

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 8 月 3 日 (03.08.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/080262 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/300922
- (22) 国際出願日: 2006 年 1 月 17 日 (17.01.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2005-019381 2005 年 1 月 27 日 (27.01.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人久留米大学 (KURUME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町67番地 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井上 浩義 (INOUE, Hiroyoshi) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町67番地 学校法人久留米大学内 Fukuoka (JP). 東元 祐一郎 (HIGASHIMOTO, Yuichiro) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町67番地 学校法人久留米大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 南條 博道 (NANJO, Hiromichi); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番9号 翁ビル5階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: AGE-2 APTAMER

(54) 発明の名称: AGE-2 アプタマー

(57) Abstract: An AGE-2 aptamer which binds to advanced glycation end-product (AGE-2) originating in glyceraldehyde but not to human serum albumin and comprises at least 35 bases and in which the cytosine content in the bases thereof is at least 35% or the guanine content in the bases thereof is at least 32%. This AGE-2 aptamer can be used in detecting AGE-2, which makes it usable as a detecting agent, a diagnostic drug and a preventive/remedy for diseases in which AGE-2 participates, for example, diabetic complications such as diabetic retinopathy, diabetic nephropathy and diabetic neuropathy, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, the proliferation, metastasis and infiltration of malignant tumor, and so on.

(57) 要約: 本発明のAGE-2アプタマーは、グリセルアルデヒド由来終末糖化産物 (AGE-2) に結合するがヒト血清アルブミンには結合せず、少なくとも35塩基からなり、そして該塩基中のシトシン含有率が少なくとも35%であるか、または該塩基中のグアニン含有率が少なくとも32%である。本発明のAGE-2アプタマーは、AGE-2を検出するために使用できるので、AGE-2が関与する疾患、例えば、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害などの糖尿病合併症、アルツハイマー病などの神経変性疾患、悪性腫瘍の増殖、転移、浸潤などの検出薬・診断薬および予防・治療剤として利用され得る。

WO 2006/080262 A1

明 細 書

AGE-2 アプタマー

5 技術分野

本発明は、グリセルアルデヒド由来終末糖化産物（AGE-2）アプタマーに関する。

背景技術

- 10 AGEs（終末糖化産物）は、グルコースなどの還元糖とタンパク質との間の非酵素的糖化反応により生成する構造体の総称である。AGEsは、老化や糖尿病に伴って中枢神経などに蓄積し、あるいは神経・感覚器障害や腎症などの糖尿病による合併症の原因と考えられている。最近では、アルツハイマー病などの神経変性疾患、悪性腫瘍の増殖、転移、浸潤などにも関与す
- 15 ることが明らかになっている。

- AGEsは、グルコースだけではなく、グルコースの自動酸化および分解産物などの種々の糖から生成される。このうち、グリセルアルデヒド由来のAGEであるAGE-2（図1を参照のこと）は、AGEレセプター（RAGE）との結合能力が高く、このRAGEを介して、糖尿病性網膜症や糖尿病性腎症などの糖尿病血管合併症の発症や進展に強く関与していることが知られている（Yamagishi S. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002年, 290巻, 973-978頁およびOkamoto T. ら, FASEB J., 2002年, 16巻, 1928-1930頁）。しかし、その診断法や阻害剤は未だほとんど開発されていない。

- 25 AGEsの測定方法については、これまでに種々検討されている。最も簡単には、AGEsが、黄褐色であり蛍光を発するので、その蛍光を測定する方法がある。しかし、AGEsに対する特異性や感度が低いため、特に生体

試料に対しては適切ではない。特定の構造のAGEsについては、HPLC法、GC/MS法、LC/MS法などを用いて定量することができるが、時間がかかり、例えば、診断におけるような、多数の試料の分析には適していない。

- 5 現在のところ、AGEsのうちで構造が明らかであるカルボキシメチルリジン（CML）を認識する抗体（抗CML抗体）を用いる免疫学的測定方法が主として行われている。しかし、感度が低く、しかも抗体自体が高価である。さらに、CMLが生体内では糖化反応ではなく脂質の過酸化によって生
- 10 じたことから、抗CML抗体を抗AGEs抗体として用いることには問題がある。このように、AGEs全体を認識する抗体は、現在のところ得られていない。

- 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
- 15 し得ることが明らかになっている（Ellington A. D. およびSzostak J. W., Nature, 1990年, 346巻, 818-822頁およびTuerk C. およびGold L., Science, 1990年, 249巻, 505-510頁）。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得られ得る（Tuerk C. ら、前出）。

- 20 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（Kensch O. ら, J. Biol. Chem., 2000年, 275巻, 18271-1827
- 25 8頁）、補体C5に対するRNAアプタマー（Biesecker G. ら, Immunopharm., 1999年, 42巻, 219-230頁）、CMV感染を防止するRNAアプタマー

(Wang J. ら, RNA, 2000年, 6巻, 571-583頁)、老人性黄斑変性症の治療薬として開発中の血管内皮細胞増殖因子に対するRNAアプタマー (Ruckman J. ら, J. Biol. Chem., 1988年, 273巻, 20556-20567頁)、糸球体間質増殖性糸球体腎炎モデルラットに静脈内注射すると症状が緩和される血小板由来増殖因子に対するアプタマー (Floege J. ら, Am. J. Path., 1999年, 154巻, 169-179頁)、ショウジョウバエB52タンパク質の過剰発現による異常を正常に戻すRNAアプタマー (Shi H. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999年, 96巻, 10033-10038頁) などが報告されている。

10 発明の開示

本発明は、AGE-2に特異的に結合し得るアプタマーを提供することを目的とする。

本発明は、グリセルアルデヒド由来終末糖化産物 (AGE-2) に結合するがヒト血清アルブミンには結合しないアプタマーを提供し、該アプタマーが、少なくとも35塩基からなり、そして該塩基中のシトシン含有率が少なくとも35%であるか、または該塩基中のグアニン含有率が少なくとも32%である。

1つの実施態様では、上記アプタマーは、一本鎖DNAである。

他の実施態様では、上記アプタマーは、少なくとも50塩基かつ多くとも120塩基からなる。

さらに他の実施態様では、上記塩基中のシトシン含有率は、少なくとも40%である。

さらに他の実施態様では、上記塩基中のシトシン含有率は、少なくとも50%である。

さらに他の実施態様では、上記塩基中のグアニン含有率は、少なくとも35%である。

さらに他の実施態様では、上記塩基中のグアニン含有率は、少なくとも40%である。

なおさらに他の実施態様では、上記一本鎖DNAは、配列表の配列番号1から24のいずれかに記載の塩基配列を含む。

5 なおさらに他の実施態様では、上記一本鎖DNAは、配列表の配列番号25から41のいずれかに記載の塩基配列を含む。

本発明はまた、上記のいずれかのアプタマーを含む、AGE-2検出試薬を提供する。

10 本発明はさらに、上記のAGE-2検出試薬を含む、AGE-2検出キットを提供する。

本発明はまた、上記のいずれかのアプタマーを含む、AGE-2が関与する疾患の診断試薬を提供する。

本発明はさらに、上記の試薬を含む、AGE-2が関与する疾患の診断用キットを提供する。

15 本発明はまた、上記のいずれかのアプタマーを含む、抗AGE-2剤を提供する。

本発明はまた、上記のいずれかのアプタマーを含む、AGE-2が関与する疾患の予防または治療のための薬剤を提供する。

20 1つの実施態様では、上記AGE-2が関与する疾患は、糖尿病合併症である。

本発明によれば、AGE-2に特異的に結合するAGE-2アプタマーが提供される。このAGE-2アプタマーを用いれば、AGE-2の定性・定量が可能となり、糖尿病合併症、神経変性疾患、悪性腫瘍などの臨床検査薬として利用され得る。また、AGE-2アプタマーは、AGE-2阻害活性を有するので、抗AGE-2剤としても利用され得る。

25

さらに、本発明のAGE-2アプタマーは、化学的に安価に合成すること

ができる。さらに、このアプタマーを修飾することによって安定化させること、あるいはアプタマーに蛍光または発光ドメインを付加して検出効率を上げることも可能である。

5 図面の簡単な説明

図1は、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。

図2は、SELEX法の概要を示す工程図である。

10 図3は、種々の濃度のAGE-2 (A)、ならびに100 μ 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。

図4は、アポトーシス阻害率の算出方法を説明するための図である。

発明を実施するための最良の形態

15 アプタマーとは、上述のように、特定の化合物に特異的に結合し得る一本鎖DNAまたは一本鎖RNAである。本発明においては、この特定の化合物がAGE-2である。すなわち、本発明のAGE-2アプタマーは、AGE-2に結合し、ヒト血清アルブミンには結合しない。一本鎖DNAまたは一本鎖RNAのいずれであってもよい。

20 本発明のAGE-2アプタマーは、少なくとも35塩基からなり、好ましくは少なくとも50塩基かつ多くとも120塩基からなる。34塩基以下の場合は、AGE-2と結合しない。

本発明のAGE-2アプタマーは、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。シトシンが多い場合は、シトシン含有率は少なくとも35%、少なくとも40%あるいは
25 は少なくとも50%であってもよい。グアニンが多い場合は、塩基中のグア

ニン含有率は、少なくとも32%、少なくとも35%あるいは少なくとも40%であってもよい。このような塩基含有率であることにより、アプタマーはAGE-2に結合しやすくなる。

具体的な例としては、配列表の配列番号1から24のいずれかに記載の塩基配列を含む一本鎖DNAが挙げられる。これらの一本鎖DNAは、54～58塩基からなり、塩基中のシトシン含有率は少なくとも35%である。別の具体的な例としては、配列表の配列番号25から41のいずれかに記載の塩基配列を含む一本鎖DNAが挙げられる。これらの一本鎖DNAは、61～66塩基からなり、塩基中のグアニン含有率は少なくとも32%である。

本発明のAGE-2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) 法によって得られ得る。一本鎖DNAをライブラリー源とするSELEX法の概要を図2に基づいて説明する。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、標的物質に特異的に結合する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-2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。

本発明においては、SELEX法における標的物質はAGE-2であり、好ましくはヒト血清アルブミン(HSA)との結合体である。AGE-2は、培養法、化学合成法などの任意の方法によって合成され得る。培養法では、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)を、D-グルコースと数週間インキュベートするか、あるいはD-グリセルアルデヒドまたはD-グリコールアルデヒドと数日間インキュベートする。化学合成法は、例えば、Tessierらの方法(Biochem. J., 2003年, 369巻, 705-719頁)に従って行われる。具体的には、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%メタノールを加えて、37℃で数日間反応させることによって得られる。得られたAGE-2は、SELEX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。

得られたアプタマーのAGE-2との結合親和性は、AGE-2が蛍光を発することを利用して、AGE-2にアプタマーを添加したときのAGE-2の蛍光強度の減弱によって測定できる。このようにして、本発明のアプタマーのうち、親和性の強いアプタマーを選択することができる。

本発明のAGE-2アプタマーは、AGE-2に特異的に結合するので、AGE-2を検出するために用いることができる。本発明のAGE-2アプ

タマーは、より安定化させる目的で、修飾ヌクレオチド／ヌクレオチドを用いて合成されていてもよい。あるいは、AGE-2 アプタマー自体の検出効率を上げるために、アプタマーに蛍光または発光ドメインが付加されていてもよい。したがって、本発明のAGE-2 アプタマーは、AGE-2 検出試薬として用いられ得る。

代表的には、本発明のAGE-2 アプタマーは、例えば、ELISA、組織染色などのように、抗体が用いられ得る種々の分析において、抗体と同様に使用することが可能である。DNAマイクロアレイの技術を利用して、AGE-2 アプタマーチップを作成することもできる。したがって、本発明のAGE-2 アプタマーは、AGE-2 検出キットとして提供され得る。

このようなAGE-2 の検出に供する試料としては、代表的には、種々の生体試料（血液、細胞、組織など）およびその処理物が挙げられる。このような試料について、AGE-2 を検出することにより、AGE-2 が関与する疾患、例えば、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害などの糖尿病合併症、アルツハイマー病などの神経変性疾患、悪性腫瘍の増殖、転移、浸潤などを検出／診断することができる。したがって、本発明のAGE-2 アプタマーは、上記の疾患の臨床検査薬または診断用キットとして提供され得る。

また、本発明のAGE-2 アプタマーは、AGE-2 阻害活性を有するので、抗AGE-2 剤として、あるいはAGE-2 が関与する疾患、例えば、上記の種々の疾患の予防・治療剤として使用され得る。

さらに、本発明のAGE-2 アプタマーは、AGE-2 が関与する疾患の発症機構の解明などの基礎研究にも用いられ得る。

25 実施例

(実施例 1 : AGE-2 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塩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43）を含む一本鎖ランダムオリゴDNAの合成を、次のように行った。

5 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）担体をカラムに詰めた。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ロ酢酸によって除去して、脱トリチル化した。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ト誘導体である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価のリン酸エステルへ変換した。上記の脱トリチ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、
10 カップリング反応の際に、4種のヌクレオチドアミダイト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。

20 (1-2: 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37℃にて7日間インキュベートした。未反応糖を、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、Endo-specy 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。
25

(1-3: AGE-2のビーズへの結合)

上記1-2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、次のようにビーズに固定化した。

- 5 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 (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8.5) 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
- 10 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。

15 (1-4: 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。

20 (1-5: SELEX法)

- 上記1-1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×12サイクル) を行った。増幅後、forwardプライマーのみ
- 25 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×45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、S E L E X用DNAライブラリーとした。このS E L E X用DNAライブラリーをP B Sに溶かし、95℃で5分加熱し、室温に戻した。次いで、S E L E X用DNAライブラリーと上記1-3で調製したA G E - 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、P B S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、A G E - 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1-4で調製したH S A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（H S A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、5～8 mMのMg⁺存在下でP C Rを行って、変異を導入させた。

(1-6 : クローニング)

5～15ラウンド後に得られたDNAを、f o r w a r dプライマー（配列番号42）およびr e v e r s eプライマー（配列番号43）を用いるP C R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A G E - 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K 2 8 7 5 J 1 0））へ導入し、次のようにして配列を決定した。

まず、A G E - 2特異的DNA（P C R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S O C培地を加えて3

7℃にて1時間培養した。適量を寒天プレート（50 μ g/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。

5 （1－7：配列決定）

上記1－6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法によって行った。

10 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アプタマーが得られた（表1）。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。

表 1

配列番号	配 列	残基数				含有率			
		A	G	C	T	A	G	C	T
1	CCGAAACAGACACCCACCAAGGCCACTGGTGAAACCGCCAAACACTCACCCCA	17	8	28	3	30%	14%	50%	5%
2	ACCACTGCACGACCCCCACCCAGTCCCACTGGCAGCGTCCATGGCCCCACGCCCA	11	9	31	5	20%	16%	55%	9%
3	CGCCCCACACACCGCGCAGCAGCCCAAAATCCCGGAGGTCCCGCGTCCACAG	11	8	34	3	20%	14%	61%	5%
4	CCAGCCTCGATACCATACCCACCAACCCCAACAGACTCCACACACCCACGGGTCTC	16	5	29	6	29%	9%	52%	11%
5	CAAGCGCTCCATCCACGGACATACCTACCAACACTCTGCTGGCCATAAAACCCAG	18	4	25	9	32%	7%	45%	16%
6	CCCGCATTCCTTACATAAAGACCTACCCATCTCCCTCCAGTTAATCAGCGC	12	3	27	12	22%	6%	50%	22%
7	CCACACTGCACCTAAACCAAGCGTCCGGACCATCAAACTCTGCCACTAGCCCGT	14	7	27	8	25%	13%	48%	14%
8	AACTAGCCCGAGCCCAATCCCATAAACAAAGCGTGACCACACTATCTGTCTTCCC	16	7	22	10	29%	13%	40%	18%
9	TAACTCACTCCATACCTCACTTGTGATTGGCCAAACACACACCGCTTAAACAGTCCC	17	4	22	13	30%	7%	39%	23%
10	ATAACCCCGGAGGTACACGCGCAAGTATGCCACAAACCGGCATAACCCACCACTTC	17	5	27	7	30%	9%	48%	13%
11	CCCAAGCAATAGCCACACCGCAGCCGACCCCTCATATTCGGACCAAGCTCCG	15	5	28	6	28%	9%	52%	11%
12	TCCCGAGCAACAACAGTGTCTTAAACCCCGCAGCAACACACACCGGTAGACGAGC	19	7	24	6	34%	13%	43%	11%
13	CCTCAACACACCTCTAACCAAGCTCAGCCCGCAGCAACACACCCCGCAACCGACAG	19	3	30	4	34%	5%	54%	7%
14	CTGAATACCAACGTACCCCTCCCAAGTCCCGCTACCCAGGCTAAACTCAACCTCA	16	4	27	9	29%	7%	48%	16%
15	TACAGCCCCCAACCCACCGCGGTAGATAACCCACCCGCAAGGATATCCGACT	17	5	28	6	30%	9%	50%	11%
16	GCCATCCGTCCCGGAACACTCAACACCCCAATCCGCAACCCCGCACTCCACCGCC	12	6	35	5	21%	10%	60%	9%
17	GGCACATATTACTTCTCAATCAAGGCCCAACCGCAACACTCCGCTCACACTACAACC	17	5	25	10	30%	9%	44%	18%
18	GGACCGTTTCACCTATTACCCGCCATCACACGCCACAGATACCTCCCATACACCCA	16	5	26	10	28%	9%	46%	18%
19	GTACATACACCGACCAACATCACAAAGCAGCAAGTACGCAAAACATGAACCTACACCAAG	24	4	23	5	43%	7%	41%	9%
20	GTCCCATTTCCAGCCCCCTTCTGATTACCACTGACACAAACCAATACAAACGACCCA	16	3	27	11	28%	5%	47%	19%
21	GGTGGTACCCACCCCGCAACACCCCAACTCCACCCAGCTCGCCAAACCCGAAACACAC	17	6	30	4	30%	11%	53%	7%
22	GGGTGACACCTATCTAACCAACAGCCACCCCATCCCAACCCGCTAACCCCACTCTCG	16	6	27	8	28%	11%	47%	14%
23	GCCAAATGCGCGCAACCCACCCCAACCCCTGGCAGGGCTAGCAACTGCATCATGCAACCC	14	9	28	6	25%	16%	49%	11%
24	GTACCTGCCCTCCCGCGGTTAAATCACTACACTACAAACACCAACCTCGTAGAAAACTAA	21	6	20	10	37%	11%	35%	18%

5

10

15

20

25

表 1 に示すように、得られた AGE-2 アプタマーはいずれも、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。

(実施例 2 : AGE-2 アプタマーの作成)

- 5 64 塩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 43）を含む一本鎖ランダムオリゴDNAを鋳型に用いたこと以外は、実施例 1 と同様にして AGE-2 アプタマーの作成を行った。

その結果、配列番号 25～41 に示す 61～66 塩基の一本鎖DNA、すなわち AGE-2 アプタマーが得られた（表 2）。

表 2

配列番号	配 列	残基数				含有率			
		A	G	C	T	A	G	C	T
25	GGCAAAGCAGTAAGTCGGGGTCCGGTTGGTTGTTCCGGTCTCGGTCGCGTGCAATATCACGGTGT	9	24	13	16	15%	39%	21%	26%
26	GGCAAAGCATGGTAGGCTAGGTTCCGGGGTCCGGATGGCATTCGGTGGGATCTTTGGCGGGT	9	30	10	15	14%	47%	16%	23%
27	GGCAAAGCAGAAAGCGGTGAGTCGGTTTGTGTGGCATGCGCGGGTGGTTGCCGTGTCCATCGA	10	26	12	15	16%	41%	19%	24%
28	GGCAAAGCATCGATGCCCGTGTGGCCTGTGGCGGGATTGTAGTGTGCCCTCGGTTGTGCATGAG	8	27	14	16	12%	42%	22%	25%
29	GGCAAAGCTCTTGTGGCGGTTGGCCCTTAGCGGTTCCGGAGTTTCACAGTCACGGTCGGGGTG	8	25	15	16	13%	39%	23%	25%
30	GGCAAAGCTGATGAATGCAATCTGCGGTGATATCCCATCAGTGTGTTGGCTGTGTCTGGCT	12	21	12	21	18%	32%	18%	32%
31	GTGCAAGCTGATGGTTCGGTAGTTCCGATGTTTGTCGTTGCGGTTGTGAATGTGCT	7	22	9	24	11%	35%	15%	39%
32	GGCAAAGCATCGATGCCCGTGTGGCCTGTGGCGGGGATTGTAGTGTGCCCTCGGTTGTGCATGAG	8	27	14	16	12%	42%	22%	25%
33	GGCAAAGCAGTAAGTCGGGGTCCGGTTGGTTGTTCCGGTCTCGGTCGCAATATCACGGTGT	9	24	13	16	15%	39%	21%	26%
34	GGCAAAGCTGGTATAAGTATGCAATCTGCGGTGATATCCCATCAGTGTGTTGGCTGTGGAT	13	20	10	19	21%	32%	16%	31%
35	GCCAAAGCCAGGCGGGTCAATGTTGTTTACCTTGATTGTGGCCGCTCAGTGCAGCCGA	9	23	14	15	15%	38%	23%	25%
36	GGCAAAGCAGAAAGCGGTGAGTCGGTTTGTGTGGCATGCGCGGTGGTTGCCCTGTGTCCATCGA	10	26	12	15	16%	41%	19%	24%
37	GGCAAAGCTCTTGTGGCGGTTGGCCCTTAGCGGTTCCGGAGTTTCACAGTCACGGTCGGGGTG	8	25	15	16	13%	39%	23%	25%
38	GCGGACGCGCGGGAGGATCCGGGGGTTGTGCTTGGTGGCCGGATGTCGGTTATTGTTGT	5	30	11	16	8%	48%	18%	26%
39	GGCAAAGCTGTCCCTAGGCGGTGGTAGCAAGTTCGTGGCCGCGCAGTGTCTTGGCAGTTCC	8	24	16	14	13%	39%	26%	23%
40	GGCAAAGCAGGTAAGTCGGGGTCCGGTTGGTTGTTCCGGTCTCGGTCGCAATATCACGGTGT	9	24	13	16	15%	39%	21%	26%
41	GGCAAAGCTGGTATAAGTATGCAATCTGCGGTGATATCCCATCAGTGTGTTGGCTGTGGAT	13	20	10	19	21%	32%	16%	31%

5

10

15

20

25

表2に示すように、得られたAGE-2アプタマーはいずれも、該アプタマーを構成する塩基中のグアニン含有率が32%以上であった。

次いで、得られたAGE-2アプタマーの配列に基づいて、上記1-1と同様にホスホアミダイト法により、各AGE-2アプタマーを化学合成した。

(実施例3：AGE-2アプタマーによるAGE-2蛍光阻害実験)

まず、AGE-2の蛍光特性を測定するために、蛍光分光光度計(FP-777;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380nmおよび消光は470nmで最大蛍光を示した。そこで、25~100 μ g/mLのAGE-2を用いて、励起波長380nmでの蛍光強度を測定して検量線を作成した(図3A)。

次いで、100 μ g/mLのAGE-2に対して、最終濃度25~100nMとなるように各アプタマー(配列番号1~15)を添加し、蛍光強度を測定した(図3BおよびCを参照)。アプタマーを25nM添加したときのAGE-2の蛍光強度の減弱に基づいて、アプタマー単位モル数(nmol)あたりに結合するAGE-2の質量(ng)を算出した。結果を表3に示す。

表 3

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

(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、屠殺後のウシから取り出して、ダルベッコ改変イーグル培地 (Gibco BRL, Rockville, MD) に20%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、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の AGE-2 および $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の アプタマー (配列番号 1 ~ 22) とともに 37°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 HSA を添加して、ならびに陽性コントロールでは AGE-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がし、 $[^3\text{H}]$ -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4に示す。

表 4

		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	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	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	16	0.189	0.00516	38.6
	17	0.183	0.0047	32.7
	18	0.207	0.00598	56.4
	19	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

表4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。

5

産業上の利用可能性

本発明のAGE-2アプタマーは、AGE-2を検出するために使用できるので、AGE-2が関与する疾患、例えば、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害などの糖尿病合併症、アルツハイマー病などの神経変性疾患、悪性腫瘍の増殖、転移、浸潤などの検出薬・診断薬として利用され得る。さらに、本発明のAGE-2アプタマーは、AGE-2阻害活性を有するため、AGE-2が関与する疾患、例えば、上記の種々の疾患の予防・治療剤として使用され得る。特に、糖尿病患者の増加に伴って糖尿病合併症も増加しているため、早期発見および治療に有用である。また、本発明のAGE-2アプタマーは、AGE-2が関与する疾患の発症機構の解明などの基礎研究にも用いられ得る。

10

15

請求の範囲

1. グリセルアルデヒド由来終末糖化産物（AGE-2）に結合するがヒト血清アルブミンには結合しないアプタマーであって、該アプタマーが、少なくとも35塩基からなり、そして該塩基中のシトシン含有率が少なくとも35%であるか、または該塩基中のグアニン含有率が少なくとも32%である、アプタマー。
2. 前記アプタマーが、一本鎖DNAである、請求項1に記載のアプタマー。
3. 前記アプタマーが少なくとも50塩基かつ多くとも120塩基からなる、請求項1または2に記載のアプタマー。
4. 前記塩基中のシトシン含有率が少なくとも40%である、請求項1から3のいずれかの項に記載のアプタマー。
5. 前記塩基中のシトシン含有率が少なくとも50%である、請求項4に記載のアプタマー。
6. 前記塩基中のグアニン含有率が少なくとも35%である、請求項1から3のいずれかの項に記載のアプタマー。
7. 前記塩基中のグアニン含有率が少なくとも40%である、請求項6に記載のアプタマー。
8. 前記一本鎖DNAが、配列表の配列番号1から24のいずれかに記載の

塩基配列を含む、請求項 2 に記載のアプタマー。

9. 前記一本鎖 DNA が、配列表の配列番号 25 から 41 のいずれかに記載の塩基配列を含む、請求項 2 に記載のアプタマー。

5

10. 請求項 1 から 9 のいずれかの項に記載のアプタマーを含む、AGE-2 検出試薬。

10

11. 請求項 10 に記載の AGE-2 検出試薬を含む、AGE-2 検出キット。

12. 請求項 1 から 9 のいずれかの項に記載のアプタマーを含む、AGE-2 が関与する疾患の診断試薬。

15

13. 前記 AGE-2 が関与する疾患が糖尿病合併症である、請求項 12 に記載の試薬。

14. 請求項 12 に記載の試薬を含む、AGE-2 が関与する疾患の診断用キット。

20

15. 前記 AGE-2 が関与する疾患が糖尿病合併症である、請求項 14 に記載のキット。

25

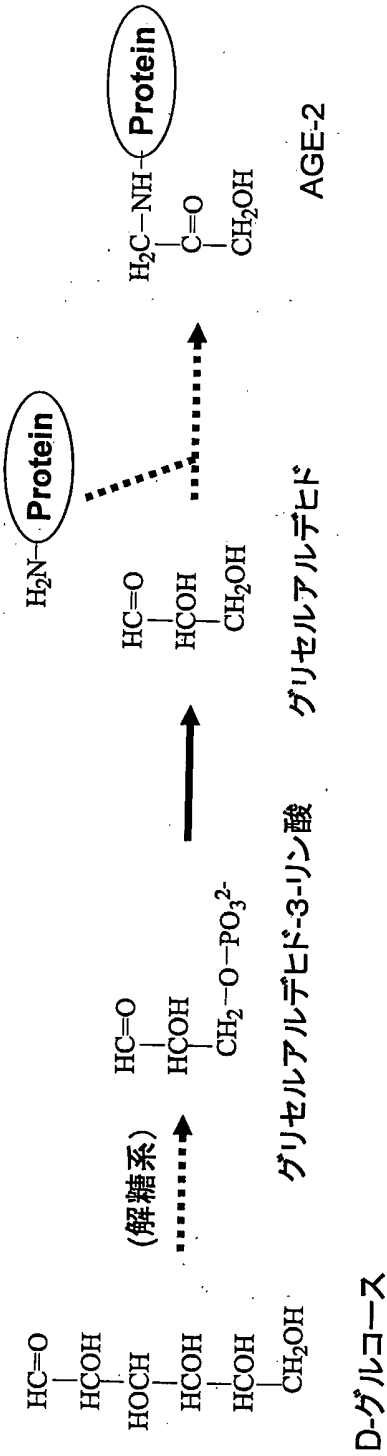
16. 請求項 1 から 9 のいずれかの項に記載のアプタマーを含む、抗 AGE-2 剤。

17. 請求項1から9のいずれかの項に記載のアプタマーを含む、AGE-2が関与する疾患の予防または治療のための薬剤。

18. 前記AGE-2が関与する疾患が糖尿病合併症である、請求項17に記載の薬剤。

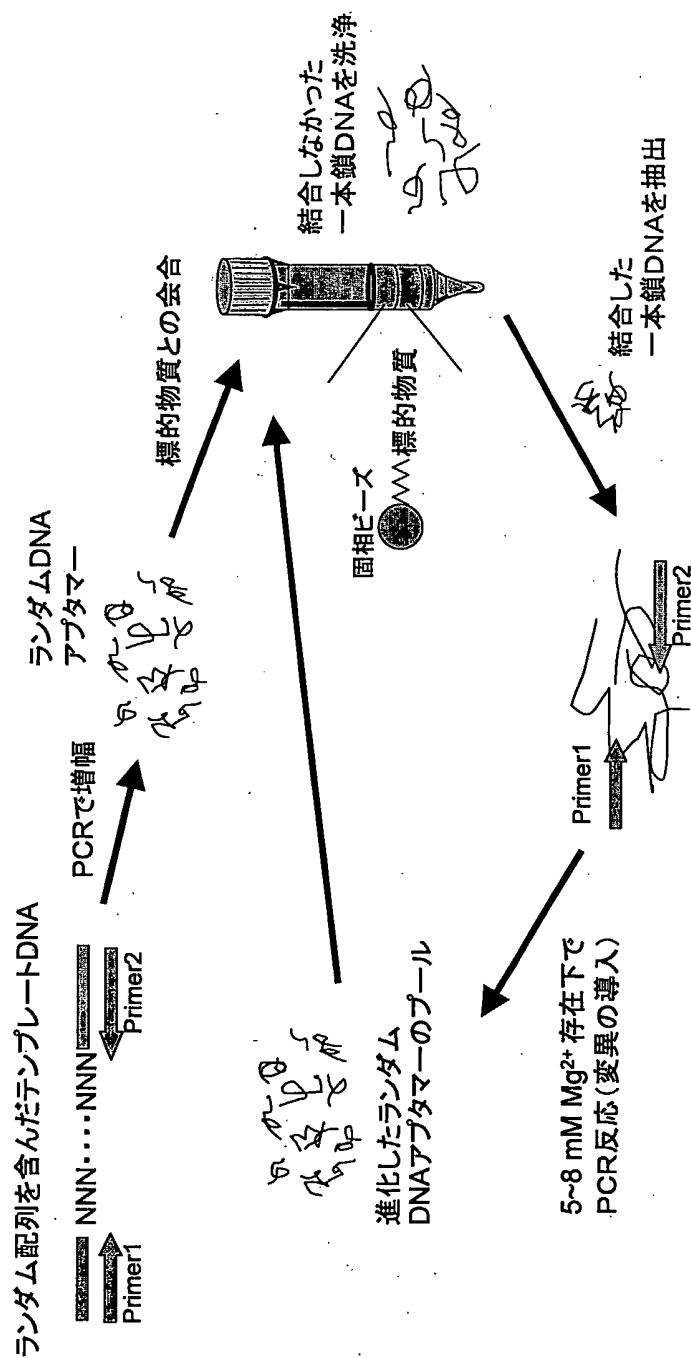
5

第 1 図

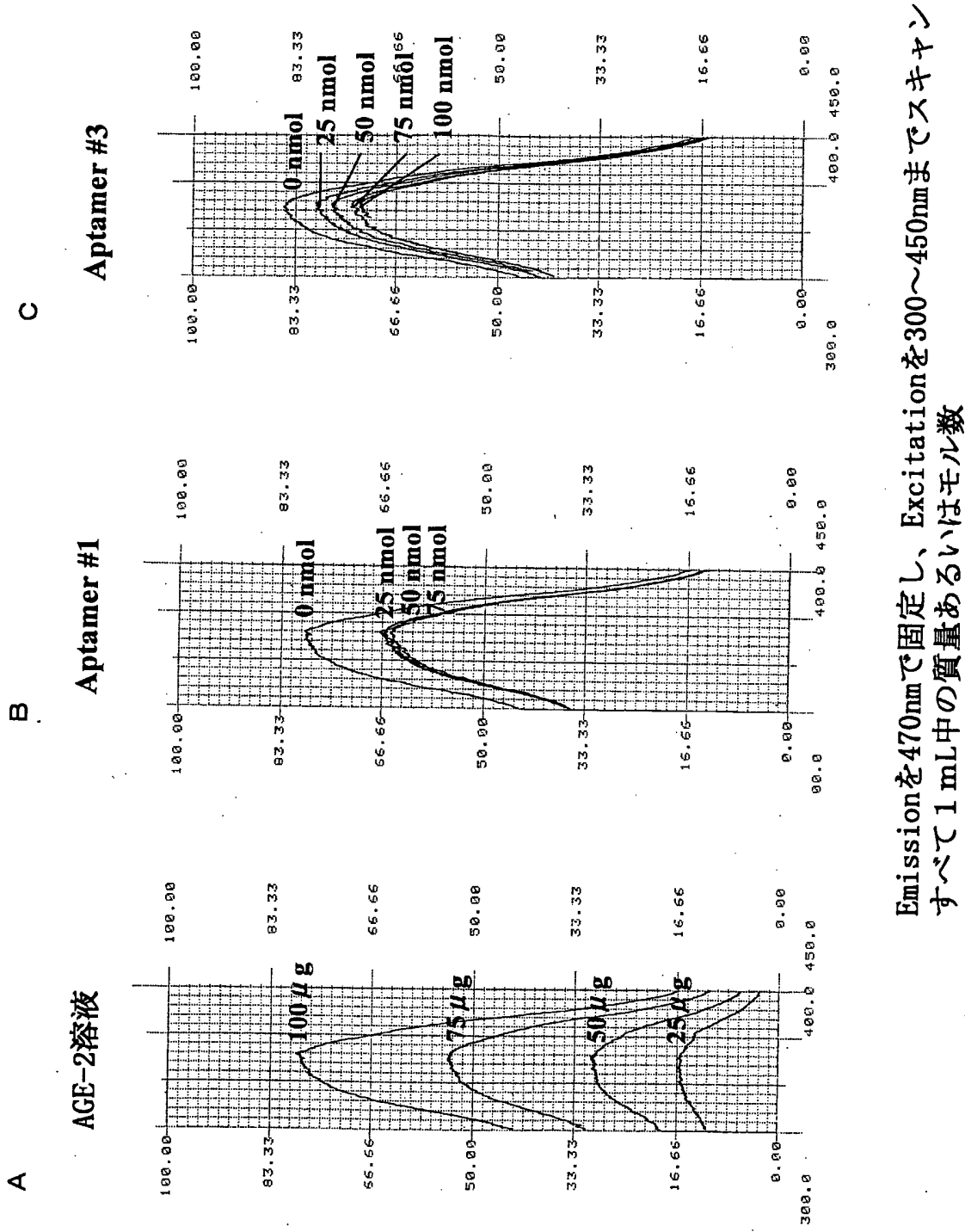


2 / 4

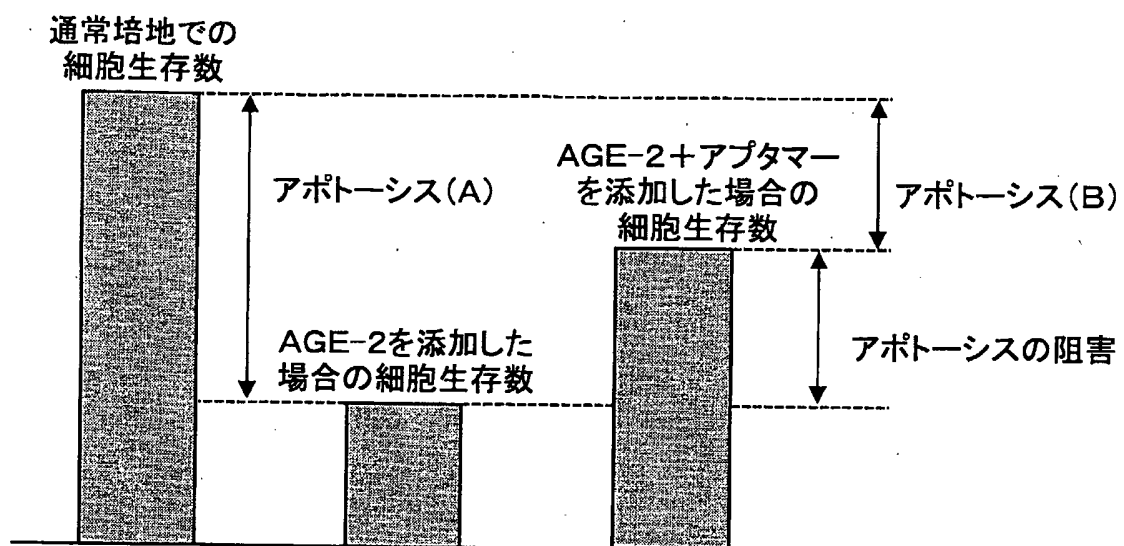
第2図



第3図



第4図



$$\text{アポトーシス阻害率(\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

SEQUENCE LISTING

<110> Kurume University
<120> AGE-2 aptamer
<130> P2-05K17297
<150> JP 2005-19381
<151> 2005-01-27
<160> 43
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> aptamer 1
<400> 1
ccgaaaccag accaccccac caaggccaact cggtcgaacc gccaacactc acccca 56
<210> 2
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> aptamer 2
<400> 2
accactgcac gacccccacc agtcccactc gcagcgtcca tggccccac gcccca 56
<210> 3
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> aptamer 3
<400> 3
cgccccaca ccaccgccac gaccaccaca tcccccgagg tccccgcgt ccacac 56
<210> 4
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> aptamer 4
<400> 4
ccagcctcga taccataccc accaaccaca ccagactcca cacaccacg cgtctc 56
<210> 5
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> aptamer 5
<400> 5
caagcgtcc atccaccgac atacctacca aacactctcc ttgcccataa aaccac 56

2/8

<210> 6
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 6

<400> 6
ccggccattc cctacataa cacctaccca tctcccttc cagttaatca ccgc 54

<210> 7
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 7

<400> 7
ccacactgca ctaaaccagc gtcccgacc atcacaacct ctgccacta gccct 56

<210> 8
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 8

<400> 8
aactagcccg agccacaatc ccataacaag cgtgaccaca ctatctgtc ttccc 55

<210> 9
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 9

<400> 9
taactcactc catactcact tgctgattcg ccaacaacac acccttaaac agtccc 56

<210> 10
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 10

<400> 10
ataaccccgga cgtacacgac aactatgccc acaacccgac ataaccacac accttc 56

<210> 11
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 11

<400> 11
cccaagcaca atagccacac ccacgacca ccctcatatt ccgaccacgc tccc 54

<210> 12
<211> 56
<212> DNA

3/8

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 12

<400> 12

tcccagagcaa caacaactgc tcttaaacc ccaccaaaca cccccgtag accago 56

<210> 13

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 13

<400> 13

cctcaacaca ccttaacca accctcagcc cagcacaaca ccccccaaac cgacac 56

<210> 14

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 14

<400> 14

ctgaatacca acgtaccccc tccaagtcc ccctaccac gctaaactca acctca 56

<210> 15

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 15

<400> 15

tacagccccc caaccacca cgcgcgtaga taaccacca ccaacgatat cccact 56

<210> 16

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 16

<400> 16

gccatccgtc cccggaacac tcacacccc catccgaac cccccccact ccaccgcc 58

<210> 17

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 17

<400> 17

gcgcacatat tacttctca atcaacgcc accgaacact cccgtcacac tacaacc 57

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

4/8

<223> aptamer 18

<400> 18

ggaccgtttc actcattacc ccccatcaca cgccacagat actaccccat acacca 57

<210> 19

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 19

<400> 19

gtacatacac cgaccacat cacaagcacc aactcaccaa acatgaacta caccaac 57

<210> 20

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 20

<400> 20

gtcccccatt ccagcccctt ctcattcacc actcacaaa ccaataaac cagccca 57

<210> 21

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 21

<400> 21

ggtgctgacc cccccccaa acacccaact cccaccacot cgccaaccog aaaacac 57

<210> 22

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 22

<400> 22

ggtgacacc tatctaacca acagccaccc atccaacacc cgctaacccc actctog 57

<210> 23

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 23

<400> 23

gccaatcgcc gcacccaccc aaccctgccc acggctagca actgcatcat cgcaacc 57

<210> 24

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> aptamer 24

<400> 24

5/8

gtacctgccc tccccgcgtt aaaatcacac tacaacacac caatcgtaga aaactaa 57

<210> 25
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> aptamer 25

<400> 25
 ggccaagcag gtaagtgcgg ggtccggttg gttgttcggg tctcgcgtgc aatatcacgt 60
 gt 62

<210> 26
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> aptamer 26

<400> 26
 ggacaagcat ggtgaggcta ggttcggcgg gtgcggatgg cattcgggtg gatctttggc 60
 gggc 64

<210> 27
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> aptamer 27

<400> 27
 ggacaagcag aagcgggtgag tcggtttgtg tggcatgcgg cggcgggtgc ctgtgtccat 60
 cga 63

<210> 28
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> aptamer 28

<400> 28
 ggccaagcat cgatgcccggt gttggcctgt gcgggggatt gtagtgtgcc tcgggtgtgc 60
 atgag 65

<210> 29
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> aptamer 29

<400> 29
 ggacaagctc ttgtggcggg tggccctta gcggttcggg agtttcacag tcacggtcgg 60
 ggtg 64

<210> 30
 <211> 66

6/8

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 30

<400> 30
gggcaagctg gtataagtat gcaatctgog gtgatatccc atcagtgtgt ttggctgtgt 60
ctggct 66

<210> 31
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 31

<400> 31
gtgcaagctg atggttcggt agtttcggat gtttgtgtcg ttgctcgcgt tgtgaatgtg 60
ct 62

<210> 32
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 32

<400> 32
ggccaagcat cgaatcccggt gttggcctgt gcgggggatt gtagtgtgcc tcgggtgtgc 60
atgag 65

<210> 33
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 33

<400> 33
ggccaagcag gtaagtgcgg ggtccggttg gttgttcggg tctcgcgtgc aatatcacgt 60
gt 62

<210> 34
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 34

<400> 34
gggcaagctg gtataagtat gcaatctgog gtgatatccc atcagtgtgt ttggctgtgg 60
at 62

<210> 35
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 35

7/8

<400> 35
gccaaagccag ggcggggtca tgtggttgtt tgacttgatt gtggccgctc agtcagaccg 60
a 61

<210> 36
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 36

<400> 36
ggacaagcag aagcggtag tgggtttgtg tggcatgcgg cgggtgttgc ctgtgtccat 60
cga 63

<210> 37
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 37

<400> 37
ggacaagctc ttgtggcggg tggccctta gcggttcggg agttcacag tcacggtcgg 60
ggtg 64

<210> 38
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 38

<400> 38
gcgggacgcg cgggaggatc cgggggttgt gcttgggtgg ccggatgtcc ggttattgtt 60
gt 62

<210> 39
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 39

<400> 39
ggcaagctgt ccctaggcgg tggtagcaa gttcgtgggc cgcgcagtgt cttggcagtt 60
cc 62

<210> 40
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 40

<400> 40
ggccaagcag gtaagtgcgg ggtcgggttg gttgttcggg totcgcgtgc aatatcacgt 60
gt 62

<210> 41
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> aptamer 41

<400> 41
gggcaagctg gtataagtat gcaatctgcg gtgatatccc atcagtgtgt ttggctgtgg 60
at 62

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer

<400> 42
tagggaattc gtcgacggat c 21

<210> 43
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer

<400> 43
ctccaggtcg acgcatgogc cg 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300922

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00 (2006.01), **A61K31/7088** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01),
C12N15/09 (2006.01), **C12Q1/68** (2006.01), **G01N33/53** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00 (2006.01), **A61K31/7088** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01),
C12N15/09 (2006.01), **C12Q1/68** (2006.01), **G01N33/53** (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/
GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Wang K. Y. et al., The tertiary structure of a DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin determines activity, Biochemistry, 1993, Vol.32, No.42, pages 11285-92	1-8, 10-18
A	Vlassara H. et al., High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1985, Vol.82, No.17, pages 5588-92	1-8, 10-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
04 April, 2006 (04.04.06)

Date of mailing of the international search report
11 April, 2006 (11.04.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300922

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

"The special technical feature" of claim 1 resides in an aptamer which binds to advanced glycation end-product originating in glyceraldehyde but not to human serum albumin, while "the special technical feature" of claims 8 to 9 resides in an aptamer containing a single-stranded DNA represented by any one of SEQ ID NOS: 1 to 41 in Sequence Listing.

However, there is no high homology among the genes represented by SEQ ID NOS:1 to 41. Thus, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features and (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1 to 7 and the parts relating to the single-stranded DNA of SEQ ID NO:1 in claims 8 and 10 to 18.

Remark on Protest

the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300922

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

these invention groups are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C)) Int.Cl. C12N15/00(2006.01), A61K31/7088(2006.01), A61P3/10(2006.01), C12N15/09(2006.01), C12Q1/68(2006.01), G01N33/53(2006.01)			
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 (I P C)) Int.Cl. C12N15/00(2006.01), A61K31/7088(2006.01), A61P3/10(2006.01), C12N15/09(2006.01), C12Q1/68(2006.01), G01N33/53(2006.01)			
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			
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 (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus (JOIS)			
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 請求の範囲の番号	
A	Wang K. Y. et al., The tertiary structure of a DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin determines activity, Biochemistry, 1993, Vol.32, No.42, pages 11285-92	1-8, 10-18	
A	Vlassara H. et al., High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, Vol.82, No.17, pages 5588-92	1-8, 10-18	
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ 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 「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 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 0 4 . 0 4 . 2 0 0 6		国際調査報告の発送日 1 1 . 0 4 . 2 0 0 6	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (I S A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 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) 松田 芳子 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8	4 N 3 1 2 6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1の「特別な技術的特徴」は、グリセルアルデヒド由来終末糖化産物に結合するがヒト血清アルブミンには結合しないアプタマーに関し、請求の範囲8－9の「特別な技術的特徴」は、配列表の配列番号1～41のいずれかに記載の一本鎖DNAを含むアプタマーに関するものである。

しかしながら、配列番号1～41に記載された遺伝子間の相同性は高くないため、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるとは認められず、単一の一般的発明概念を形成するように関連しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1－7、および、請求の範囲8、10－18のうち配列番号1の一本鎖DNAに係る部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。