含む溶液を固相に加える工程；
- 5) 上記 4) の工程の後、固相に固定した AGE 化蛋白質に結合した sRAGE の量を測定して RAGE と AGE の結合親和性を測定し、RAGE と AGE の結合を抑制する候補物質を選別する工程。

**【請求項 3】**

候補物質と アミロイドペプチドを反応させた後、RAGE と AGE の結合親和性を測定することを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の RAGE と AGE の結合抑制剤のスクリーニング方法。

**【請求項 4】**

アミロイドペプチドが、以下の配列番号 1 に示すアミノ酸配列、又は配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち C 末端側のアミノ酸が 1 ~ 2 個欠失又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の RAGE と AGE の結合抑制剤のスクリーニング方法：

**DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (配列番号 1)**

**【請求項 5】**

AGE のサブタイプが、AGE 2、AGE 3、AGE 4 及び AGE 5 より選択されるいずれか 1 種又は 2 種以上である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 に記載の RAGE と AGE の結合抑制剤のスクリーニング方法。

**【請求項 6】**

RAGE と AGE の結合抑制剤が、アルツハイマー病治療薬、糖尿病合併症治療薬、動脈硬化治療薬のいずれかである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 に記載の RAGE と AGE の結合抑制剤のスクリーニング方法。

**【請求項 7】**

固相、AGE 化蛋白質、アミロイドペプチド、及び sRAGE を構成として含む、RAGE と AGE の結合抑制剤のスクリーニング用キット。

**【請求項 8】**

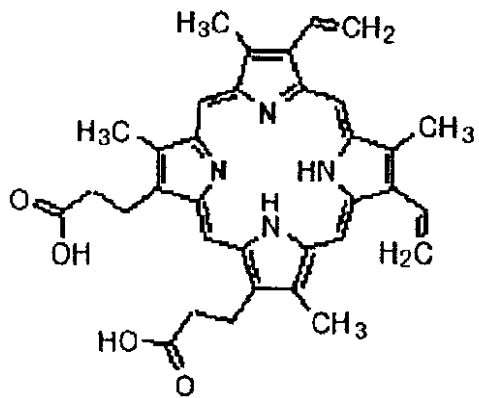
請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 に記載の RAGE と AGE の結合抑制剤のスクリーニング方法により選別される RAGE と AGE の結合抑制剤。

**【請求項 9】**

選別される RAGE と AGE の結合抑制剤が、以下の式 ( I I I ) で示す化合物である、請求項 8 に記載の RAGE と AGE の結合抑制剤。



【化 3】

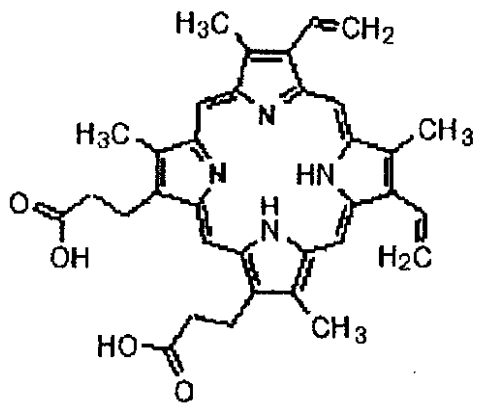


式 (III)

【請求項 10】

以下の式 (III) で示す化合物からなる、アルツハイマー病治療薬。

【化 3】



式 (III)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/071669

|  |  |  |
|--|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>G01N33/566(2006.01)i, A61K31/366(2006.01)i, A61K31/409(2006.01)i,<br>A61K31/428(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, G01N33/15<br>(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i<br>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)<br>G01N33/566, A61K31/366, A61K31/409, A61K31/428, A61P25/28, C07K14/47,<br>G01N33/15, G01N33/50   |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011<br>Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011  |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>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/A  | YAN, S.D. et al., RAGE and amyloid- $\beta$ peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease., Nature (Lond), 1996, Vol.382, No.6593, p.685-691, Summary, Introduction, FIG.2d-f | 1-3, 6, 7/4, 5/8, 9  |
| Y/A  | JP 2007-127592 A (Tohoku University), 24 May 2007 (24.05.2007), paragraph [0011] (Family: none)  | 4/1-3, 5-9   |
| <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   | "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  |
| "E"  | earlier application or patent but published on or after the international filing date  | "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   |
| "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)          | "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 |
| "O"  | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means   | "&" document member of the same patent family  |
| "P"  | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>13 December, 2011 (13.12.11)  | Date of mailing of the international search report<br>27 December, 2011 (27.12.11)   |  |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office   | Authorized officer   |  |
| Facsimile No.  | Telephone No.  |  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/071669

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|---|---|-----------------------|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| Y/A   | AHMED N. et al., Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin., Biochem. J., 2002, Vol.364 (Pt 1), p.1-14, Figure 1d | 5/1-4, 6-9            |
| X/A   | ONO, K. et al., Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease., J. Neurochem., 2003, Vol.87, No.1, p.172-181, entire text, all drawings   | 8, 9/1-7              |
| A   | Jun TASHIRO, Seiji KIKUCHI, "AGEs-HMGB1/RAGE System no Shin Tenkai 5)Alzheimer-byo ni Okeru AGEs/RAGE System no Kan'yo", Vascular Biology & Medicine, 2005, vol.6, no.5, pages 503 to 508   | 1-9                   |
| A   | TAKUMA Kazuhiro et al., RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid- $\beta$ and neuronal dysfunction, Proc Natl Acad Sci USA, 2009, Vol.106 No.47, Page.20021-20026  | 1-9                   |
| A   | ANKELE, E. et al, In Vivo Visualization of Mg-ProtoporphyrinIX, a Coordinator of Photosynthetic Gene Expression in the Nucleus and the Chloroplast., Plant Cell, 2007, Vol.19, No.6, p.1964-1979  | 8, 9                  |
| A   | JP 2007-246520 A (Yuichiro TAKEDA, Yuji KOBAYASHI),<br>27 September 2007 (27.09.2007),<br>(Family: none)  | 8, 9                  |
| A   | JP 2003-230382 A (President of Kanazawa University),<br>19 August 2003 (19.08.2003),<br>(Family: none)  | 8, 9                  |
| A   | JP 2009-524680 A (University of Rochester),<br>02 July 2009 (02.07.2009),<br>& US 2011/0039908 A1 & EP 1993527 A<br>& WO 2007/089616 A2 & CA 2640569 A  | 8, 9                  |

| 国際調査報告  |  | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 1 6 6 9  |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
|---|--|---|---------------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))<br>Int.Cl. G01N33/566(2006.01)i, A61K31/366(2006.01)i, A61K31/409(2006.01)i, A61K31/428(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i   |  |   |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))<br>Int.Cl. G01N33/566, A61K31/366, A61K31/409, A61K31/428, A61P25/28, C07K14/47, G01N33/15, G01N33/50   |  |   |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 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<br><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>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011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 | 1971-2011年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2011年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2011年 |
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年   |   |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 日本国公開実用新案公報   | 1971-2011年   |   |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 日本国実用新案登録公報   | 1996-2011年   |   |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 日本国登録実用新案公報   | 1994-2011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)<br>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)  |  |   |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| C. 関連すると認められる文献   |  |   |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号  |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| X/Y<br>/A   | YAN, S.D. et al., RAGE and amyloid- $\beta$ peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease., Nature (Lond), 1996, Vol.382, No.6593, p.685-691, Summary, Introduction, FIG.2d-f 等 | 1-3, 6, 7/4, 5<br>/8, 9   |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| Y/A   | JP 2007-127592 A (国立大学法人東北大学) 2007.05.24, 【0011】 (ファミリーなし)   | 4/1-3, 5-9  |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| <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。   |  |   |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「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<br>「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<br>「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)<br>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願  |  | の日後に公表された文献<br>「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<br>「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<br>「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<br>「&」同一パテントファミリー文献 |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 国際調査を完了した日<br>13.12.2011  |  | 国際調査報告の発送日<br>27.12.2011  |               |           |            |             |            |             |            |             |            |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>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)<br>白形 由美子  | 2 J   3 4 9 6 |           |            |             |            |             |            |             |            |
|   |  | 電話番号 03-3581-1101   | 内線 3252       |           |            |             |            |             |            |             |            |

| 国際調査報告                |  | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 1 6 6 9 |
|-----------------------|--|--------------------------------------|
| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                                      |
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号                       |
| Y/A                   | AHMED N. et al., Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin., Biochem. J., 2002, Vol.364(Pt 1), p.1-14, Figure 1d 等 | 5/1-4, 6-9                           |
| X/A                   | ONO, K. et al., Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease., J. Neurochem., 2003, Vol. 87, No. 1, p. 172-181, 全文全図  | 8, 9/1-7                             |
| A                     | 田代淳, 菊地誠志, AGEs-HMGB1/RAGE システムの新展開 5)アルツハイマー病におけるAGEs/RAGE システムの関与, 血管医学, 2005, Vol. 6 No. 5, Page. 503-508   | 1-9                                  |
| A                     | TAKUMA Kazuhiro et al., RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid- $\beta$ and neuronal dysfunction, Proc Natl Acad Sci USA, 2009, Vol. 106 No. 47, Page. 20021-20026  | 1-9                                  |
| A                     | ANKELE, E. et al, In Vivo Visualization of Mg-Protoporphyrin IX, a Coordinator of Photosynthetic Gene Expression in the Nucleus and the Chloroplast., Plant Cell, 2007, Vol. 19, No. 6, p. 1964-1979   | 8, 9                                 |
| A                     | JP 2007-246520 A (竹田雄一郎、小林祐次) 2007.09.27, (ファミリーなし)  | 8, 9                                 |
| A                     | JP 2003-230382 A (金沢大学長) 2003.08.19, (ファミリーなし)   | 8, 9                                 |
| A                     | JP 2009-524680 A (ザ ユニバーシティ オブ ロチェスター) 2009.07.02, & US 2011/0039908 A1 & EP 1993527 A & WO 2007/089616 A2 & CA 2640569 A  | 8, 9                                 |

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.             | F I            | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| A 6 1 K 31/409 (2006.01) | A 6 1 K 31/409 |             |
| A 6 1 P 25/28 (2006.01)  | A 6 1 P 25/28  |             |
| A 6 1 P 27/02 (2006.01)  | A 6 1 P 27/02  |             |
| A 6 1 P 13/12 (2006.01)  | A 6 1 P 13/12  |             |
| A 6 1 P 25/02 (2006.01)  | A 6 1 P 25/02  |             |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01)  | A 6 1 P 35/00  |             |
| A 6 1 P 29/00 (2006.01)  | A 6 1 P 29/00  |             |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01)   | A 6 1 P 9/10   | 1 0 1       |

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, RO, R S, 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, HU, I D, 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, ZA

(72) 発明者 森 秀治

岡山県岡山市北区鹿田町二丁目 5 番 1 号 国立大学法人岡山大学医学部内

(72) 発明者 高橋 英夫

岡山県岡山市北区鹿田町二丁目 5 番 1 号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

(72) 発明者 和氣 秀徳

岡山県岡山市北区鹿田町二丁目 5 番 1 号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

(72) 発明者 劉 克約

岡山県岡山市北区鹿田町二丁目 5 番 1 号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

F ターム (参考) 2G045 DA36 FA13

4C086 AA01 AA02 CB04 GA01 MA01 MA04 NA14 ZA15 ZA16 ZA20

ZA33 ZA45 ZA81 ZB11 ZB26

4H045 AA10 AA30 BA19 CA45 EA50 FA74 GA26

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) 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 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 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。