

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-517885

(P2008-517885A)

(43) 公表日 平成20年5月29日(2008.5.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47 Z N A	4 C O 7 6
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 4
G01N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C O 8 5
A61K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H O 4 5
A61P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-537192 (P2007-537192)
 (86) (22) 出願日 平成17年10月18日 (2005.10.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年6月11日 (2007.6.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/011211
 (87) 国際公開番号 W02006/042745
 (87) 国際公開日 平成18年4月27日 (2006.4.27)
 (31) 優先権主張番号 102004051014.8
 (32) 優先日 平成16年10月20日 (2004.10.20)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 507128377
 アールヴェーテナーアーアーヘン
 ドイツ連邦共和国 52062 アーヘン
 , テムプラーグラベン 55
 (71) 出願人 500242786
 フラウンホファー ゲセルシャフトツール
 フェールデルンク ダー アンゲヴァン
 テン フォルシュング エー. ファオ.
 ドイツ連邦共和国 80686 ミュンヘン,
 ハンザシュトラッセ 27ツェー
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学修飾ペプチド類似体

(57) 【要約】

本発明は I A P P - ペプチド誘導体を使用する糖尿病及びアルツハイマー病治療のための改善された薬剤及び方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然の腓ランゲルハンス島アミロイドポリペプチド (IAPP) 受容体に結合しうる IAPP ペプチド類似体であって、前記ペプチド類似体が a) 最高 38 個のアミノ酸を有し、そのうち 37 個のアミノ酸がその天然の配列中に天然の IAPP のアミノ酸配列を有し、b) その天然の配列中に天然の IAPP の少なくともアミノ酸 19 ~ 37 を有し、c) 少なくとも 1 つのアミド結合が N メチル化されており、そして所望により d) 天然の IAPP のアミノ酸配列の 1 位の Lys (リシン) が Orn (オルニチン) で置換されているもよく、ならびに / あるいは、2 位及び 7 位の Cys (システイン) が 2 位の Dap (ジアミノプロピオン酸) 及び 7 位の Asp (アスパラギン酸) 又は 2 位の Asp 及び 7 位の Dap で置換されているもよく、かつ e) 但し天然のヒト IAPP のアミノ酸配列を有する配列番号 1 ~ 5 のペプチド類似体を除くものであるペプチド類似体。

10

【請求項 2】

天然の腓ランゲルハンス島アミロイドポリペプチド (IAPP) 受容体に結合しうる、診断薬又は治療薬としての IAPP ペプチド類似体であって、前記ペプチド類似体が a) 最高 38 個のアミノ酸を有し、そのうち 37 個のアミノ酸が天然の配列中に天然の IAPP のアミノ酸配列を有し、b) その天然の配列中に天然の IAPP の少なくともアミノ酸 19 ~ 37 を有し、c) 少なくとも 1 つのアミド結合が N メチル化されており、そして所望により d) 天然の IAPP のアミノ酸配列の 1 位の Lys が Orn で置換されているもよく、ならびに / あるいは、2 位及び 7 位の Cys が 2 位の Dap 及び 7 位の Asp 又は 2 位の Asp 及び 7 位の Dap で置換されているもよいペプチド類似体。

20

【請求項 3】

天然の IAPP の完全なアミノ酸配列を有する請求項 1 又は 2 に記載のペプチド類似体。

【請求項 4】

天然の IAPP のアミノ酸 8 ~ 37 を有する請求項 1、2 又は 3 に記載のペプチド類似体。

【請求項 5】

IAPP の天然の受容体のアゴニストとして作用する請求項 3 に記載のペプチド類似体。

30

【請求項 6】

IAPP の天然の受容体のアンタゴニストとして作用する請求項 4 に記載のペプチド類似体。

【請求項 7】

IAPP の 1 個、2 個、3 個又は 4 個のアミド結合が N メチル化されている上記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体。

【請求項 8】

少なくとも 1 つのアミド結合が、22 位、23 位、24 位、25 位、26 位、27 位、28 位、及び 29 位のアミノ酸のアミノ基のアミド結合からなるグループから選ばれる上記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体。

40

【請求項 9】

ペプチド類似体が配列番号 1 ~ 17 からなるグループから選ばれている上記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体。

【請求項 10】

ペプチド類似体が可溶である上記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体。

【請求項 11】

ペプチド類似体の特に N 末端のアミノ基が特にアセチル基、放射性マーカー、酵素マーカー、蛍光マーカー、発光マーカー又はスピンラベルで標識されている上記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体。

【請求項 12】

50

ペプチドがアシル基、機能性アシル基、芳香族基、アミノ酸、グリコール基及び脂質基からなるグループから選ばれた少なくとも1個の官能基で誘導されている上記請求項のいずれか1項に記載のペプチド類似体。

【請求項13】

マーカー及び/又は官能基がスパーサー、特にアミノ酸によってペプチド類似体と結合されている請求項11又は12に記載のペプチド類似体。

【請求項14】

担体に固定化されている上記請求項のいずれか1項に記載のペプチド類似体。

【請求項15】

IAPPがヒトIAPPである上記請求項のいずれか1項に記載のペプチド類似体。

10

【請求項16】

IAPPに対して特異的、又は請求項1~15のいずれか1項に記載のペプチド類似体に対して特異的な抗体の調製方法において、請求項1~15のいずれか1項に記載の少なくとも1つのペプチド類似体を抗原として、所望によりIAPPモノマー又はそのオリゴマーとともに、抗体形成能力をもつ系と接触させ、生じた抗体を得る方法。

【請求項17】

IAPP又はアミロイドペプチドと請求項1~15のいずれか1項に記載のペプチド類似体との混合物に対して特異的な抗体の調製方法において、IAPP又はアミロイドペプチド又はそのオリゴマーと請求項1~5のいずれか1項に記載のペプチド類似体との混合物を抗原として、抗体形成能力をもつ系と接触させ、生じた抗体を得る方法。

20

【請求項18】

請求項1~15のいずれか1項に記載のペプチド類似体の混合物に対して特異的、又は請求項1~15のいずれか1項に記載のペプチド類似体とアミロイドペプチドの混合物に対して特異的であって、これに特異的に結合する、請求項17に記載の方法により調製される抗体。

【請求項19】

請求項1~15のいずれか1項に記載のペプチド類似体に対して特異的、又はIAPPに対して特異的、又はIAPP/ペプチド類似体複合体に対して特異的であって、これに特異的に結合する、請求項16に記載の方法により調製される抗体。

【請求項20】

請求項1~15のいずれか1項に記載の少なくとも1つのペプチド類似体及び/又は請求項18又は19に記載の抗体を含む医薬品。

30

【請求項21】

請求項1~15のいずれか1項に記載の少なくとも1つのペプチド類似体及び/又は請求項18又は19のいずれか1項に記載の抗体並びにインスリン及び/又はIAPP及び/又はプラムリンチドを含む組合せ医薬品。

【請求項22】

少なくとも1つの薬学的に許容しうる担体を含む請求項20~21のいずれか1項に記載の医薬品。

【請求項23】

医薬品がデポ製剤として提供される請求項20~22のいずれか1項に記載の医薬品。

40

【請求項24】

医薬品が錠剤形態、エロゾル又は溶液である請求項20~23のいずれか1項に記載の医薬品。

【請求項25】

タンパク質凝集病、特に糖尿病の予防又は治療のための医薬品の製造のための請求項1~15のいずれか1項に記載のペプチド類似体又は請求項18又は19に記載の抗体の使用。

【請求項26】

50

糖尿病の予防又は治療のための組合せ医薬品の製造のための請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は請求項 18 又は 19 に記載の抗体とインスリン及び / 又は I A P P 及び / 又はプラムリンチドの併用。

【請求項 27】

ペプチド類似体を糖尿病の I A P P 受容体調節治療のための受容体アンタゴニストとして使用する請求項 25 又は 26 に記載の使用。

【請求項 28】

ペプチド類似体を糖尿病の I A P P 受容体調節治療のための受容体アゴニストとして使用する請求項 25 又は 26 に記載の使用。

【請求項 29】

ペプチド類似体を I A P P 凝集及び I A P P 斑の形成の阻害剤として使用する請求項 25、26、27 又は 28 に記載の使用。

【請求項 30】

a) I A P P 凝集又は I A P P によるアミロイド斑の形成の減少又は阻止と、b) 糖代謝の調節を同時に行なうための医薬品の製造のための請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は請求項 18 又は 19 に記載の抗体の使用。

【請求項 31】

a) I A P P の細胞毒性又はその凝集の減少又は阻止と、b) 糖代謝の調節を同時に行なう医薬品の調整のための請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は請求項 18 又は 19 に記載の抗体の使用。

【請求項 32】

- アミロイドペプチド凝集又は - アミロイドペプチドによるアミロイド斑の形成の減少又は阻止のための医薬品の製造のための請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は請求項 18 又は 19 に記載の抗体の使用。

【請求項 33】

- アミロイドペプチドの細胞毒性又はその凝集の減少又は阻止のための医薬品の製造のための請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は請求項 18 又は 19 に記載の抗体の使用。

【請求項 34】

アルツハイマー病又はその他のタンパク質凝集病の予防又は治療のための医薬品の製造のための請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は請求項 18 又は 19 に記載の抗体の使用。

【請求項 35】

a) アルツハイマー病又はその他のタンパク質凝集病と、b) 糖尿病の予防又は治療を同時に行なう医薬品の製造のための請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は請求項 18 又は 19 に記載の抗体の使用。

【請求項 36】

医薬品がインスリン及び / 又はプラムリンチド及び / 又は I A P P を含む組合せ医薬品として作製されている請求項 25 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 37】

アルツハイマー病又はその他のタンパク質凝集病の診断のための診断薬の調製のための請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は請求項 18 又は 19 に記載の抗体の使用。

【請求項 38】

タンパク質凝集病、特に糖尿病の診断のための診断薬の調製のための請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は請求項 18 又は 19 に記載の抗体の使用。

【請求項 39】

診断、治療及び研究用の抗体の製造のための、取り扱いが改善された免疫原としての請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体の使用。

【請求項 40】

10

20

30

40

50

検出マーカーを備えた請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は検出マーカーを備えた請求項 18 又は 19 に記載の抗体をプローブとして、被検試料と接触させ、場合によって存在する I A P P、 - アミロイドタンパク質、プリオンタンパク質、 - シヌクレイン又はポリグルタミン又はその凝集体を有するペプチド類似体又は抗体の形成を検出することを特徴とする、I A P P、 - アミロイドタンパク質、プリオンタンパク質、 - シヌクレイン又はポリグルタミンもしくはその凝集体の定性的及び / 又は定量的検出方法。

【請求項 4 1】

液体に含まれる I A P P、 - アミロイドタンパク質、プリオンタンパク質、 - シヌクレイン又はポリグルタミンの凝集体形成を調節、特に阻止するための方法であって、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体と前記液体を接触させ、インキュベーションし、凝集体形成を調節することを特徴とする方法。

10

【請求項 4 2】

研究目的のための請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体又は請求項 18 又は 19 に記載の抗体の使用。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のペプチド類似体と I A P P 及び / 又は - アミロイドタンパク質及び / 又は プラムリンチドとの混合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は膵ランゲルハンス島アミロイドポリペプチド (I A P P) のペプチド類似体、I A P P 又はその凝集体の検出方法、タンパク質凝集病、特に糖尿病及びアルツハイマー病の予防及び治療のための医薬組成物、タンパク質凝集病、特に糖尿病及びアルツハイマー病の検出のための診断用組成物並びに疾病の診断及び治療目的のため又は基礎研究のための上記ペプチド類似体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

糖尿病は現在なお十分な治療策がない疾病である。通常 I 型及び I I 型糖尿病は区別されている。糖尿病患者の 90% は I I 型糖尿病又は老年性糖尿病を患っている。今日全世界に 1 億 5000 万人以上の I I 型糖尿病患者がいる。糖尿病はインスリン不足又はインスリン依存性生物学的プロセスにおける障害によって発生する。一方では炭水化物代謝でのインスリンの中心的役割を他の分子で代行することができず、他方ではインスリンの投与だけで I 型糖尿病の場合は疾病の病理的結果を、又は I I 型糖尿病の場合は疾病自体を除去することができないため、新しい治療策が必要である。このような方策は一方ではインスリン分子の分泌、吸収及び生物学的機能の展開を促進し、他方ではインスリンの望ましくない副作用、例えば体重増加又は高血糖を防止するものでなければならない。従って特にインスリンとともに炭水化物代謝の調節に寄与する新規な分子は、生物医学的に重要である。

30

【0003】

40

この新規な分子の 1 つが膵ランゲルハンス島アミロイドポリペプチド (I A P P 又はアミリン) である。I A P P は、37 個のアミノ酸残基からなり、膵臓の細胞で合成され、インスリン及びグルカゴンとともに糖代謝の調節に寄与するペプチドホルモンである。I A P P はインスリンのアンタゴニストである。95% を超える I I 型糖尿病患者の膵臓にいわゆるアミロイド斑が認められる。アミロイド斑はポリペプチド I A P P の不溶の凝集体からなる沈着物である。従ってアルツハイマー病、パーキンソン病、プリオン疾患又はハンチントン病と同様に、糖尿病もタンパク質凝集病 (Ross & Poirier, Nature medicine, 2004 年 7 月、10 巻補遺、10-17 頁) とみなすことができる。I A P P は可溶性モノマー形であることから、I A P P の生体活性はその c A M P 結合受容体によって仲介される。ところが I A P P - アミロイド斑、即ち I A P P の可溶性オリゴマー及び多量体は細胞

50

毒性を有する。I A P P - アミロイド形成によって引き起こされる 細胞の障害はI I 型糖尿病の病理発生の一連の相互作用におおいに寄与すると考えられる。従ってI A P P - アミロイド形成過程の治療上有効な阻害剤の開発は重要な生物医学的関心事である。しかもI A P P分子はインスリンのアンタゴニストとしての、かつインスリン分泌又は投与に関連する食後高血糖の調節剤としての生物学的機能に関して、それ自体がI型(例えばインスリンと組み合わせて)及びI I型糖尿病の治療で有望な治療用途をもつと思われる重要なポリペプチドホルモンである。ところがI A P Pの医学的適用はその難溶性と激しい凝集傾向のため大幅に限られている。

【0004】

可溶性I A P P類似体、プラムリンチドは周知である。プラムリンチド(Symlin^(R))はヒトI A P P分子の配列中の25、28及び29位の3つのアミノ酸残基をプロリンで置換することによって合成される。このプロリン置換は、本来凝集傾向がないラットI A P P配列で現れる。構造的には、プロリンを含む配列の凝集傾向の減少は、プロリン残基がフォールドコンホメーションをとることができないことで説明される(プロリンはフォールドを「破る」残基である)。実際にI A P P類似体、プラムリンチドは凝集傾向が著しく減少しており、ヒトI A P Pより良好な溶解度を有する。まだ完了していない臨床研究が示唆するところでは、この類似体はインスリンとともに糖尿病治療に適用できそうである。ところがプラムリンチドがpH値5以上で凝集傾向があることがインスリンと併用した製剤及び適用を妨げる。そこでこの類似体はインスリンと別個に皮下注射により投与される。このため適用が大変面倒である(B.Nyholmら、Expert Opinion, Investig. Drug(2001) 10(9) 1641-1652)。

10

20

【0005】

糖尿病を早期に認識するとともに治療対策を早期に採用すれば、病気の進行を大幅に遅らせて、肯定的な影響を及ぼすことができる。ところがI I型糖尿病でのI A P Pの役割はまだ解明されていない。その凝集は濃度に依存するから、可溶性I A P P又は可溶性I A P P類似体の血中濃度と疾病の発症は十分に関連があるようである。慣用のI A P P - R I A (ラジオイムノアッセイ)はI A P P抗体が認識したI A P P分子を決定することしかできない。しかし抗原抗体相互作用を担うタンパク質領域(抗原領域)は、タンパク質会合によってもはや簡単に識別できないことが知られている。それ故、I A P P分子の特異的に異なる会合形式を認識できる実験室的化学的I A P P測定方法を開発することが重要である。そのためにコンホメーション特異的抗体、即ちモノマー又はオリゴマーI A P P分子に向けて作られた抗体の開発が必要と思われる。在来のI A P P抗体はコンホメーション特異的でないからである。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで本発明の課題は、タンパク質凝集病、特に糖尿病及び/又はアルツハイマー病の改善された予防、治療及び診断を可能にする薬剤及び方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、天然のI A P P(腓ランゲルハンス島アミロイドポリペプチド)受容体に結合しうるI A P Pペプチド類似体において、ペプチド類似体がa)最高38個のアミノ酸、好ましくは最高37個のアミノ酸を有し、そのうち37個のアミノ酸がその天然の配列中に天然のI A P Pのアミノ酸配列を有し、b)その天然の配列中に天然のI A P Pの少なくともアミノ酸19~37を有し、c)少なくとも1つのアミド結合がNメチル化されており、そして、所望によりd)天然のI A P Pのアミノ酸配列の1位のL y s(リシン)はO r n(オルニチン)で置換されていてもよく、ならびに/あるいは、2位及び7位のC y s(システイン)は2位のD a p(ジアミノプロピオン酸)及び7位のA s p(アスパラギン酸)又は2位のA s p及び7位のD a Pで置換されていてもよく、かつe)但しヒトI A P Pの野性種アミノ酸配列を有する配列番号1~5のNメチル化ペプチド類似

40

50

体を除くペプチド類似体を提供することによって前記課題を解決する。特に本発明は、天然の I A P P (豚ランゲルハンス島アミロイドポリペプチド) 受容体に結合しうる、診断薬又は治療薬としての I A P P ペプチド類似体において、ペプチド類似体が a) 最高 3 8 個のアミノ酸、好ましくは 3 7 個のアミノ酸を有し、そのうち 3 7 個のアミノ酸がその天然の配列中に天然の I A P P のアミノ酸配列を有し、 b) その天然の配列中に天然の I A P P の少なくともアミノ酸 1 9 ~ 3 7 を有し、 c) 少なくとも 1 つのアミド結合が N メチル化されており、そして、所望により d) 天然の I A P P のアミノ酸配列の 1 位の L y s (リシン) は O r n (オルニチン) で置換されていてもよく、ならびに / あるいは、 2 位及び 7 位の C y s は 2 位の D a p 及び 7 位の A s p 又は 2 位の A s p 及び 7 位の D a p で置換されていてもよいペプチド類似体を提供することによって、前記課題を解決する。

10

【 0 0 0 8 】

本発明によれば、これらのペプチド類似体、即ち修飾 N メチル化 I A P P 誘導体は、好ましくは単離された、特に好ましくは部分的又は完全に精製された形で提供される。

【 0 0 0 9 】

従って上記のペプチド類似体は必要不可欠な特徴 a)、 b) 及び c) によって特徴づけられ、所望により特徴 d) を有しうる。即ち本発明のこの任意選択的实施形態でペプチド類似体は天然のヒト I A P P 配列の 1 位のリシンをアミノ酸、オルニチンで、特にヒト天然の I A P P の 2 及び 7 位の 2 つのシステインを 2 位の D a p (2 , 3 - ジアミノプロピオン酸) 及び 7 位の A s p 又は 2 位の A s p 及び 7 位の D a p で置換してもよいという点で、 I A P P、特にヒト I A P P の天然の配列とは異なるアミノ酸配列を有することを特徴とする。以下で、特徴 d) に基づき形成された、即ち天然の I A P P 配列、特にヒト I A P P 配列と異なり 1 位にオルニチン (リシンの代わりに) 及び / 又は 2 位に A s p 又は D a p 及び 7 位に D a p 又は A s p (それぞれシステインの代わりに) を有する本発明のペプチド類似体を、本発明に係るペプチド類似体の誘導体と呼ぶ。

20

【 0 0 1 0 】

2 位及び 7 位に C y s を有する本発明のペプチド類似体は、好ましくは酸化されており、即ち C y s 2 及び C y s 7 のチオール残基の間のジスルフィド架橋が閉じている。

【 0 0 1 1 】

また 2 位及び 7 位に D a p 及び A s p 又は A s p 及び D a p を有する本発明のペプチド類似体は好ましくは架橋を有する。即ち A s p と D a p の側鎖がラクタム架橋によって互いに共有結合されている。

30

【 0 0 1 2 】

好ましい実施形態で本発明のすべてのペプチド類似体の C 末端はアミドをなす。

【 0 0 1 3 】

本発明に関連して「天然の I A P P」の概念は、 I A P P の野性種アミノ酸配列、即ち感染生物、好ましくはヒトにおいて *in vivo* で天然に見られるアミノ酸配列を有する I A P P を意味する。特にヒトの様々な天然の I A P P 配列が Kapurniotu (Biopolymers (Peptide Science) 60 (2001) 438-459) に公表されている。この学説の配列番号 1 8 はヒトの I A P P の野性種配列を示す。従って本発明の枠内でアミノ酸又はアミド結合の位置データは、別に指示しないかぎり、常に Kapurniotu (前記) の図式 1 又は配列番号 1 8 に示された天然のヒト I A P P のアミノ酸配列に関する位置データである。同様に天然の I A P P 受容体の概念は、自然に存在する野性種 I A P P 受容体、特にヒト野性種受容体を意味する。

40

【 0 0 1 4 】

本発明に係るペプチド類似体は、一実施形態では天然のヒト I A P P とまったく同じ一次構造を、別の実施形態では特にヒト I A P P とおおむね同じ一次構造を有するが、本発明に基づき選択的に導入される特定のアミド結合の N メチル化により I A P P と異なるコンホメーションを有し、それとともに天然のヒト I A P P と比較して変化した生物学的、特に生化学的及び生物物理学的性質を有する。特に本発明に係るペプチド類似体は、天然の I A P P、特に天然のヒト I A P P と相互作用して、アミロイド繊維への凝集、その後

50

のアミロイド斑の形成及びそれに関連する細胞毒性を減少又は阻止しうるのが特徴である。同時に天然の、即ち野性種受容体、好ましくはヒトIAPP受容体に特異的に結合するという有利な性質がある。本発明に係るペプチド類似体は細繊維形成能力がないか又は大幅に低下している。約7の生理的pHで特に細繊維形成傾向の大幅な低下を示し、従って天然のIAPP又はプラムリンチドと異なりインスリンとともに調合し、投与することができる。本発明に係るペプチド類似体は特に約pH7~7.4の生理的pH値でIAPPの少なくとも100倍の溶解度を有し、このため前述のようにインスリンとともに調合することが可能である。IAPPと比較して溶解度が高いため、溶液(1mg/ml)として貯蔵時にその生物学的活性が減少しない(IAPPの場合は減少する)。またIAPP含有溶液の添加物として、IAPPが可溶性の、即ち生物学的に活性の形態を保つことに寄与する。本発明に係るペプチド類似体はIAPPと比較して、プロテアーゼによる分解に対して安定である。このため本発明のペプチド類似体を錠剤の形で投与することが可能になる。さらに本発明に係るペプチド類似体は、アルツハイマー病の発症で役割を演じるアミロイドペプチドと相互作用する。本発明に係るペプチド類似体は特にアミロイドペプチドの細胞毒性を低下させるため、アルツハイマー病の診断、治療及び予防にも適している。

10

【0015】

本発明に係るペプチド類似体は特にタンパク質凝集病、特に糖尿病、好ましくはI型糖尿病及び/又はII型糖尿病(Diabetes mellitus)の予防、治療及び診断に適している。所望により好ましい実施形態で本発明に係るペプチド類似体がインスリン及び/又はIAPP及び/又はプラムリンチドとともに糖尿病、特にI型及び/又はII型糖尿病の予防及び治療のために使用される。さらに体液中のIAPPのELISA(酵素結合免疫ソルベント検定法)/RIA(ラジオイムノアッセイ)に基づく検出のためのコンホメーション特異性抗体を提供し、かつ使用し、こうして改善された診断及び分析方法を提供するために、本発明に基づき提供されるコンホメーション安定化ペプチド類似体を抗原として、例えば単独で又は所定の量のIAPPモノマー又はIAPPオリゴマーと混合して使用することができる。

20

【0016】

本発明においては、例えばELISA、RIA等のために、マーカー、例えばスピラベル、蛍光又は発光マーカーとともに、特にN末端標識化、特に好ましくはN末端ピオチニル化形態で、又はN末端蛍光標識化、又はその他の蛍光マーカーを付した本発明のペプチド類似体を使用することができる。

30

【0017】

好ましい実施形態では、本発明は、天然のIAPP、特に天然のヒトIAPPの完全なアミノ酸配列1~37又は上記の誘導体のアミノ酸1~37を有し又はこの37個のアミノ酸だけを有し、即ちこれらのアミノ酸からなるペプチド類似体を提供する。特に好ましい実施形態では、本発明は、ヒトの天然のIAPPの37個のアミノ酸又は天然のヒトIAPPの順序で配列された上記の誘導体のアミノ酸からなり、このペプチド類似体のアミノ酸のアミノ基のアミド結合の少なくとも1つがNメチル化されているペプチド類似体を提供する。

40

【0018】

特に好ましい実施形態では、本発明は、天然のヒトIAPPの完全なアミノ酸配列、即ち完全長のアミノ酸配列1~37又は上記の誘導体のアミノ酸配列を有し又はこれからなる本発明IAPPペプチド類似体が、天然のIAPP受容体の受容体アゴニストとして作用することを教示する。この実施形態では、ペプチド類似体がIAPP受容体を活性化する。この教示によれば、本発明のペプチド類似体は糖代謝及び天然のIAPP分子のその他の生物学的作用の調節のために特に適している。同時にこのペプチド類似体はアミロイド細繊維及び/又はアミロイド斑の形成の阻害剤、即ち不溶の細胞障害性IAPP凝集体の形成の阻害剤として作用するとともに、これに原因する細胞毒性を減少又は阻害する。

【0019】

50

別の好ましい実施形態では、本発明は、野性種配列に比して短縮され、特にN末端が短縮され、天然のIAPPの少なくともアミノ酸19～37、好ましくは8～37又は上記誘導体のアミノ酸を有するか、もしくは天然の順序のアミノ酸だけからなるペプチド類似体を提供する。この実施形態では短縮されたペプチド類似体が特に天然のヒト野性種IAPPの少なくともアミノ酸19～37、好ましくは8～37、最大でアミノ酸2～37又は上記の誘導体のアミノ酸を有し、もしくはこれらのアミノ酸からなり、ペプチド類似体のアミド結合の少なくとも1つがNメチル化されている。

【0020】

また本発明は特に天然のヒトIAPPの完全アミノ酸配列又は上記の誘導体の完全アミノ酸配列をもたない、本発明に基づき短縮されたペプチド類似体、即ち2～37位あるいは19～37位のアミノ酸又は上記の誘導体のアミノ酸を有するか、又はこれらのアミノ酸からなるペプチド類似体が、同じく天然のIAPPの野性種受容体に結合するが、そこで受容体アゴニストとして作用し、かくして糖代謝の調節剤として機能するために同じく適していることを教示する。この実施形態ではペプチド類似体はIAPP受容体を阻害する。これらの特に好ましいペプチド類似体は同時にアミロイド細繊維及び/又はアミロイド斑の形成の阻害剤として作用し、従ってそれに伴う細胞毒性を減少又は阻害する。

10

【0021】

こうして本発明は、天然のIAPP、特に天然のヒトIAPPのアミノ酸7～37、6～37、5～37、4～37、3～37及び2～37又は上記の誘導体のアミノ酸を有するか、又はこれらのアミノ酸だけからなり、これらのどの実施形態でもペプチド類似体のアミド結合の少なくとも1つがNメチル化されている実施形態、即ち野性種IAPPのペプチド類似体も包含する。

20

【0022】

好ましい実施形態では、本発明のペプチド類似体は、Nメチル化された、即ちペプチドのアミノ酸のアミノ基の水素原子がメチル基で置換された2、3又は4個のアミド結合を有する。本発明の好ましい実施形態では本発明のペプチド類似体の22及び/又は23及び/又は24及び/又は25及び/又は26及び/又は27及び/又は28及び/又は29位のアミノ酸のアミノ基に属するアミド結合がNメチル化されている。特に好ましい実施形態ではNメチル化アミド結合が4～8個のアミノ酸からなるペプチド類似体の領域に、切れ目のない順序でアミノ酸配列に配置されている。別の好ましい実施形態でNメチル基は、4～8個のアミノ酸からなるペプチド類似体の領域に、特に上記アミノ酸位置中、ペプチド類似体のアミド結合に1つおきに存在する。

30

【0023】

特に好ましい実施形態では、本発明はヒト野性種IAPPの天然アミノ酸配列を有するとともに、配列番号1～5に示されるNメチル化を有するペプチド類似体を除き、配列番号1～17からなるグループから選ばれたペプチド類似体に関する。本発明の別の好ましい実施形態は配列番号1～17からなるグループから選ばれた治療用又は診断用のペプチド類似体に関する。従って本発明は特に配列番号1～17の本発明のペプチド類似体をヒト又は動物の身体の治療方法及びヒト又は動物の身体で行われる診断方法で初めて応用するものである。また本発明は上記の本発明のペプチド類似体、特に配列番号1～17からなるグループから選ばれたペプチド類似体を含む医薬品及び診断薬に関する。

40

【0024】

特に好ましい実施形態では、本発明はヒト野性種IAPP又はその誘導体のアミノ酸1～37を有する本発明のペプチド類似体のグループから選ばれ、位置(24及び26)、(25及び27)、(23及び25)、(26及び27)、(25及び26及び27)、(24及び25)、(25及び26)、(22及び24)、(23及び24)、(24及び26)、(23)、(24)、(25)、(26)、(27)、(28及び29)、(25及び28及び29)にアミノ酸のアミノ基のアミド結合を有するペプチド類似体に関する。これらのペプチド類似体は、ヒト野性種IAPPのアミノ酸配列を有する限り、上記の順序でIAPP-GI、IAPP-AL、IAPP-FA、IAPP-IL、IA

50

PP - AIL、IAPP - GA、IAPP - AI、IAPP - NG、IAPP - FG、IAPP - GAIL、IAPP - F、IAPP - G、IAPP - A、IAPP - I、IAPP - L、IAPP - SS及びIAPP - ASSとも称する。

【0025】

自明のことだが、本発明は特に医薬品又は診断薬の調製並びに研究及び試験目的のための、野性種IAPPの上記のペプチド類似体又はその誘導體と、天然非修飾IAPP及び/又はアミロイドペプチド又はIAPPのその他の周知のペプチド類似体もしくはアミロイドペプチド(A-)又はIAPPのその他の誘導體もしくはA-との混合物、例えば1:1混合物に関する。

【0026】

別の好ましい実施形態では、本発明は、好ましくは約7.0~8.0の生理的pH値、好ましくはpH=7.4で、特に水又は生理的食塩水に可溶の、特に天然のIAPP、特に天然のヒトIAPPの100倍の溶解度を有する本発明のペプチド類似体に関する。

【0027】

別の好ましい実施形態では、本発明のペプチド類似体は特にN末端アミノ基が特にアセチル基、放射性マーカー、酵素マーカー、蛍光マーカー、発光マーカー又はスピラベルで標識され、好ましくは上記マーカーがスペーサーを介してペプチド類似体と結合されるようになっており、スペーサーはアミノ酸であることが可能である。

【0028】

別の好ましい実施形態では、本発明に係るペプチド類似体はアシル基、機能性アシル基、芳香族基、アミノ酸、グリコール基及び脂質基からなるグループから選ばれた少なくとも1つの官能基により誘導されたものである。

【0029】

別の好ましい実施形態では、官能基自体がアミノ酸でないとして、官能基がスペーサー例えばアミノ酸によりペプチド類似体と結合されている。

【0030】

別の好ましい実施形態では、本発明に係るペプチド類似体は担体、例えばマトリックス、ウェルの表面、マイクロタイプレート、膜等に固定化されている。

【0031】

本発明に係るペプチド類似体は通常化学的に合成及び/又は修飾することができる。

【0032】

また本発明は、a) IAPP又はb) ペプチド類似体/IAPP複合体に対して特異的な、もしくはc) 本発明のペプチド類似体に対して特異的な抗体の調製方法において、本発明のペプチド類似体を抗原として、所望によりIAPPモノマー又はオリゴマーとともに抗体形成能力を持つ系と接触させ、例えば動物の身体に注射し、生じた抗体を得る調製方法に関する。また自明のことであるが、本発明はIAPP又はIAPP/ペプチド類似体複合体に対して特異的な、又は特異的に本発明のペプチド類似体に対して特異的な抗体の調製方法において、抗体がポリクロナール抗体のみならずモノクロナール抗体であってもよい調製方法に関する。従って本発明は上記の方法により調製されるモノクロナール又はポリクロナール抗体及びその断片にも関し、その場合抗体又はその断片は本発明のペプチド類似体に対して特異的又はIAPP又はペプチド類似体/IAPP複合体に対して特異的であって、即ちこれを特異的に認識して結合することができる。抗体は常法により修飾し、例えば標識することができる。また抗体は固定化した形で担体又はペレットに固定されていてもよい。本発明に係るポリクロナール又はモノクロナール抗体は、例えば本発明に係るペプチド類似体で治療した患者の病状の分析又はその他の治療上有効なペプチドの単離と同定のために利用することができる。本発明に係るペプチドは免疫原としての使用に関連して、診断及び治療用抗体の調製について、天然由来の難溶性ペプチドに比して取り扱いやすさが大幅に改善されているため、特に有利である。こうして調製された抗体は、一実施形態では本発明のペプチドを特異的に、別の実施形態では天然に存在する、所望により凝集形態の野性種IAPPを特異的に認識することができるため、本発明の抗体を

10

20

30

40

50

例えばアルツハイマー病又は糖尿病の診断に使用することができる。また本発明は、本発明のペプチド類似体をヒト又は動物の生体に適用して、I A P P又はその誘導体に対する免疫化を得るヒト又は動物の生体の免疫化方法に関する。

【0033】

そこで本発明は、本発明のペプチド類似体に対して特異的な抗体の調製方法において、少なくとも1つの本発明のペプチド類似体を抗原として、抗体形成能力をもつ系と接触させ、生じた抗体を得る調製方法に関する。また本発明はI A P P及び本発明のペプチド類似体に対して特異的な抗体の調製方法において、少なくとも1つの本発明のペプチド類似体を抗体形成能力をもつ系と接触させ、生じた抗体を得る調製方法に関する。また本発明はI A P Pとペプチド類似体の混合物に対して特異的な抗体の調製方法において、I A P Pモノマーと本発明のペプチド類似体の混合物を抗原として（所望によりオリゴマーとしてのI A P Pも使用することができる）、抗体形成能力をもつ系と接触させ、生じた抗体を得る調製方法に関する。また本発明はアミロイドペプチドと本発明のペプチド類似体の混合物に対して特異的な抗体の調製方法において、アミロイドペプチド・モノマー又はオリゴマーと少なくとも1つの本発明のペプチド類似体との混合物を抗体形成能力をもつ系と接触させ、生じた抗体を得る調製方法に関する。

10

【0034】

また本発明は、疾病、特にタンパク質凝集病、特に糖尿病及び/又はアルツハイマー病の診断、予防又は治療のために、上記方法により調製された、抗原を特異的に認識して結合する特異的抗体又はその特異的断片に関する。従って本発明は、糖尿病及び/又はアルツハイマー病の診断、予防又は治療のための診断薬又は医薬品の製造のための上記抗体又はその特異的断片の使用にも関する。

20

【0035】

別の好ましい実施形態では、本発明は、前述のように作用物質として好ましくは予防又は治療上有効な量の少なくとも1つの本発明のペプチド類似体及び/又は抗体を、好ましくは少なくとも1つの薬学的に許容しうる担体とともに含む医薬品に関する。

【0036】

特に好ましい実施形態では、この医薬品は所望により必要ならばさらに離型剤、潤滑剤、溶剤、分散媒、被覆、抗菌又は抗真菌剤、保存剤、着色料、乳化剤、調味料又はその他の慣用の製剤助剤を含む。例えば血液脳関門を経て標的器官に至る輸送に役立つその他の物質を医薬組成物に使用することができる。

30

【0037】

別の好ましい実施形態では、医薬品はデポー剤の形態で提供され、作用物質即ち本ペプチド類似体のゆるやかな放出を可能にし、例えばいわゆる「徐放性」基質を含み、又は医薬品が患者の中で徐々に溶解する糖衣で被覆されている。

【0038】

特に好ましい実施形態では、上記の種類医薬品が組合せ医薬品として提供され、即ち同じ製剤又は同じ薬品包装の中にさらにインスリン及び/又はI A P P及び/又はプラムリンチドを含むようになっている。そこで本発明はa)上記のペプチド類似体の少なくとも1つ及び/又はその抗体を含む製剤並びにb)インスリン及び/又はI A P P及び/又はプラムリンチドを含む製剤を、所望により薬学的に許容しうる担体及びその他の製剤助剤とともに含む医薬品キットにおいて、作用物質、即ちペプチド類似体及びインスリン及び/又はプラムリンチド及び/又はI A P Pが予防又は治療上有効な量で存在する医薬品キットに関する。

40

【0039】

別の好ましい実施形態では、医薬品は錠剤形態であり、もしくはエアロゾール又は溶液、特に注射液である。

【0040】

別の好ましい実施形態では、本発明は、タンパク質凝集病、特に糖尿病、好ましくはI型糖尿病又はII型糖尿病の予防又は治療のための医薬品の製造のための本発明のペプチ

50

ド類似体又は上記の抗体の使用に関する。

【0041】

また本発明は、糖尿病、例えばI型又はII型糖尿病の予防又は治療用の作用物質、即ちペプチド類似体及び/又はインスリン及び/又はIAPP及び/又はプラムリンチドの2つの互いに分離された製剤を同時に又は時間的にずらせて投与するための組合せ薬剤キット、例えば共同製剤又は医薬品キットの調製のための本発明のペプチド類似体又は上記の抗体とインスリン及び/又はIAPP及び/又はプラムリンチドの使用に関する。

【0042】

特に好ましい実施形態では、本発明は、糖尿病、例えばI型又はII型糖尿病の予防又は治療用の医薬品の製造のための、所望によりインスリン及び/又はIAPP及び/又はプラムリンチドを併用した本発明のペプチド類似体の使用において、本発明のペプチド類似体、特に天然のIAPPの1~37個のアミノ酸又はその誘導体のアミノ酸配列を有するペプチド類似体が糖尿病のIAPP受容体調節治療のため、特に天然のIAPP受容体の活性化のための受容体アゴニストの役割をする使用に関する。従って本発明に係る使用では、その範囲において、上記の種類ペプチド類似体が天然のIAPP受容体にin vivoで結合し、これを活性化し、これにより糖代謝を調節するものである。

10

【0043】

別の好ましい実施形態では、本発明の使用は、本発明のペプチド類似体、特に短縮された、特にN末端で短縮されたペプチド類似体、好ましくは天然のIAPPの少なくとも8~37個又は少なくとも19~37個、最大で2~37個のアミノ酸を有するか、又はその誘導体であるペプチド類似体を、所望によりインスリン及び/又はIAPP及び/又はプラムリンチドとともに、糖尿病治療用の医薬品の製造のために用いるものであり、その場合ペプチド類似体は糖尿病のIAPP受容体調節治療のための受容体アンタゴニストとして使用され、即ち天然のIAPP受容体にin vivoで結合してこれを阻止し、こうして糖代謝及びIAPPのその他の生理的機能を調節することができる。

20

【0044】

別の好ましい実施形態では、すべての本発明のペプチド類似体又はその抗体はIAPP凝集阻害剤として、特にIAPP-アミロイド斑形成阻害剤として使用される。また別な実施形態では、本発明のペプチド類似体又はその抗体をIAPPの細胞毒性の減少又は阻害のために、特に適当な医薬品の製造のために使用する。別の好ましい実施形態では、受容体アゴニスト又は受容体アンタゴニストのいずれであれ、本発明のペプチド類似体又は本発明の抗体は、同時にa) IAPP凝集又はアミロイド斑形成の減少又は阻止と、b) 糖代謝の調節のための医薬品の製造のために使用される。

30

【0045】

別の好ましい実施形態では、受容体アゴニスト又は受容体アンタゴニストのいずれであれ、本発明のペプチド類似体又は本発明抗体は、同時にa) IAPP又はその凝集体の細胞毒性の減少又は阻止と、b) 糖代謝の調節のためにペプチド類似体又は抗体を利用する医薬品の製造のために使用される。

【0046】

別の好ましい実施形態では、本発明は、アルツハイマー病又はその他のタンパク質凝集病、例えばパーキンソン病又はハンチントン病又はプリオン病の予防又は治療のための医薬品の製造のために利用される上記の種類ペプチド類似体又はその抗体に関し、ペプチド類似体及び/又は抗体が治療又は予防上有効な量で使用され、特にペプチド類似体又はその抗体が凝集体の形成又はアミロイドペプチドのアミロイド斑の形成を減少又は阻止し、もしくはその細胞毒性を減少又は阻止するものである。

40

【0047】

別の好ましい実施形態では、本発明は、a) アルツハイマー病又はその他のタンパク質凝集病例えばプリオン病、パーキンソン病又はハンチントン病及びb) 糖尿病、特にI型糖尿病又はII型糖尿病の同時的予防又は治療のための医薬品の製造のための上記の種類ペプチド類似体又はその抗体に関する。

50

【0048】

別の好ましい実施形態では、アルツハイマー病又はその他のタンパク質凝集病、例えばパーキンソン病、プリオン病又はハンチントン病の予防又は治療、特にa)アルツハイマー病又はその他のタンパク質凝集病、例えばプリオン病、パーキンソン病又はハンチントン病とb)糖尿病の同時治療のための医薬品は、インスリン、プラムリンチド又はIAPPとの混合製剤として提供される。

【0049】

本発明の別の好ましい実施形態は、アルツハイマー病又はその他のタンパク質凝集病、例えばプリオン病、パーキンソン病及び/又はハンチントン病の診断用の診断薬の調製のための本発明のペプチド類似体又は抗体に関する。

10

【0050】

本発明の別の好ましい実施形態は、タンパク質凝集病、特に糖尿病の診断用の診断薬の調製のための本発明のペプチド類似体又は本発明抗体に関する。

【0051】

また本発明は研究目的のための本ペプチド類似体の使用に関する。

【0052】

別の好ましい実施形態では、本発明は、診断、治療及び研究用の抗体、特にモノクロナール又はポリクロナール抗体の調製のための取り扱いやすい免疫原としての本発明のペプチド類似体に関する。

【0053】

別の好ましい実施形態では、本発明は、検出マーカーを備えた本発明のペプチド類似体又は検出マーカーを備えた本発明抗体をプローブとして被検試料とin vivoで、即ちヒト又は動物の生体で、もしくはin vitroで接触させ、ペプチド類似体又は抗体と所望により存在するIAPP又はそのオリゴマー又は凝集体との結合を検出するIAPP又はその凝集体の定性的又は定量的検出方法に関する。

20

【0054】

種々のアミロイド原性ペプチド類似体又はタンパク質、例えば アミロイドペプチド、プリオンタンパク質、ポリグルタミン(ハンチントン病)、 シヌクレイン(パーキンソン病)等の可溶性オリゴマーは同様な空間構造を有するという証拠がある(Kayedら、Science (2003) 300, 486-489)。要するにKayedら(前掲書)は、 アミロイドペプチド(アルツハイマー病)の可溶性オリゴマー構造のモデルに対して作られた抗体は、種々の他のタンパク質、例えばIAPP、 シヌクレイン、プリオンタンパク質断片を認識して、その細胞毒性をin vitroで中和する性質があることを示すことができた。従って本発明の類似体又はその抗体は凝集の変化のため、又は他のアミロイド原性ポリペプチド、例えば アミロイドペプチド、プリオンタンパク質、ポリグルタミン又は シヌクレインの検出のための方法に適している。

30

【0055】

また本発明は、アミロイド原性ペプチド、そのオリゴマー又は凝集体、特にIAPPペプチド、IAPPオリゴマー又はIAPP凝集体の凝集の追跡及び変化、特に定性的又は定量的検出もしくはIAPPペプチド、そのオリゴマー又は凝集体の細胞毒性の阻止のための方法において、本発明のペプチド類似体又はその抗体をin vivo又はin vitroでアミロイド原性ペプチド、そのオリゴマー又は凝集体と接触させ、アミロイド原性ペプチド、そのオリゴマー又は凝集体の凝集挙動を変化し、特に凝集を減少又は阻止し及び/又はそれによって追跡することができる方法(診断)に関する。

40

【0056】

また本発明は、アミロイド原性ペプチド、そのオリゴマー又は凝集体、特に アミロイドペプチド、プリオンタンパク質、 シヌクレイン又はポリグルタミン、そのオリゴマー又はその凝集体の凝集の追跡及び変化、特に定性的又は定量的検出のため、もしくは アミロイドペプチド、プリオンタンパク質、 シヌクレイン又はポリグルタミン又はそのオリゴマー又は凝集体の細胞毒性の阻止のための方法において、本発明のペプチド類似体又

50

はその抗体を *in vivo* 又は *in vitro* でアミロイド原性ペプチド、そのオリゴマー又は凝集体と接触させ、アミロイド原性ペプチド、そのオリゴマー又は凝集体の凝集挙動を変化し、特に凝集を減少又は阻止し、及び/又はそれによって追跡することができる方法（診断）に関する。

【0057】

本発明の別の好ましい実施形態は、液中にある I A P P、ポリグルタミン、シヌクレイン、プリオンタンパク質又はアミロイドペプチドの凝集体形成の修飾、特に阻止のための方法において、本発明のペプチド類似体を液体と接触させ、インキュベーションし、I A P P、プリオンタンパク質、シヌクレイン、ポリグルタミン又はアミロイドペプチドの凝集挙動を修飾する方法に関する。

10

【0058】

本発明のその他の実施形態は従属請求項で明らかである。

【0059】

配列プロトコル：

配列番号は次のことを示す：

配列番号 1 ~ 17 は本ペプチド類似体の好ましい実施形態を示す。個々の配列番号はそれぞれ N メチル化パターンが同じで、一次構造が異なる本発明の複数の異なるペプチド類似体を示す。従って個々の配列番号はいずれも特定の N メチル化パターンを示し、この N メチル化パターンは例えば天然のヒト I A P P の野性種アミノ酸配列又は上記で定義したその誘導体、即ち 1 位のリシン及び/又は 2 位及び 7 位の 2 つのシステイン残基が 1 位のオルニチン（リシンの代わりに）及び/又はアスパラギン酸及び D a p（2 つのシステイン残基の代わりに）によって置換される誘導体の種々の一次構造、即ち種々のアミノ酸配列で現れる。従って個々の配列番号はいずれも、一方では特定の N メチル化パターンを有する天然のヒト野性種 I A P P の一次構造、さらには同じ N メチル化パターンを有する上記の誘導体を表す。2 位及び 7 位に C y s をもつ本発明のペプチド類似体は好ましくは酸化されており、即ち C y s 2 及び C y s 7 のチオール残基の間のジスルフィド架橋が閉じている。

20

【0060】

同様に 2 位及び 7 位に D a p 及び A s p 又は A s p 及び D a p をもつ本発明のペプチド類似体は好ましくは架橋されている。即ち A s p と D a p の側鎖がラクタム架橋により互いに共有結合されている。発明の一実施形態で本発明のすべてのペプチド類似体の C 末端が、好ましい実施形態ではアミドをなす。

30

【0061】

配列番号と、下記の実施例で使用する好ましいペプチド類似体の略称との対応関係が実施例 8 で明らかである。

【0062】

配列番号 18 は天然のヒト I A P P のアミノ酸配列を示す。

【0063】

下記の実施例及び後述する図面に基づいて発明をより詳細に説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0064】

【実施例 1】

【0065】

本発明のペプチド類似体の溶解度特性の特徴づけ及び I A P P との比較

天然の I A P P と比較した本発明のペプチド類似体の溶解度特性を沈降試験、電子顕微鏡研究及びチオフラビン T 結合試験により調べた。

【0066】

a) 類似体の溶解度を I A P P と比較して検査するために沈降試験を使用した。沈降又は溶解ペプチドの量は経時的に測定した。代表試験として、まず 10 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 4) 中の所定の濃度 (1、10 又は 100 μ M) のペプチド溶液を調

50

製した。所定の時点でこの溶液のアリコートを遠心分離し(20200g、20分)、ペレットと上清の沈降タンパク質をBCAタンパク質決定アッセイ(BCAはビシンコニン酸を表す)により定量化した。図1にこの試験の幾つかの結果を示す。この図で分かるように、濃度10 μ MでのIAPPの凝集は溶液の調製の直後に始まる。20時間後にIAPPは完全に沈降していた。これに対してNメチル化類似体、IAPP-LA、IAPP-GI及びIAPP-AFは濃度100 μ Mでも14日間溶解していた。IAPPは後者の条件(100 μ M)で僅か2時間後に完全に沈降した。

【0067】

b) 様々なタンパク質種のアミロイド細繊維は色素ThTを結合し、その蛍光放出最大値の増加をもたらす。それゆえThT結合は、アミロイド細繊維の定量化のために広範な用途で使用される特異的テストである。類似体のアミロイド結合能力をIAPPと比較して測定するために、このテストを使用した。このテストのためにアッセイ緩衝液中62.5 μ Mの濃度の類似体及びIAPPをインキュベーションした(2%HFIP、10mMトリス、pH7.4)。所定の時点でこのインキュベーション物の40mlのアリコートを160mlの5 μ M-ThT溶液(0.1Mグリシン-NaOH緩衝液、pH8.5中の)に添加し、かき混ぜ、450nmで励起の後に485nmで溶液の放出を測定した。

10

【0068】

その場合IAPPはすでに625nMの濃度で細繊維を形成することが判明した。これに対して類似体は62.5 μ Mの濃度でもなお細繊維を形成しなかった(図2)。

【0069】

c) 電子顕微鏡研究のために類似体とIAPPの5 μ M溶液(1%HFIPを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4中の)を室温で約20時間インキュベーションした。次に10 μ lの溶液を電子顕微鏡プレートに塗布し、前述のように(Kayed, J.Mol.Biol.(1999) 287, 781-796) 1%酢酸ウラニルで染色した後、細繊維の有無を電子顕微鏡で調べた。主としてIAPPアミロイド細繊維からなるIAPP溶液と対照的に、IAPP類似体の溶液は細繊維を含まないことが明らかになった(図3)。

20

【0070】

これらのデータはThT結合アッセイ及び沈降アッセイの結果とともに、類似体はアミロイド原性がなく、IAPPの少なくとも100倍の溶解度を有することを示す。

【実施例2】

30

【0071】

IAPPと比較した類似体の細胞毒性の研究

IAPPアミロイド凝集体は膵臓細胞及びその他の一連の細胞に対して細胞毒性を有する。IAPP及びその他のアミロイドポリペプチドの細胞毒性効果はアミロイドへの凝集を伴って現れることが前提となる。このことから、類似体はアミロイド原性がないので細胞毒性もないはずであるという仮定がでてくる。この仮定を検証するために、MTT細胞毒性テストを使用した。このテストは無傷のレドックス電位をもつ「健全な」細胞による色素3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)の還元に基づいている(Shearmanら、J. Neurochem. (1995) 65, 218-227; Shearmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, 1470-74)。これは細胞生存性又は障害の初期指示薬である。IAPPを含むアミロイド凝集体の細胞毒性効果をこのテストにより定量化できることが判明した。IAPP及び類似体の細胞毒性を膵臓細胞株RIN5fmに基づき前述のように調べた(Kapurniotouら、J. Mol. Biol. (2002) 315, 339-350)(図4)。代表的なMTTテストで、ペプチドのインキュベーション物を調合し(1%HFIPを含む又は含まない10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中の5 μ M)、室温で20時間後に細胞(20時間前に5 \times 10⁵/mlの細胞密度で播種した)に加えた。細胞とともに約20時間インキュベーションした後、MTTをこれに加え、2時間作用させた後、細胞のMTT還元電位を分光測光法で測定した。結果は、対照細胞によるMTT還元のパーセントに相当する%細胞生存性として示され(MTTの100%還元は100%生存性に相当する)、少なくとも2つの独立のテストの平均値

40

50

(\pm SEM [標準誤差]) に相当する。

【0072】

図4で分かるように、類似体 IAPP-AL、IAPP-GI及びIAPP-FAはIAPPと対照的に細胞毒性を示さなかった。

【実施例3】

【0073】

IAPPのアミロイド形成能力の阻害剤又はモジュレーターとしての類似体の効果

IAPPのアミロイド形成能力に対する類似体の効果をEM(電子顕微鏡)及びThT結合テストで調べた。

【0074】

代表的なThT結合テストの出発点としてアッセイ緩衝液(10mMトリス、pH7.4及び2%HFIP)中の6.25 μ M-IAPPを単独で、又は類似体との1/1混合物で含むインキュベーション物を調合した。所定の時点で溶液のアリコートを上記のようにThTと混合し、その蛍光放出を検査した。図5で明らかのように、類似体はIAPPのアミロイド形成能力に対して強い阻害効果を有する。

【0075】

電子顕微鏡で追跡した代表的な凝集テストにおいて、IAPP(5 μ M)を単独で、又は類似体(1/1の割合)の存在下でインキュベーションした(1%HFIPを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中で)。20時間後に10 μ lの溶液を電子顕微鏡プレートに塗布し、上記のように1%酢酸ウラニルで染色した後(Kayed, J. Mol. Biol. (1999) 287, 781-96)、細繊維の存在を電子顕微鏡で調べた。主としてIAPP-アミロイド細繊維からなるIAPP溶液とは対照的に、IAPP-類似体混合物では細繊維の形成が完全に抑制されていた(図6)。

【実施例4】

【0076】

IAPPの細胞毒性の阻害剤としての類似体の効果

IAPP-アミロイド凝集体の細胞毒性に対する類似体IAPP-GI、IAPP-AL及びIAPP-FAの効果を2つの異なるテストで調べた。まずMTT-細胞生存性テストを使用した(上記を参照)。テストが示したところでは、IAPP/ペプチド類似体混合比1/1ですべての類似体はIAPPの細胞毒性を著しく阻止することができる(図7A)。その場合IAPP-GIはIAPP細胞毒性の最も強い阻害剤であることが証明された。

【0077】

第2のテストではIAPP-アミロイドによって引き起こされるアポトーシス細胞死に対するIAPP-GIの効果を調べた(IAPP仲介性細胞死は主としてアポトーシスによって引き起こされることが知られている)。そのためにIAPPの溶液を単独で、及びIAPP-GI(1/1)(10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中5 μ M)の存在下で調製し、平板培養した細胞とともに500nMの最終濃度で20時間インキュベーションした。次に市販のアポトーシスELISA(RocheのCell Death Detection Kit)によりアポトーシスを定量化した。このELISAアッセイによって、アポトーシス細胞死の早期の特異的な証拠である細胞質ゾルヌクレオソームが定量化された。このテストも、IAPP-GIは膵臓細胞をIAPP誘導性アポトーシス細胞死から守る性質があることを示した(図7B)。

【実施例5】

【0078】

IAPP受容体アゴニストとしての類似体の効果

(ヒト)IAPP受容体アゴニストとしての類似体の効果をテストするために、まずこの受容体を発現する細胞で受容体結合アフィニティーをテストした。このような細胞はヒト乳癌細胞に由来するMCF-7細胞株である(Zimmermannら、J. Endocrinology (1997), 155, 423-31)。特異的IAPP受容体がMCF-7細胞株で発現されるため、この細

10

20

30

40

50

胞株は I A P P アゴニスト / アンタゴニストのテストに広く適用される。

【 0 0 7 9 】

受容体結合テストを Zimmermann ら、J. Endocrinology (1997), 155, 423-31 に記載されたのと同様に行った。今まで知られている最強の受容体リガンドである 125 I 標識ラット I A P P (r I A P P) 配列を I A P P 又はペプチド類似体 I A P P - G I、I A P P - A L 又は I A P P - F A の存在下で定量的に測定した。種々の最終濃度 (図 8 A) の放射性標識リガンド r I A P P (~ 8 0 p M) と当該のペプチドの混合物を M C F - 7 細胞とともに室温で 1 時間インキュベーションした。次に細胞をテスト用緩衝液 (テスト用緩衝液は 0 . 1 % B S A を含む Dulbecco MOD Eagle と F 1 2 栄養混合物 (H A M) の 1 / 1 混合物からなる) で洗浄し、N a O H (0 . 5 M) と、続いてシンチレーション液と混合し、膜結合放射能をシンチレーションカウンターで測定した。図 8 A で明らかなように、ここでテストした 3 つのすべての類似体は、I A P P 受容体を結合することができた。そ I A P P - A L は最高の受容体アフィニティーを有するアゴニストであり、I A P P - G I は最も弱いアゴニストであることが示された (図 8 A) 。

10

【 0 0 8 0 】

続いて類似体のアゴニスト能力をテストするために、アデニルシクラーゼ活性化能力 (A C 活性化) をテストした。I A P P の受容体仲介性生物学的効果の幾つかはアデニルシクラーゼ活性化によって仲介されることが判明している。A C 活性化は、種々の濃度の I A P P 又は類似体で細胞を処理した後 (1 5 分、3 7) に産生される c A M P を c A M P B i o - t r a k E L I S A (A m e r s h a m) で定量化することによって測定される。テストは Zimmermann ら、J. Endocrinology (1997) (前掲箇所) の記録と同様に M C F - 7 細胞で行う。図 8 B で明らかなように、テストしたすべての類似体 (I A P P - G I、I A P P - A L、I A P P - F A) は完全 I A P P アゴニストであった。I A P P - A L は最も有力なアゴニストであり、I A P P より優れた A C 活性化リガンドであることが示された。I A P P - A F は I A P P と同様な A C 活性化能力を有し、I A P P - G I は I A P P より弱いアゴニストである。

20

【 0 0 8 1 】

このように A C 活性化テストの結果は受容体結合テストの結果と一致する。

【 実施例 6 】

【 0 0 8 2 】

I A P P と比較した溶液 (濃度 1 m g / m l、p H 7 . 4) 中の安定性及び生体活性 (ホルモン効果) の維持の比較 : 治療での I A P P 代替物としての可能な使用

糖尿病及び / 又はその他の疾病の治療で I A P P 又はブラムリンチド代替物として類似体を使用する可能性について、その溶液の安定性及びそのホルモン作用を、凝集しやすい I A P P と比較して調べた。代表調合物では I A P P、I A P P - A L、I A P P - G I の水溶液又は 1 0 μ m リン酸ナトリウム (p H 7 . 4) 中の類似体と I A P P (2 5 0 μ M 又は 1 m g / m l) の 1 / 1 混合物を室温で使用し、4 日間インキュベーションする。この溶液の A C 活性化能力を種々の時点で、例えば 0、4 8 及び 9 6 時間に前述の A C 活性化アッセイにより測定した (細胞の最終濃度 1 μ M、最大活性化に相当) (図 9) 。

30

【 0 0 8 3 】

この実験は、I A P P は上記の条件で貯蔵すると、その当初のホルモン作用の半分以上が失われる (おそらくその凝集のため) ことを示した。これに対し、類似体及び I A P P / 類似体混合物 (1 / 1) のホルモン作用は完全に維持された。選んだ 1 m g / m l の濃度は、Amylin Pharmaceuticals 社が糖尿病の治療のために臨床研究で使用する Symlin (酢酸ブラムリンチド) 製剤の濃度に相当する。

40

【 実施例 7 】

【 0 0 8 4 】

アルツハイマー・ペプチド、アミロイドペプチド (A -) の細胞毒性に対する類似体の阻害効果 : アルツハイマー病 (A D) の治療のための可能な使用

A - の細胞毒性に対する I A P P - G I (1 / 1 混合物) の効果を M T T テストで調

50

べた。このために、A - (1 0 0 μ M) を単独で、又は I A P P - G I とともに、1 5 0 m M - N a C l 及び 2 . 2 % H F I P を含む 1 0 m M トリス緩衝液 (p H 7 . 4) 中で室温で 4 日間インキュベーションした。次に希釈後に溶液を P C - 1 2 及び H T B - 1 4 細胞に加えた。2 つの細胞株は A - 細胞毒性阻害剤候補の阻害効果の検査のためにしばしば使用される。実際に I A P P - G I は A - ペプチドの細胞毒性を大幅に低下し得ることが、2 つの細胞株で明らかになった (図 1 0) 。 A - と I A P P - G I の相互作用が別の結合テストで確認された。すなわち、I A P P - G I 及びその他の N メチル化 I A P P 類似体はアルツハイマー病 (A D) の治療に特に適している。

【実施例 8】

【0085】

本発明のペプチド類似体

【表 1】

並び番号	略称	一次構造	名称
1	IAPP-GI	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFN(N-Me)GA(N-Me)ILSSTNVGSNTY	[(N-Me)G ²⁴ ,(N-Me)I ²⁶]-IAPP
2	IAPP-AL	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFG(N-Me)AI(N-Me)LSSTNVGSNTY	[(N-Me)A ²⁵ ,(N-Me)I ²⁷]-IAPP
3	IAPP-EA	KCNTATCATQRLANFLYHSSNN(N-Me)FG(N-Me)AALSSTNVGSNTY	[(N-Me)F ²³ ,(N-Me)A ²⁵]-IAPP
4	IAPP-IL	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFGA(N-Me)I(N-Me)LSSTNVGSNTY	[(N-Me)I ²⁶ ,(N-Me)I ²⁷]-IAPP
5	IAPP-AIL	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFG(N-Me)A(N-Me)I(N-Me)LSSTNVGSNTY	[(N-Me)A ²⁵ ,(N-Me)I ²⁶ ,(N-Me)I ²⁷]-IAPP
6	IAPP-GA	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFN(N-Me)G(N-Me)AALSSTNVGSNTY	[(N-Me)G ²⁴ ,(N-Me)A ²⁵]-IAPP
7	IAPP-AI	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFG(N-Me)A(N-Me)ILSSTNVGSNTY	[(N-Me)A ²⁵ ,(N-Me)I ²⁶]-IAPP
8	IAPP-NG	KCNTATCATQRLANFLYHSSNN(N-Me)NF(N-Me)GALSSTNVGSNTY	[(N-Me)N ²² ,(N-Me)G ²⁴]-IAPP
9	IAPP-FG	KCNTATCATQRLANFLYHSSNN(N-Me)F(N-Me)GALSSTNVGSNTY	[(N-Me)F ²³ ,(N-Me)G ²⁴]-IAPP
10	IAPP-GAIL	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFN(N-Me)G(N-Me)I(N-Me)LSSTNVGSNTY	[(N-Me)G ²⁴ ,(N-Me)A ²⁵ ,(N-Me)I ²⁶ ,(N-Me)I ²⁷]-IAPP
11	IAPP-F	KCNTATCATQRLANFLYHSSNN(N-Me)FGALSSTNVGSNTY	[(N-Me)F ²³]-IAPP
12	IAPP-G	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFN(N-Me)GALSSTNVGSNTY	[(N-Me)G ²⁴]-IAPP
13	IAPP-A	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFG(N-Me)AALSSTNVGSNTY	[(N-Me)A ²⁵]-IAPP
14	IAPP-I	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFGA(N-Me)IALSSTNVGSNTY	[(N-Me)I ²⁶]-IAPP
15	IAPP-L	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFGAI(N-Me)LSSTNVGSNTY	[(N-Me)I ²⁷]-IAPP
16	IAPP-SS	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFGAIL(N-Me)S(N-Me)STNVGSNTY	[(N-Me)S ²³ ,(N-Me)S ²⁹]-IAPP
17	IAPP-ASS	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFG(N-Me)AIL(N-Me)S(N-Me)STNVGSNTY	[(N-Me)A ²⁵ ,(N-Me)S ²³ ,(N-Me)S ²⁹]-IAPP
18	IAPP	KCNTATCATQRLANFLYHSSNNFGALSSTNVGSNTY	天然のヒトIAPP

本発明に係るペプチド類似体は、Fmoc/tBu戦略を使用してRINK-アミド-MBHA樹脂による慣用の固相ペプチド合成法で簡単な化学合成により高い純度と良好な収量で調製された(Kazantzisら、Eur. J. Biochem. (2002) 269, 780-791)。代表的な合成ではN-Fmoc-保護アミノ酸(側鎖保護は次の通り:Lys(Boc)、Cys(Tet)、Arg(Pmc)、Asn(Tet)、His(Tet)、Ser(tBu)、Tyr(tBu)、Thr(tBu))が使用された。Nメチル化Fmoc-アミノ酸はこの形(例えばFmoc-(N-Me)Ile; Fmoc-(N-Me)Gly等)でも使用された。Fmoc-アミノ酸(AS)の結合はDMF及び/又はNMP中でTBTU及びDIEA(C末端ASのモル数の4倍の過剰AS、4倍の過剰TBTU、6倍の過剰DIEA)で行われた。Nメチル化AS又はNメチル化ASへの結合には、2倍~x倍に及ぶ大過剰の結合、結合数、溶媒の混合物及び長い結合時間が使用された。Fmoc基の開裂はDMF中で25%ピペリジンによって行われた。樹脂からのペプチドの分離は混合物TFA/水/チアニゾール/エタンジチオール/フェノール(83/4.5/2/6(v/v/v/v/w))で行われた(Kazantzisら、Eur. J. Biochem. (2002) 269, 780-791)。濾過により樹脂をペプチド溶液から分離し、溶媒を蒸発し、10%HAcに受けてエーテルで抽出し、含水相を凍結乾燥した後、還元した形で粗生成物が得られた。Cys²/Cys⁷のジスルフィド架橋の結合は、3MのGdnHClを含む0.1M-NH₄HCl₃中で行われ、2-4時間かかった。粗生成物を酸化の後に再び逆相クロマトグラフィーによりC¹⁸カラムでACN含有勾配により高純度に精製した(Kazantzisら、前掲書)。

10

【図面の簡単な説明】

【0087】

20

【図1】図1は、IAPP(10及び100µM)及び類似体IAPP-GI、IAPP-AL、IAPP-FA、IAPP-ILの沈降アッセイの吸収を示す。570nmでの吸収は(ペレット又は上清の)タンパク質の量に相当する。

【図2】図2は、細繊維結合テストの結果を示す:62.5µMのIAPPと62.5µMのIAPP-GI、IAPP-AL及びIAPP-ILの細繊維結合能力をThT結合アッセイにより定量化した。

【図3】図3は、IAPP及び類似体IAPP-GI、IAPP-AL及びIAPP-FAのアミロイド原性潜在力の電子顕微鏡研究の結果を示す。電子顕微鏡に基づく凝集テストによりペプチドのインキュベーション物(5µM、20時間)を調べた。左から右へ、下記のインキュベーション物のアリコートを示す:IAPP単独、IAPP-GI、IAPP-FA及びIAPP-AL(横棒:100nm)。

30

【図4】図4は、IAPPと比較した類似体IAPP-GI、IAPP-AL、IAPP-FAの潜在細胞毒性効果の決定のためのMTT-還元アッセイの結果を示す。

【図5】図5は、細繊維結合テストの結果を示す:IAPP(6.25µM)の細繊維結合能力に対するIAPP-GI、IAPP-AL及びIAPP-FA(1/1混合物)の効果をThT結合アッセイによって定量化した。

【図6】図6は、凝集テストの結果を示す:IAPP(5µM)の細繊維結合能力に対するIAPP-GI、IAPP-AL及びIAPP-FA(1/1混合物)の効果を電子顕微鏡に基づく凝集アッセイにより調べた。左から右へ、下記のインキュベーション物のアリコートを示す(20時間):IAPP単独、IAPPとIAPP-GIの混合物、IAPPとIAPP-FAの混合物及びIAPPとIAPP-ALの混合物。

40

【図7】図7Aは、IAPPの膵臓細胞毒性(RIN5f細胞株)に対する類似体IAPP-GI、IAPP-AL及びIAPP-FAの効果を決定するためのMTT-還元アッセイの結果を示す。図7Bは、単独及びIAPP-GI(1/1)の存在下のIAPP誘導性アドプトーシスの決定を示す。同じ条件でIAPP-GI単独もテストしたが、細胞毒性は認められなかった。少なくとも2つの独立したアッセイの平均値(±SEM)を示す。

【図8】図8Aは、MCF-7細胞でIAPP及び類似体IAPP-GI、IAPP-AL及びIAPP-FAによる(ヒト)IAPP受容体結合アッセイの結果を示す。ラジオリガンド[¹²⁵I]-rIAPPの特異的結合をリガンド濃度に対してプロットする。

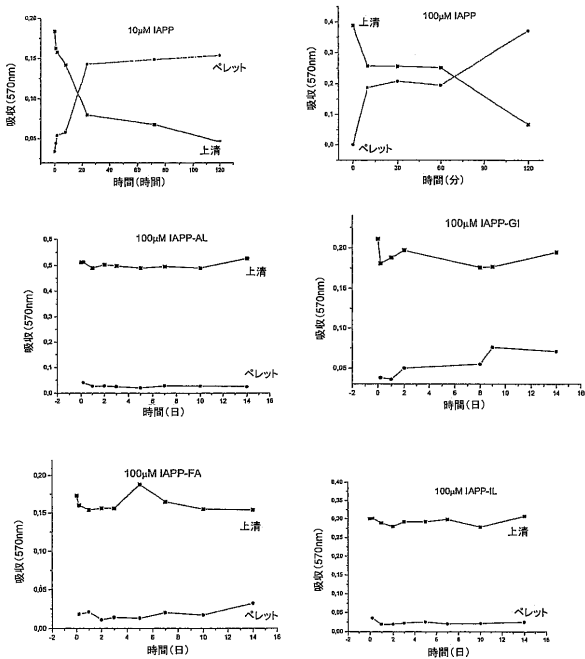
50

図 8 B は、MCF-7 細胞で IAPP 及び類似体 IAPP-GI、IAPP-AL 及び IAPP-FA による受容体活性化アッセイの結果を示す。cAMP Biotrak ELISA(Amersham) で cAMP を定量化することによってアデニルシクラーゼ活性化 (最大の%) を測定した。1 μ M の IAPP で得られた活性化を最大 AC 活性化とみなした。

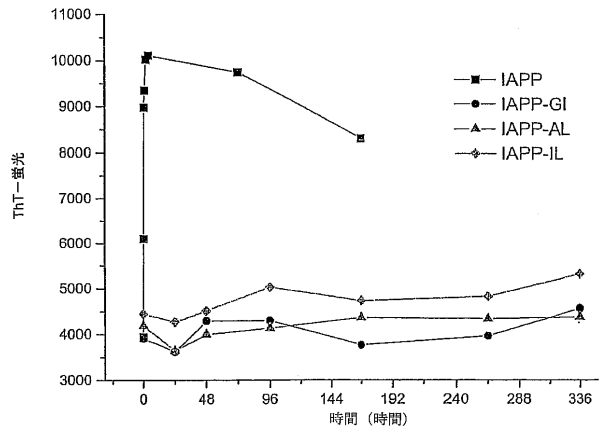
【図 9】図 9 は、ELISA の結果を示す: RT (室温) で 4 日静置した 250 μ M の IAPP 溶液 (10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4 中の) の MCF-7 細胞での受容体活性化能力の時間依存性を類似体 IAPP-GI 及び IAPP-LA 並びに類似体と IAPP の混合物の受容体活性化能力と比較する。cAMP Biotrak ELISA(Amersham) で cAMP を定量化することによってアデニルシクラーゼ活性化 (最大の%) を測定した。1 μ M の IAPP で得られた活性化を最大 AC 活性化とみなした。

【図 10】図 10 は、A- (PC12 細胞株) の細胞毒性に対する類似体 IAPP-GI の効果を決定するための MTT-還元テストの結果を示す。結果は代表的なアッセイ (3 回の決定) の平均値 (\pm SEM) である。

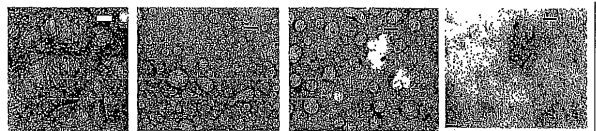
【 図 1 】



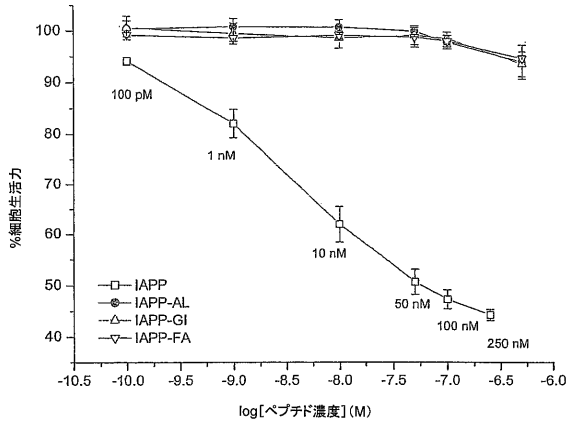
【 図 2 】



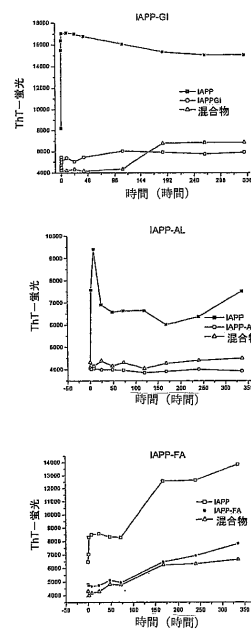
【 図 3 】



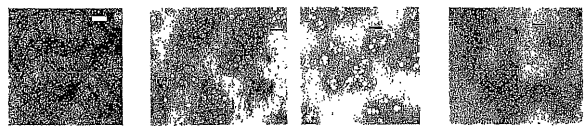
【 図 4 】



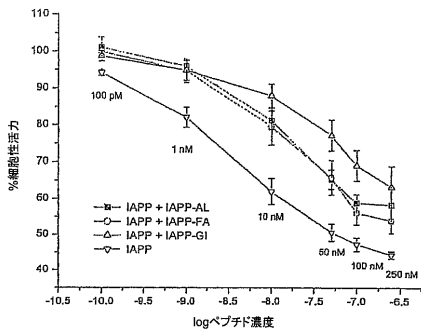
【 図 5 】



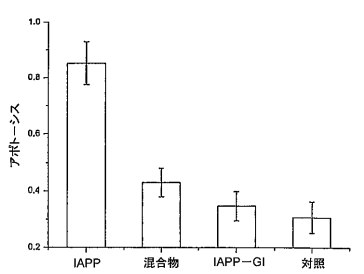
【 図 6 】



【 図 7 】

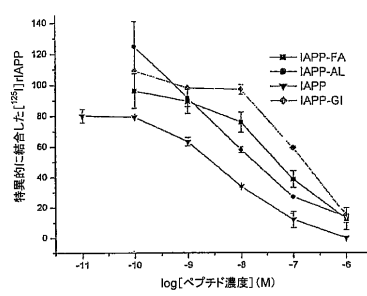


7A

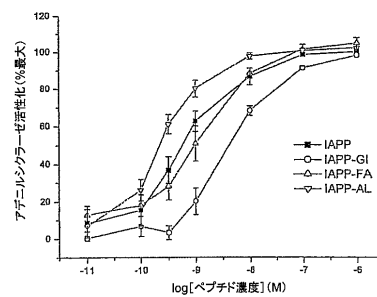


7B

【 図 8 】

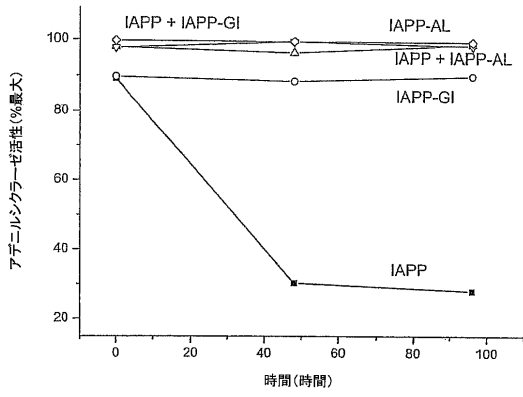


8A

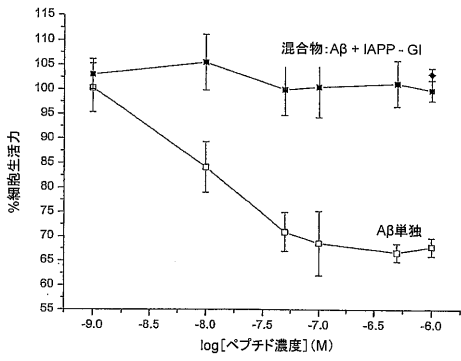


8B

【 図 9 】



【 図 10 】



【 配列表 】

2008517885000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2005/011211
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/575 C07K16/18 G01N33/53 A61K38/17		
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) C07K A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 580 953 A (ALBRECHT ET AL) 3 December 1996 (1996-12-03) abstract column 1, line 35 - column 2, line 1 column 5, line 63 - column 6, line 27 column 7, lines 12-25 column 12, line 16 - column 13, line 42 -----	1-4,6,7, 9-15,20, 22-25, 27, 29-31,42
X	EP 0 263 802 A (WESTERMARK, PER; UNIVERSITY OF MINNESOTA) 13 April 1988 (1988-04-13) abstract page 2, lines 41-55 page 3, line 28 - page 4, line 36 ----- -/--	19,20, 22, 24-26,40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 document 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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 March 2006		13 09 2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montrone, Marco

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/011211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5580953	A	03-12-1996	NONE
EP 0263802	A	13-04-1988	AT 123147 T 15-06-1995 AU 8101287 A 06-05-1988 CA 1341222 C 01-05-2001 DE 3751316 D1 29-06-1995 DE 3751316 T2 01-02-1996 ES 2072252 T3 16-07-1995 JP 2939439 B2 25-08-1999 JP 9119929 A 06-05-1997 JP 2500857 T 22-03-1990 JP 2863527 B2 03-03-1999 SE 454299 B 18-04-1988 WO 8802863 A1 21-04-1988 US 5116948 A 26-05-1992 US 5112945 A 12-05-1992
US 2002119926	A1	29-08-2002	NONE

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/011211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KANATSUKA A ET AL: "ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE AND ITS N-TERMINAL AND C-TERMINAL FLANKING PEPTIDES" IMMUNOREACTIVITY IN ISLET AMYLOID OF DIABETIC PATIENTS" DIABETES RESEARCH AND CLINICAL PRACTICE, AMSTERDAM, NL, vol. 26, no. 2, 1994, pages 101-107, XP001056212 ISSN: 0168-8227 abstract</p> <p>-----</p>	19,37,38
A	<p>US 2002/119926 A1 (FRASER PAUL) 29 August 2002 (2002-08-29)</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/011211

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:

Although claim 41 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

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:

See supplemental 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

1-43 (all in part)

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the 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/EP2005/011211**PCT/EP2005/011211**
PCT/ISA/210

Although claim 41 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims: 1-43 (all in part)

Functional peptide analog of IAPP with at least one N-methylated amide bond.

2. Claims: 1-43 (all in part)

Functional peptide analog of IAPP with at least one N-methylated amide bond comprising an additional amino acid substitution on position 1; Lsy to Orn and all variants containing said substitution.

3. Claims: 1-43 (all in part)

Functional peptide analog of IAPP with at least one N-methylated amide bond comprising an additional amino acid substitution on position 2; Cys to Asp or diaminopropionic acid and all variants containing said substitution.

4. Claims: 1-43 (all in part)

Functional peptide analog of IAPP with at least one N-methylated amide bond comprising an additional amino acid substitution on position 7; Cys to Asp or diaminopropionic acid and all variants containing said substitu...

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/011211

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C07K14/575 C07K16/18 G01N33/53 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoß (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C07K A61K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Behr. Anspruch Nr.
X	US 5 580 953 A (ALBRECHT ET AL) 3. Dezember 1996 (1996-12-03) Zusammenfassung Spalte 1, Zeile 35 - Spalte 2, Zeile 1 Spalte 5, Zeile 63 - Spalte 6, Zeile 27 Spalte 7, Zeilen 12-25 Spalte 12, Zeile 16 - Spalte 13, Zeile 42	1-4, 6, 7, 9-15, 20, 22-25, 27, 29-31, 42
X	EP 0 263 802 A (WESTERMARK, PER; UNIVERSITY OF MINNESOTA) 13. April 1988 (1988-04-13) Zusammenfassung Seite 2, Zeilen 41-55 Seite 3, Zeile 28 - Seite 4, Zeile 36 -/--	19, 20, 22, 24-26, 40

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"I" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. März 2006

Abschließendes Datum des internationalen Recherchenberichts

13.09.2006

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2260 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Montrone, Marco

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/EP2005/011211

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Anspruch 41 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung.
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
 1-43 (alle teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/ EP2005/ 011211

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-43(alle teilweise)

Funktionelles Peptidanalogen des IAPP mit mindestens einer N-methylierten Amidbindung.

2. Ansprüche: 1-43(alle teilweise)

Funktionelles Peptidanalogen des IAPP mit mindestens einer N-methylierten Amidbindung mit einem zusätzlichen Aminosäureaustausch an Position 1: Lsy nach Orn und alle Varianten die diesen Austausch enthalten.

3. Ansprüche: 1-43(alle teilweise)

Funktionelles Peptidanalogen des IAPP mit mindestens einer N-methylierten Amidbindung mit einem zusätzlichen Aminosäureaustausch an Position 2: Cys nach Asp oder Diaminopropionsäure und alle Varianten die diesen Austausch enthalten.

4. Ansprüche: 1-43(alle teilweise)

Funktionelles Peptidanalogen des IAPP mit mindestens einer N-methylierten Amidbindung mit einem zusätzlichen Aminosäureaustausch an Position 7: Cys nach Asp oder Diaminopropionsäure und alle Varianten die diesen Austausch enthalten.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/011211

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>KANATSUKA A ET AL: 'ISLET AMYLOID POLYPEPTIDE AND ITS N-TERMINAL AND C-TERMINAL FLANKING PEPTIDES' IMMUNOREACTIVITY IN ISLET AMYLOID OF DIABETIC PATIENTS" DIABETES RESEARCH AND CLINICAL PRACTICE, AMSTERDAM, NL, Bd. 26, Nr. 2, 1994, Seiten 101-107, XP001056212 ISSN: 0168-8227 Zusammenfassung</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	19,37,38
A	<p>US 2002/119926 A1 (FRASER PAUL) 29. August 2002 (2002-08-29)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/011211

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5580953	A	03-12-1996	KEINE
EP 0263802	A	13-04-1988	AT 123147 T 15-06-1995
		AU 8101287 A 06-05-1988	
		CA 1341222 C 01-05-2001	
		DE 3751316 D1 29-06-1995	
		DE 3751316 T2 01-02-1996	
		ES 2072252 T3 16-07-1995	
		JP 2939439 B2 25-08-1999	
		JP 9119929 A 06-05-1997	
		JP 2500857 T 22-03-1990	
		JP 2863527 B2 03-03-1999	
		SE 454299 B 18-04-1988	
		WO 8802863 A1 21-04-1988	
		US 5116948 A 26-05-1992	
		US 5112945 A 12-05-1992	
US 2002119926	A1	29-08-2002	KEINE

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	38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K	38/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K 37/26	
A 6 1 K	9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K	9/20 (2006.01)	A 6 1 K 9/12	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/20	
A 6 1 P	5/48 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P	5/50 (2006.01)	A 6 1 P 5/48	
		A 6 1 P 5/50	
		A 6 1 P 43/00	1 0 7

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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

(74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節

(74)代理人 100119183
弁理士 松任谷 優子

(72)発明者 ベルナーゲン, ユールゲン
ドイツ連邦共和国 5 2 0 6 6 アーヘン, ロンハイダー ヴェーク 6 0

(72)発明者 カプルニオトゥ, アフロディティ
ドイツ連邦共和国 5 2 0 6 6 アーヘン, ロンハイダー ヴェーク 6 0

F ターム(参考) 4C076 AA12 AA24 AA36 AA94 BB01 BB11 CC01 CC21 CC30
4C084 AA02 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA44 CA59 DB33 MA02
MA13 MA17 MA52 MA66 NA14 ZA15 ZA16 ZB22 ZC03 ZC35
ZC37 ZC41 ZC42
4C085 AA13 AA14 BB07 CC21 EE01 EE03 GG01 GG08
4H045 AA11 AA30 BA19 CA40 DA75 EA20 EA50

专利名称(译)	化学修饰的肽类似物		
公开(公告)号	JP2008517885A	公开(公告)日	2008-05-29
申请号	JP2007537192	申请日	2005-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	伯爵Weserblick带硬亚琛 弗劳恩霍夫应用研究促进协会		
申请(专利权)人(译)	伯爵Weserblick带硬亚琛 弗劳恩霍夫Geseru轴工具无法删除链接泽德Angevanten Forushunku呃粮农组织.		
[标]发明人	ベルナーゲンユールゲン カプルニオトウアフロディティ		
发明人	ベルナーゲン,ユールゲン カプルニオトウ,アフロディティ		
IPC分类号	C07K14/47 C07K16/18 G01N33/53 A61K38/00 A61P25/28 A61K38/22 A61P3/10 A61P25/16 A61P25/14 A61K39/395 A61K38/28 A61K9/08 A61K9/12 A61K9/20 A61P43/00 A61P5/48 A61P5/50		
CPC分类号	A61P3/10 A61P5/48 A61P5/50 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P43/00 C07K14/4711 G01N33/6896		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C07K16/18 G01N33/53.D A61K37/02 A61P25/28 A61K37/24 A61P3/10 A61P25/16 A61P25/14 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K37/26 A61K9/08 A61K9/12 A61K9/20 A61P43/00.111 A61P5/48 A61P5/50 A61P43/00.107		
F-TERM分类号	4C076/AA12 4C076/AA24 4C076/AA36 4C076/AA94 4C076/BB01 4C076/BB11 4C076/CC01 4C076/CC21 4C076/CC30 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA44 4C084/CA59 4C084/DB33 4C084/MA02 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA15 4C084/ZA16 4C084/ZB22 4C084/ZC03 4C084/ZC35 4C084/ZC37 4C084/ZC41 4C084/ZC42 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB07 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA19 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	松任谷裕子		
优先权	102004051014 2004-10-20 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过使用IAPP肽衍生物治疗糖尿病和阿尔茨海默氏病的改良剂和方法。

顺 号	一 概 括	参 考
1	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
2	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
3	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
4	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
5	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
6	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
7	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
8	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
9	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
10	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
	GLT	
11	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
12	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
13	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
14	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
15	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
16	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
17	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT
18	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT	KKKTCGKQVAVTSSSSQVFAKPKGKSSVSTNT