(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5190957号
(P5190957)
(45)発行日　平成25年4月24日(2013.4.24)　(24)登録日　平成25年2月8日(2013.2.8)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 7/08	(2006.01)	C07K	7/08	ZNA
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
C07K 14/00	(2006.01)	C07K	14/00	
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61P 25/28	(2006.01)	A61P	25/28	

請求項の数 5　(全 28 頁)

(21)出願番号　特願2008-513322(P2008-513322)
(86)(22)出願日　平成19年4月24日(2007.4.24)
(86)国際出願番号　PCT/JP2007/059350
(87)国際公開番号　WO2007/126111
(87)国際公開日　平成19年11月8日(2007.11.8)
審査請求日　平成21年4月27日(2009.4.27)
(31)優先権主張番号　特願2006-125769(P2006-125769)
(32)優先日　平成18年4月28日(2006.4.28)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

前置審査

(73)特許権者　504258527
国立大学法人　鹿児島大学
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目２１番２４号
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100101904
弁理士　島村　直己
(72)発明者　杉村　和久
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目２１番２４号
国立大学法人鹿児島大学内

審査官　松田　芳子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アミロイドβ線維化阻害ペプチド

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号９～１５のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペプチド。
【請求項２】
請求項１記載のペプチドに対応するアミノ酸配列と、次式：
Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg
で示されるＴＡＴ配列とを含む、アミノ酸残基数２３～３０のペプチドであって、請求項１記載のペプチドに対応するアミノ酸配列が、前記アミノ酸残基数２３～３０のペプチドのアミノ末端側又はカルボキシル末端側に存在するペプチド。
【請求項３】
請求項１又は２記載のペプチドを含有する医薬組成物。
【請求項４】
請求項１又は２記載のペプチドを含有するアミロイドβ線維化阻害剤。
【請求項５】
アルツハイマー病の予防・治療剤である請求項４記載のアミロイドβ線維化阻害剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、アルツハイマー病の予防・治療剤として有用なアミロイドβ線維化阻害ペプチドに関する。

【背景技術】
【０００２】
近年、老人人口の増加に伴い、老人性痴呆症の治療に有効な医薬品の開発が強く望まれている。老人性痴呆症の代表的疾患であるアルツハイマー病は、脳の萎縮、老人斑の沈着及び神経原線維変化を特徴とする神経変性疾患で、アミロイドβペプチドの形状変化と、それに伴う線維化による不溶化分子が神経細胞に沈着し、その毒性により神経細胞の死が誘導され、発症する。
アミロイドβペプチド（Ａβ）はニューロンアミロイド前駆体蛋白質からβセクレターゼなどによる切断で生じる分解物で、Ａβ１－４０とＡβ１－４２の２種が生成するが、Ａβ１－４２の方がより凝集しやすく、疾患及び神経毒性と相関することが報告されている。
アミロイドβペプチドの形状変化及び線維化を阻害できれば、アルツハイマー病の発症を阻止することができる。
国際公開第２００５／１０５９９８号パンフレットには、Ａβ１－４２と特異的に結合し、その線維化反応を阻害する活性を有する一本鎖抗体がアルツハイマー病の予防・治療剤として有用であることが記載されている。
しかしながら、抗体は高分子の蛋白質であるため高価であり、生産、精製工程の煩雑化、あるいは安定性の欠如といった問題を有する。
低分子のアルツハイマー病の予防・治療剤としては、アミロイドβペプチドの生成を抑制する作用を有する薬剤、例えば、ロダニン誘導体（特開平６－１９２０９１号公報）、ベンズイミダゾール誘導体（米国特許第５５５２４２６号明細書）、ビンポセチン誘導体（国際公開第９６／２５１６１号パンフレット）、芳香族アミド誘導体（国際公開第２００４／０１４８４３号パンフレット）が知られている。
【発明の開示】
【０００３】
本発明は、アミロイドβペプチドのミミックペプチドとして機能し、アミロイドβペプチドの線維化を阻害しうるペプチドを提供することを目的とする。
本発明の要旨は以下のとおりである。
（１）次式（Ｉ）：
X^1－Ａｓｐ－X^2－X^3－X^4－Ｐｒｏ－X^5－X^6　　（Ｉ）
（式中、X^1は分枝アミノ酸を表し、X^2、X^3、X^4、X^5及びX^6は同一、又は異なってα－アミノ酸を表す。）
で示されるアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数８～３０のペプチド。
（２）前記式（Ｉ）において、X^2が分枝アミノ酸、ヒドロキシアミノ酸、芳香族アミノ酸又は脂肪族アミノ酸である前記（１）に記載のペプチド。
（３）前記式（Ｉ）において、X^3が芳香族アミノ酸又は分枝アミノ酸である前記（１）又は（２）に記載のペプチド。
（４）前記式（Ｉ）において、X^4が脂肪族アミノ酸、ヒドロキシアミノ酸又は分枝アミノ酸である前記（１）～（３）のいずれかに記載のペプチド。
（５）前記式（Ｉ）において、X^5が分枝アミノ酸、イミノ酸、脂肪族アミノ酸、塩基性アミノ酸又はヒドロキシアミノ酸である前記（１）～（４）のいずれかに記載のペプチド。
（６）前記式（Ｉ）において、X^6が塩基性アミノ酸、脂肪族アミノ酸又は分枝アミノ酸である前記（１）～（５）のいずれかに記載のペプチド。
（７）次式（ＩＩ）：
X^7－X^8－X^9－X^{10}－X^1－Ａｓｐ－X^2－X^3－X^4－Ｐｒｏ－X^5－X^6－X^{11}－X^{12}－Y^1　　（ＩＩ）
（式中、X^1、X^2、X^3、X^4、X^5及びX^6は前記（１）に記載の式（Ｉ）中の定義と同一であり、X^7、X^8、X^9、X^{10}、X^{11}及びX^{12}は同一、又は異なってα－アミノ酸又は単結合を表し、Y^1はＯＨ又はNH_2を表す。）

で示されるペプチド。
（８）前記式（ＩＩ）において、X^{7}がヒドロキシアミノ酸又は脂肪族アミノ酸である前記（７）に記載のペプチド。
（９）前記式（ＩＩ）において、X^{8}がヒドロキシアミノ酸又はアミドアミノ酸である前記（７）又は（８）に記載のペプチド。
（１０）前記式（ＩＩ）において、X^{9}が脂肪族アミノ酸、イミノ酸、ヒドロキシアミノ酸又はアミドアミノ酸である前記（７）～（９）のいずれかに記載のペプチド。
（１１）前記式（ＩＩ）において、X^{10}が含硫アミノ酸、分枝アミノ酸、芳香族アミノ酸又はイミノ酸である前記（７）～（１０）のいずれかに記載のペプチド。
（１２）前記式（ＩＩ）において、X^{11}が複素環式アミノ酸、芳香族アミノ酸、脂肪族アミノ酸又は分枝アミノ酸である前記（７）～（１１）のいずれかに記載のペプチド。
（１３）前記式（ＩＩ）において、X^{12}が分枝アミノ酸、酸性アミノ酸又はイミノ酸である前記（７）～（１２）のいずれかに記載のペプチド。
（１４）前記式（Ｉ）で示されるアミノ酸配列と、次式：
　Ｔｙｒ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ａｒｇ
で示されるＴＡＴ配列とを含む、アミノ酸残基数１９～３０のペプチドである前記（１）～（１３）のいずれかに記載のペプチド。
（１５）次式（ＩＩＩ）：
　Z^{1}－X^{13}－Ｇｌｙ－X^{14}－X^{15}－Ｐｒｏ－Ｔｒｐ－Ｍｅｔ－Z^{2}　（ＩＩＩ）
（式中、X^{13}、X^{14}及びX^{15}は同一、又は異なってα－アミノ酸を表し、Z^{1}及びZ^{2}は同一、又は異なってシステイン又はセリンを表し、Z^{1}及びZ^{2}がシステインを表す場合、これらの間で架橋されていてもよい。）
で示されるアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数９～３０のペプチド。
（１６）前記式（ＩＩＩ）において、X^{13}が芳香族アミノ酸である前記（１５）に記載のペプチド。
（１７）前記式（ＩＩＩ）において、X^{14}がヒドロキシアミノ酸である前記（１５）又は（１６）に記載のペプチド。
（１８）前記式（ＩＩＩ）において、X^{15}が塩基性アミノ酸である前記（１５）～（１７）のいずれかに記載のペプチド。
（１９）前記式（ＩＩＩ）で示されるアミノ酸配列と、次式：
　Ｔｙｒ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｌｙｓ－Ｌｙｓ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ｇｌｎ－Ａｒｇ－Ａｒｇ－Ａｒｇ
で示されるＴＡＴ配列とを含む、アミノ酸残基数２０～３０のペプチドである前記（１５）～（１８）のいずれかに記載のペプチド。
（２０）前記（１）～（１９）のいずれかに記載のペプチドを含有する医薬組成物。
（２１）前記（１）～（１９）のいずれかに記載のペプチドを含有するアミロイドβ線維化阻害剤。
（２２）アルツハイマー病の予防・治療剤である前記（２１）に記載のアミロイドβ線維化阻害剤。
（２３）アミロイドβ線維化阻害活性を有することが確認されていないペプチドから、アミロイドβペプチド１－４２と特異的に結合してその線維化反応を阻害する活性を有する一本鎖抗体に結合し、かつアミロイドβ線維化阻害活性を有するペプチドを探索することを特徴とするアミロイドβ線維化阻害ペプチドのスクリーニング方法。
（２４）前記（２３）に記載のスクリーニング方法により取得されるアミロイドβ線維化阻害ペプチド。
　本発明のペプチドは、前記式（Ｉ）又は（ＩＩＩ）で示されるアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数３０以下のペプチドであり、好ましくは前記式（Ｉ）で示されるアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数８～２０のペプチド及び前記式（ＩＩＩ）で示されるアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数９～２０のペプチドである。

前記式（Ｉ）において、X^1で表される分枝アミノ酸としては、バリン、ロイシン、イソロイシン等が挙げられる。

前記式（Ｉ）、（ＩＩ）又は（ＩＩＩ）において、X^2、X^3、X^4、X^5、X^6、X^7、X^8、X^9、X^{10}、X^{11}、X^{12}、X^{13}、X^{14}又はX^{15}で表されるα－アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニン等の脂肪族アミノ酸；バリン、ロイシン、イソロイシン等の分枝アミノ酸；セリン、トレオニン等のヒドロキシアミノ酸；アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸；アスパラギン、グルタミン等のアミドアミノ酸；リシン、ヒドロキシリシン、アルギニン等の塩基性アミノ酸；システイン、シスチン、メチオニン等の含硫アミノ酸；フェニルアラニン、チロシン等の芳香族アミノ酸；トリプトファン、ヒスチジン等の複素環式アミノ酸；プロリン、４－ヒドロキシプロリン等のイミノ酸が挙げられる。

前記式（Ｉ）及び（ＩＩ）において、X^2で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは分枝アミノ酸、ヒドロキシアミノ酸、芳香族アミノ酸、脂肪族アミノ酸、更に好ましくはバリン、ロイシン、イソロイシン、トレオニン、フェニルアラニンが挙げられ；X^3で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは芳香族アミノ酸、分枝アミノ酸、更に好ましくはフェニルアラニン、ロイシン、チロシンが挙げられ；X^4で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは脂肪族アミノ酸、ヒドロキシアミノ酸、分枝アミノ酸、更に好ましくはアラニン、トレオニン、ロイシン、セリン、バリンが挙げられ；X^5で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは分枝アミノ酸、イミノ酸、脂肪族アミノ酸、塩基性アミノ酸、ヒドロキシアミノ酸、更に好ましくはロイシン、イソロイシン、プロリン、アラニン、アルギニン、セリンが挙げられ；X^6で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは塩基性アミノ酸、脂肪族アミノ酸、分枝アミノ酸、更に好ましくはアルギニン、アラニン、ロイシン、イソロイシンが挙げられる。

前記式（ＩＩ）において、X^7で表されるα－アミノ酸としては、好ましくはヒドロキシアミノ酸、脂肪族アミノ酸、更に好ましくはトレオニン、グリシンが挙げられ；X^8で表されるα－アミノ酸としては、好ましくはヒドロキシアミノ酸、アミドアミノ酸、更に好ましくはセリン、アスパラギンが挙げられ；X^9で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは脂肪族アミノ酸、イミノ酸、ヒドロキシアミノ酸、アミドアミノ酸、更に好ましくはグリシン、プロリン、セリン、トレオニン、アスパラギンが挙げられ；X^{10}で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは含硫アミノ酸、分枝アミノ酸、芳香族アミノ酸、イミノ酸、更に好ましくはメチオニン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリンが挙げられ；X^{11}で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは複素環式アミノ酸、芳香族アミノ酸、脂肪族アミノ酸又は分枝アミノ酸、更に好ましくはヒスチジン、チロシン、アラニン、ロイシンが挙げられ；X^{12}で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは分枝アミノ酸、酸性アミノ酸、イミノ酸、更に好ましくはバリン、グルタミン酸、プロリンが挙げられる。

前記式（ＩＩＩ）において、X^{13}で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは芳香族アミノ酸、アミドアミノ酸、更に好ましくはチロシン、フェニルアラニン、グルタミン、最も好ましくはチロシンが挙げられ；X^{14}で表されるα－アミノ酸としては、好ましくはヒドロキシアミノ酸、複素環式アミノ酸、塩基性アミノ酸、更に好ましくはセリン、トレオニン、ヒスチジン、アルギニン、最も好ましくはトレオニンが挙げられ；X^{15}で表されるα－アミノ酸としては、好ましくは塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸、分枝アミノ酸、更に好ましくはリシン、グルタミン酸、ロイシン、最も好ましくはリシンが挙げられる。

本発明のペプチドは、公知の方法によって化学合成することもでき、例えばペプチド自動合成装置によって合成することができる。この基本的な合成過程はＲ．Ｂ．Ｍｅｒｉｆｉｅｌｄ，Ａｄｖａｎｃｅ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ３２：２２１－２９６（１９６９）に記載の方法を適用できる。この方法は、カルボキシル末端のアミノ酸を樹脂担体に共有結合させておき、α－アミノ基の保護基の除去、保護アミノ酸の縮合を順次繰返して、アミノ末端に向けてペプチド鎖を延長させ目的のアミノ酸配列を有するペプチド樹脂

を得ることを原理とするものである。

各アミノ酸の縮合やα－アミノ基の保護基の除去等は、Ｂｏｃ，Ｆｍｏｃ法を利用してほぼ同一の条件でなされ、中間体の精製も行わないため、合成に際しては一般に高度な熟練は要求されない。しかもこの方法は迅速であり、種々のペプチドを合成するに際し、非常に便利な方法である。こうして得られた保護ペプチド樹脂を、例えば無水フッ化水素、トリフルオロメタンスルホン酸もしくはトリフルオロ酢酸と種々の添加物の共存下に反応させることにより、ペプチドを樹脂から脱離させることと全保護基の除去を一段階で行うことができる。

樹脂担体としてカルボキシル末端カルボン酸型ペプチド合成用樹脂を用いれば、カルボキシル末端がカルボキシル基であるペプチド、例えば前記式（ＩＩ）において、Y^1がＯＨであるペプチドを得ることができ、カルボキシル末端アミド型ペプチド合成用樹脂を用いれば、カルボキシル末端カルボン酸がアミド化されたペプチド、例えば前記式（ＩＩ）において、Y^1がNH_2であるペプチドを得ることができる。

得られたペプチド粗製物は、ペプチドを精製する公知の手段で精製することができる。例えば、ゲル濾過、陽イオン交換樹脂もしくは陰イオン交換樹脂を用いるイオン交換クロマトグラフィー、更には疎水クロマトグラフィー、分配吸着クロマトグラフィーなど、種々の原理によるカラムクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーが挙げられる。

本発明のペプチドは、複数のシステイン残基を含む場合には、それらのシステイン残基の間で架橋されていてもよい。例えば、次式（ＩＩＩａ）：

$Cys^1-X^{13}-Gly-X^{14}-X^{15}-Pro-Trp-Met-Cys^2$

（ＩＩＩａ）

（式中、X^{13}、X^{14}及びX^{15}は同一、又は異なってα－アミノ酸を表し、Cys^1とCys^2の間で架橋されていてもよい。）

で示されるアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数９～３０、好ましくは９～２０のペプチドは、Cys^1とCys^2の間で架橋されていてもよい。

これらの架橋としては、システイン残基間を直接ジスルフィド架橋してもよく、またスペーサーとしてジスルフィド化合物を用いて、スペーサーを介してジスルフィド架橋してもよい。ジスルフィド架橋は、例えばペプチドの希釈水溶液を$K_3[Fe(CN)_6]$で酸化、又は酸性条件下のヨウ素で酸化することにより形成することができる。

本発明のペプチドは種々の塩の形で得ることできる。その塩としては、例えば無機酸や、蟻酸、酢酸、酒石酸、クエン酸などの有機酸との塩、もしくはナトリウムやアンモニアなどの無機塩基や、トリエチルアミン、エチルアミン、メチルアミンなどの有機塩基との塩が挙げられる。

ペプチドのアミノ基のビオチン化はアミノ酸誘導体を樹脂上で縮合する通常のＨＯＢｔ－ＤＣＣ，ＨＢＴｕ－ＨＯＢｔ方法などで可能である。

本発明のスクリーニング方法は、アミロイドβ線維化阻害活性を有することが確認されていないペプチドから、Ａβ１－４２と特異的に結合してその線維化反応を阻害する活性を有する一本鎖抗体に結合し、かつアミロイドβ線維化阻害活性を有するペプチドを探索することを特徴とするものである。

Ａβ１－４２と特異的に結合し、その線維化反応を阻害する活性を有する一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）としては、好ましくは、ＷＯ２００５／１０５９９８に記載されているヒト一本鎖可変領域フラグメントｓｃＦｖ（Ｂ６、Ｂ７、Ｄ１、Ｆ１０）が挙げられる。本明細書において、これらの抗体を鋳型と称する。

Ｂ６ｓｃＦｖ（ＷＯ２００５／１０５９９８のクローンＢ６）のＶＨ鎖のアミノ酸配列を配列番号１に、ＶＬ鎖のアミノ酸配列を配列番号２に示す。

Ｂ７ｓｃＦｖ（ＷＯ２００５／１０５９９８のクローンＢ７）のＶＨ鎖のアミノ酸配列を配列番号３に、ＶＬ鎖のアミノ酸配列を配列番号４に示す。

Ｄ１ｓｃＦｖ（ＷＯ２００５／１０５９９８のクローンＤ１）のＶＨ鎖のアミノ酸配列を配列番号５に、ＶＬ鎖のアミノ酸配列を配列番号６に示す。

Ｆ１０ｓｃＦｖ（ＷＯ２００５／１０５９９８のクローンＦ１０）のＶＨ鎖のアミノ酸

配列を配列番号７に、ＶＬ鎖のアミノ酸配列を配列番号８に示す。

本発明のペプチドを得るための方法としては、例えば以下に述べるペプチドライブラリー法が挙げられる。更に、ペプチドライブラリー法は、バクテリオファージを用いる方法と、化学合成でライブラリーを作製する方法に分けられる。

ファージランダムペプチドライブラリーを構築する方法は、例えばＭ１３系ファージのコートプロテイン（例えばｇｅｎｅＩＩＩ蛋白やＶＩＩＩ蛋白）の遺伝子にランダムな配列を有する合成遺伝子を連結し、作製すればよい。その方法としては、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９，３８６（１９９０），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８７，６３７８（１９９０）等に記載された方法を用いることができる。挿入する遺伝子の大きさは、発現されるペプチドが安定であれば特に制限はないが、作製したライブラリーがより多くのランダムな配列を網羅し、更に標的分子に結合能を有するためには６から１５アミノ酸が好ましい。鋳型とするｓｃＦｖに結合するペプチドファージを選択するためには、カラムやマイクロタイタープレート上に精製した前記ｓｃＦｖを直接あるいは抗ＩｇＧ抗体等を介して固定化し、前記ライブラリーを接触させる。その後、非結合ファージは洗浄操作で洗い流す。洗浄後、結合しているファージを酸で溶出し、中和した後、大腸菌に感染させ増幅させる。この操作（パニング）を３回か４回繰り返すと、前記ｓｃＦｖに親和性のあるファージが濃縮される。ここで単一なクローンを得るためには、再度大腸菌にファージを感染させ、抗生物質を含んだ寒天培地上でシングルコロニーを形成させる。個々のコロニーを液体培地で培養した後、上清中のファージをポリエチレングリコール等で沈殿濃縮し、その塩基配列を決定すれば、ペプチドの構造を知ることができる。

ランダムなアミノ酸配列を有するペプチドライブラリーは、前記のファージを用いる方法のほか、化学合成で作製することも可能である。その方法としては、ビーズを用いる方法（Ｎａｔｕｒｅ，３５４，８２（１９９１））、液相フォーカシング法（Ｎａｔｕｒｅ，３５４，８４（１９９１））、マイクロプレート法（Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５１，７６７（１９９１））等が挙げられる。

ライブラリーより得られた配列を有するペプチドを大量に調製するためには、人工的にペプチドを合成する方法や、遺伝子組換え技術を利用して大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等で発現させる方法が挙げられる。

人工的にペプチドを合成する方法は、一般的なペプチド合成法により容易に行うことができ、例えば固相合成法で行うことが簡便であり、目的の配列に、欠失、置換、挿入又は付加を施した変異体を作製することも容易である（細胞工学別冊、抗ペプチド抗体実験プロトコール、ｐ．２６－４６、秀潤社）。また、非天然型アミノ酸の導入、各アミノ酸残基の化学修飾やシステイン残基を導入することにより分子内を環化させて構造を安定化させる等の修飾を施してもよい。

遺伝子組換え技術を利用する場合、得られたアミノ酸配列から、ｃｏｄｏｎ ｕｓａｇｅに従ってＤＮＡ配列を設定し（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａｐｐｅｎｄｉｘ Ｄ１参照，マニアティスら；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ社、１９８９）、宿主の細胞に導入することは、技術的に確立されている。更に、塩基配列に変異を導入することにより、アミノ酸を他の残基に変換することも可能である。例えば大腸菌で発現させる場合は、得られたＤＮＡ配列をプロモーター配列、例えばトリプトファン合成酵素オペロン（Ｔｒｐ）、ラクトースオペロン（ｌａｃ）プロモーターに結合し、リボゾーム結合配列、例えばシャインダルガルノ（ＳＤ）配列や転写終結因子認識部位を付加することが望ましい。作製した発現ベクターを大腸菌に導入する方法等はＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（マニアティスら；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ社、１９８９）記載の方法が使用できる。発現産物を精製する方法は、例えば各種クロマトグラフィーを用いることができる。

得られたペプチドがアミロイドβ線維化阻害活性を有するか否かを調べる方法としては、例えば、チオフラビンＴ（ＴｈＴ）法（Ｈ．Ｌｅｖｉｎｅ，ＩＩＩ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２１：４０４－４１０（１９９３））が挙げられる。

本発明のスクリーニング方法に従ってアミロイドβ線維化阻害活性が確認されたペプチ

ドは、該ペプチドをリード化合物とし、これに、１もしくは２以上のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入もしくは付加、又は修飾を施し、アミロイドβ線維化阻害活性を有するペプチドを得ることにより、類縁のアミロイドβ線維化阻害ペプチドを製造することができる。このペプチドがアミロイドβ線維化阻害活性を有するか否かは、前記の方法と同様にして調べることができる。

本発明は、また、前記スクリーニング方法により取得されるアミロイドβ線維化阻害ペプチドを提供する。ここで、「前記スクリーニング方法により取得される」とは、前記スクリーニング方法により実際にアミロイドβ線維化阻害活性が確認されたペプチドをいう。前記ペプチドのアミノ酸残基数は、通常６～４０、好ましくは８～２０、更に好ましくは８～１５である。

本発明のペプチドは、アミロイドβ線維化阻害活性を有し、アルツハイマー病の予防・治療剤として有用である。

本発明のアミロイドβ線維化阻害ペプチドは、そのままもしくは自体公知の薬学的に許容される担体、賦形剤等と混合した医薬組成物として経口又は非経口的に投与することができる。

経口投与のための剤形としては、具体的には錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。かかる剤形は、自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体もしくは賦形剤を含有するものである。例えば錠剤用の担体、賦形剤としては、ラクトース、マルトース、ショ糖、澱粉、ステアリン酸マグネシウム等が挙げられる。

非経口投与のための剤形としては、例えば、点眼剤、軟膏剤、注射剤、湿布剤、坐薬、経鼻吸収剤、経肺吸収剤、経皮吸収剤、局所徐放剤等が挙げられる。溶液製剤は自体公知の方法、例えば、アミロイドβ線維化阻害ペプチドを通常、注射剤に用いられる無菌の水溶液に溶解、更には乳化して、リポソームに包埋させた状態で調製されうる。ペプチドは生体内でペプチダーゼ等による分解を受け易く、また目的の場所への到達性の問題等があることから、ここに述べたリポソームを含む適切なデリバリー法の活用は好ましい使用形態の一つである。ペプチドのデリバリー法の活用については前記リポソームを用いる方法はその一つであるが、これに限られたものではない。固体製剤は、自体公知の方法、例えば、アミロイドβ線維化阻害ペプチドにマンニトール、トレハロース、ソルビトール、ラクトース、グルコース等を賦形剤として加え、そのまま凍結乾燥することにより調製されうる。更にこれを粉体化して用いることもできる。また、これら粉体をポリ乳酸やグリコール酸等と混合し固体化して用いることもできる。ゲル化剤は、自体公知の方法、例えば、アミロイドβ線維化阻害ペプチドをグリセリン、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸等の増粘剤や多糖に溶解した状態で調製されうる。

いずれの製剤においても、安定化剤としてヒト血清アルブミン、ヒト免疫グロブリン、α_2マクログロブリン、アミノ酸等を添加することができ、また分散剤あるいは吸収促進剤としてアミロイドβ線維化阻害ペプチドの活性を損なわない範囲でアルコール、糖アルコール、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤等を添加することができる。また、微量金属や有機酸塩も必要に応じて加えることができる。

本発明の医薬組成物において、有効成分であるペプチドとしての投与量は、当該ペプチドの活性、患者の年令、体重、疾患の種類又は程度により異なるが、一般には、経口投与では、通常１日０．００１～１０００ｍｇ／ｋｇ体重であり、静脈内、筋肉内又は皮下投与では、通常１日０．００１～１０００ｍｇ／ｋｇ体重である。投与回数は、通常経口投与では１日１～３回、注射剤では１日１～２回である

【図面の簡単な説明】

【０００４】

図１は、Ｂ６　ｓｃＦｖに結合したペプチドファージクローンのＥＬＩＳＡの結果を示す図である。

図２は、Ｄ１　ｓｃＦｖに結合した１２ｍｅｒペプチドファージクローンのＥＬＩＳＡ

の結果を示す図である。

図３は、Ｄ１　ｓｃＦｖに結合したＣ７ＣペプチドファージクローンのｅＬＩＳＡの結果を示す図である。

図４は、ペプチドファージによるＡβ１－４２ペプチドの線維化阻害実験の結果を示す図である。

図５は、Ａβ１－４２の線維化を阻害するＢ６　ｓｃＦｖ、Ｂ７　ｓｃＦｖ又はＤ１　ｓｃＦｖを鋳型として単離したファージクローンの提示するペプチド配列一覧を示す図である。

図６は、ビオチン化したＢ６又はＢ７　ｓｃＦｖ結合性配列とＴＡＴ配列との融合分子を示す図である。

図７は、ＴＡＴとＢ６－Ｌ１の融合ペプチドがＢ６　ｓｃＦｖに認識されることを示す図である。

図８は、ＴＡＴとＢ６－Ｌ１、Ｂ７－Ｃ１５及びＢ７－Ｓ１５それぞれとの融合ペプチドのＡβ１－４２線維化阻害活性の測定結果を示す図である。

図９は、ＴＡＴとＢ６－Ｌ１及びＢ７－Ｃ１５それぞれとの融合ペプチドによるＡβコンホーマー（Ａβオリゴマー及びＡβ線維）の沈降実験の結果を示す図である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願２００６－１２５７６９の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

【発明を実施するための最良の形態】

【０００５】

以下、製造例及び実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例１】

【０００６】

Ｋａｊｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１２９：５７７－５８３（２００１）及びＳ．Ｈａｓｈｉｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１３３：４３－４９（２００３）に従って以下の実験を行った。

１．材料及び方法

（１）Ｅ－ｔａｇカラムによるｓｃＦｖの精製

Ａβに結合するｓｃＦｖを発現させるために、Ｈａｓｈｉｇｕｃｈｉらの方法（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１３３：４３－４９（２００３））によりｓｃＦｖファージクローンを大腸菌株ＨＢ２１５１に感染させた。得られた培地上清からＥ－ｔａｇカラムＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いてアミロイド特異的ｓｃＦｖ（Ｂ６、Ｂ７、Ｄ１、Ｆ１０）を精製した。

（２）ペプチドファージライブラリー

ファージのｇｅｎｅＩＩＩ蛋白のアミノ末端に１２個のランダムなアミノ酸配列を提示したＰｈ．Ｄ．－１２ライブラリー（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、ＭＡ）及びファージのｇｅｎｅＩＩＩ蛋白のアミノ末端にシステインとシステインの間に７つのアミノ酸配列を含むペプチドを提示するＰｈ．Ｄ．－Ｃ７Ｃライブラリー（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、ＭＡ）を用いた。

（３）バイオパニング

鋳型となるヒト一本鎖抗体（ｓｃＦｖ：Ｂ６、Ｂ７、Ｄ１又はＦ１０）又はコントロールｓｃＦｖ　１μｇ／１００μｌ／ｗｅｌｌ（０．１Ｍ　$NaHCO_3$　ｐＨ８．６）をＭａｘｉｓｏｒｐ　ｐｌａｔｅに４℃で６時間コートした。ブロッキング溶液としてそれぞれのウェルを１ｓｔパニングでは０．５％ゼラチン，２ｎｄパニングでは０．２５％ＢＳＡ，３ｒｄパニングでは０．５％ゼラチンを用いて４℃で１４時間ブロックした。１２ｍｅｒ又はＣ７Ｃペプチドファージライブラリーをブロッキング溶液で希釈後（１．５ｘ10^{12}　ｐｆｕ／１００μｌ）３０分静置後、コントロールｓｃＦｖで吸収操作を行った。すなわち、コントロールｓｃＦｖをコートしたウェルを０．２％　Ｔｗｅｅｎ　２０／ＰＢＳ（ＰＢＳＴ）で３回洗浄しファージ溶液を加え室温で１時間反応させ、コントロ

ールｓｃＦｖと結合しなかったファージ溶液を回収した。このファージ溶液を鋳型とするｓｃＦｖをコートしたウェルに加え室温で１時間反応させた。０．２％　ＰＢＳＴを用いて１０回洗浄後１ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ／０．１Ｍグリシン塩酸ｐＨ２．２を１００μｌ加え室温で５分置くことにより結合したファージを回収し、ただちに１Ｍトリス塩酸ｐＨ９．１を１５μｌ加え中和した。回収したファージを大腸菌ＥＲ２７３８に感染させ増幅させ、２，３ラウンドのパニングに用いた（１．５ｘ１０^{12}　ｐｆｕ／１００μｌ）。

（４）ファージクローンの単離

パニングを２回行った後、回収したファージをＥＲ２７３８に感染させＬＢ／Ｔｅｔ／Ｘ－ｇａｌｐｌａｔｅで培養した。溶菌してできたプラークを再度ＥＲ２７３８に感染させ、ファージクローンを単離した。

（５）ＥＬＩＳＡ

パニングで鋳型としたｓｃＦｖ又はコントロールｓｃＦｖ　５０ｎｇ／４０μｌ／ｗｅｌｌ（０．１Ｍ　ＮａＨＣＯ$_3$　ｐＨ８．６）をＥＬＩＳＡプレートに４℃で６時間コートした。０．５％ゼラチンを用いて４℃で１３時間ブロックした。０．２％　ＰＢＳＴを用いてウェルを３回洗浄後、単離したペプチドファージクローン溶液（約１．６ｘ１０^{11}　ｖｉｒｉｏｎｓ／４０μｌ）を加え室温で１時間反応させた。結合したファージは４０μｌのビオチン化抗Ｍ１３モノクローナル抗体（１０００倍希釈）、ストレプトアビジンアルカリフォスファターゼ（１０００倍希釈）を反応させた後、基質パラニトロフェニルリン酸を用いて検出した。

（６）ＤＮＡ塩基配列解析

特異性の認められたファージクローンをフェノール／クロロホルム処理して除蛋白した後、エタノール沈殿でＤＮＡを精製し、塩基配列決定の鋳型とした。ｐｒｉｍｅｒ－９６ｇＩＩＩ（１ｐｇ／μｌ）５’－ＣＣＣ　ＴＣＡ　ＴＡＧ　ＴＴＡ　ＧＣＧ　ＴＡＡ　ＣＧ－３’（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，ＭＡ）を用いて、ランダムなペプチド配列が挿入されている領域の遺伝子増幅を行い、ＤＮＡ塩基配列決定を行った。

（７）ペプチド合成

本発明のペプチドは、一般的な固相ペプチド合成法、Ｆｍｏｃ／ＨＢＴｕ＋ＨＯＢｔ法により合成した。本発明のペプチドＢ６－Ｌ１，Ｂ７－Ｃ１５，Ｂ７－Ｓ１５のそれぞれにＴＡＴ配列を連結したペプチドを合成した。なお、Ｂ７－Ｃ１５については、カルボキシル末端側にグリシンを付加したものにＴＡＴ配列を連結した。ちなみにＴＡＴ配列は脳血管関門を通過する機能をもつペプチド配列である（Ｐ．Ｊａｒｖｅｒ　ａｎｄ　Ｕｌｏ　Ｌａｎｇｅｌ，Ｔｈｅ　ｕｓｅ　ｏｆ　ｃｅｌｌ－ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎｇ　ｐｅｐｔｉｄｅｓ　ａｓ　ａ　ｔｏｏｌ　ｆｏｒ　ｇｅｎｅ　ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ，ＤＤＴ，９：３９５－４０１，２００４）である。

なお、Ｂ６－Ｌ１，Ｂ７－Ｃ１５，Ｂ７－Ｓ１５のそれぞれの配列のアミノ末端側にＴＡＴ配列を融合したものがＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｃ１５，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｓ１５であり、Ｂ６－Ｌ１の配列のカルボキシル末端側にＴＡＴ配列を融合したものがＢ６－Ｌ１－ＴＡＴである。このペプチドの結合を検出するためにペプチドのアミノ末端にビオチンが結合しているペプチド配列として合成した。

Ｂ６－Ｌ１，Ｂ７－Ｃ１５，Ｂ７－Ｓ１５、及びこれらとＴＡＴ配列との融合分子のアミノ酸配列と配列番号との関係は以下のとおりである。

Ｂ６－Ｌ１：配列番号９；
Ｂ７－Ｃ１５：配列番号１６
Ｂ７－Ｓ１５：配列番号２３
ＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１：配列番号２４
Ｂ６－Ｌ１－ＴＡＴ：配列番号２５
ＴＡＴ－Ｂ７－Ｃ１５：配列番号２６
ＴＡＴ－Ｂ７－Ｓ１５：配列番号２７

（８）アミロイドβ線維化阻害実験

２０ｍＭリン酸バッファーｐＨ７．０を用いて４０μＭに希釈したＡβ１－４２ペプチ

ドに合成したペプチド（ＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１，Ｂ６－Ｌ１－ＴＡＴ，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｃ１５，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｓ１５）を様々な濃度（１．６５ｎＭ，１６．５ｎＭ，３３ｎＭ）で加えた。０，６，２４時間に１０μｌのサンプルを回収し１１μＭのチオフラビンＴ（Ｓｉｇｍａ）／リン酸バッファー９０μｌを加えマルチラベルプレートカウンター、Ｗａｌｌａｃ　１４２０　ＡＲＶＯｓｘ（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ；Ｗｅｌｌｅｓｌｅｙ，ＭＡ）を用い、４５０ｎｍの励起光により発生する４８２ｎｍの蛍光強度を測定した。

（９）Ａβ線維化阻害ペプチドによるＡβコンホーマー（Ａβオリゴマー及びＡβ線維）の沈降実験

Ａβ１－４２を２０ｍＭリン酸バッファーｐＨ７．０に４０μＭの濃度で溶解し、その１．５時間目に、４０μＭに調製したＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１又はＴＡＴ－Ｂ７－Ｃ１５ペプチドを液量比（１：１）で加え３７℃で１時間反応させた（最終濃度：Ａβ［２０μＭ］／合成ペプチド［２０μＭ］）。反応後、免疫沈降前のサンプルを「沈降前」として一部サンプリングし、残りのサンプルを２０μｇ／μｌに調製したＭ－２８０ストレプロアビジン－マグネットビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｏｓｌｏ，Ｎｏｒｗａｙ）と液量比（１：１）で氷上で１時間反応させた（最終濃度：Ａβ［１０μＭ］／合成ペプチド［１０μＭ］／ビーズ［１０μｇ／μｌ］）。反応後、マグネットによりビーズを沈降させ上清を「上清」とした。沈降したビーズに回収した上清と等液量のＰＢＳを加え「沈殿物」とした。得られた各サンプルを電気泳動し、抗Ａβ抗体によるＷｅｓｔｅｒｎ　ｂｌｏｔ解析を行った。

２．結果

（１）Ａβ特異的ｓｃＦｖに結合するペプチドファージクローン

（ａ）Ｂ６　ｓｃＦｖに結合したペプチドファージクローンのＥＬＩＳＡの結果を図１に示す。無関係のｓｃＦｖ（コントロールｓｃＦｖ）としてＦｖ１Ｅ１というＡβの線維化を阻害しない抗体を用いた。ファージライブラリーは１２ｍｅｒのアミノ酸配列を提示するＰｈ．Ｄ．－１２ライブラリー（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、ＭＡ）を用いた。実験は前記（５）ＥＬＩＳＡで記したとおりに行った。

（ｂ）Ｄ１　ｓｃＦｖに結合した１２ｍｅｒペプチドファージクローンのＥＬＩＳＡの結果を図２に示す。無関係のｓｃＦｖ（コントロールｓｃＦｖ）としてＭＹ５ＲというＡβの線維化を阻害しない抗体を用いた。ファージライブラリーは１２ｍｅｒのアミノ酸配列を提示するＰｈ．Ｄ．－１２ライブラリー（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、ＭＡ）を用いた。実験は前記（５）ＥＬＩＳＡで記したとおりに行った。

（ｃ）Ｄ１　ｓｃＦｖに結合したＣ７ＣペプチドファージクローンのＥＬＩＳＡの結果を図３に示す。無関係のｓｃＦｖ（コントロールｓｃＦｖ）としてＭＹ５ＲというＡβの線維化を阻害しない抗体を用いた。ファージライブラリーはシステインとシステインの間に７つのアミノ酸配列を含むペプチドを提示するＰｈ．Ｄ．－Ｃ７Ｃライブラリー（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、ＭＡ）を用いた。実験は前記（５）ＥＬＩＳＡで記したとおりに行った。

（２）Ｂ６結合性ペプチドファージのＡβ１－４２線維化阻害活性

Ｂ６結合性ペプチドファージによるＡβ１－４２ペプチドの線維化阻害実験の結果を図４に示す。Ａβ１－４２線維化阻害実験は前記（８）線維化阻害実験で記したとおりに行った。ｐｅｐＢ６－Ｌ１及びｐｅｐＢ６－Ｌ１０は、Ａβ１－４２の線維化を阻害するＢ６　ｓｃＦｖを鋳型として、それに結合するファージクローンであり、ｐｅｐ１Ｅ１－Ｌ１，１－Ｌ２，１－Ｌ４，１－Ｌ１２は、Ａβ１－４２の線維化を阻害しないＦｖ１Ｅ１　ｓｃＦｖ（ＷＯ２００５－１０５９９８段落００７４～００７５に記載）を鋳型。として単離したファージクローンである。ここで用いたファージクローンの濃度は３．０ｘ１０^{12}　ｖｉｒｉｏｎｓ／ｍｌである。

（３）Ａβ特異的ｓｃＦｖのエピトープ（結合性配列）

Ａβ１－４２の線維化を阻害するＢ６　ｓｃＦｖ、Ｂ７　ｓｃＦｖ又はＤ１　ｓｃＦｖを鋳型として単離したファージクローンの提示するペプチドのアミノ酸配列一覧を図５に示す。ファージライブラリーとしてＰｈ．Ｄ．－１２ライブラリー（図５中１２ｍｅｒ＊

と略）又はＰｈ．Ｄ．－Ｃ７Ｃライブラリー（図５中Ｃ７Ｃ＊と略）を使用した。ｐｅｐＢ７－Ｃ１５とｐｅｐＤ１－Ｃ５，Ｃ７，Ｃ２０は同一の配列であった。番号の前についているＬは１２ｍｅｒのライブラリーから、ＣはＣ７Ｃのライブラリーから単離されたクローンであることを示している。

各ファージクローンの提示するペプチドのアミノ酸配列と配列番号との関係は以下のとおりである。

ｐｅｐＢ６－Ｌ１：配列番号９；
ｐｅｐＢ６－Ｌ１０：配列番号１０；
ｐｅｐＤ１－Ｌ５，Ｌ９：配列番号１１；
ｐｅｐＤ１－Ｌ６：配列番号１２；
ｐｅｐＤ１－Ｌ７：配列番号１３；
ｐｅｐＤ１－Ｌ１３：配列番号１４；
ｐｅｐＤ１－Ｌ２０：配列番号１５；
ｐｅｐＢ７－Ｃ１５（ｐｅｐＤ１－Ｃ５，Ｃ７，Ｃ２０）：配列番号１６；
ｐｅｐＤ１－Ｃ２，Ｃ１３：配列番号１７；
ｐｅｐＤ１－Ｃ１８：配列番号１８；
ｐｅｐＤ１－Ｃ３：配列番号１９；
ｐｅｐＤ１－Ｃ１１：配列番号２０；
ｐｅｐＤ１－Ｃ８：配列番号２１；
ｐｅｐＤ１－Ｃ１０：配列番号２２

（４）ビオチン化したＢ６又はＢ７　ｓｃＦｖ結合性配列とＴＡＴ配列との融合分子

ビオチン化したＢ６　ｓｃＦｖ結合性配列とＴＡＴ配列との融合分子を図６に示す。Ｂ６－Ｌ１，Ｂ７－Ｃ１５，Ｂ７－Ｓ１５のそれぞれの配列のアミノ末端側にＴＡＴ配列を融合したものがＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｃ１５，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｓ１５であり、Ｂ６－Ｌ１の配列のカルボキシル末端側にＴＡＴ配列を融合したものがＢ６－Ｌ１－ＴＡＴである。ＴＡＴ配列は脳血管関門を通過する機能をもつペプチド配列である（Ｐ．Ｊａｒｖｅｒ ａｎｄ Ｕｌｏ Ｌａｎｇｅｌ，Ｔｈｅ ｕｓｅ ｏｆ ｃｅｌｌ－ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅｓ ａｓ ａ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ，ＤＤＴ，９：３９５－４０２，２００４）。これらのペプチドのアミノ末端をビオチンで標識し、このペプチドの結合を酵素標識したアビジンを用いて定量を行った。

（５）ＴＡＴとＢ６－Ｌ１の融合ペプチドはＢ６　ｓｃＦｖに認識された（図７）。合成ペプチド、ＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１あるいはＢ６－Ｌ１－ＴＡＴを２００ｎｇ／ｗｅｌｌの条件でＥＬＩＳＡプレートにコートし、種々の濃度のＢ６　ｓｃＦｖを添加しその結合活性を検討した。コントロールペプチドとして無関係のペプチド（ＧＳＧＧＧＳＣＧＹＷＲＳＥＷＧＬＣＧ）を用いた。Ｂ６　ｓｃＦｖの量依存的な結合反応が確認された。

（６）ＴＡＴとＢ６－Ｌ１，Ｂ７－Ｃ１５，Ｂ７－Ｓ１５それぞれとの融合ペプチドのＡβ１－４２線維化阻害活性

ＴＡＴとＢ６－Ｌ１，Ｂ７－Ｃ１５，Ｂ７－Ｓ１５それぞれとの融合ペプチドのＡβ１－４２線維化阻害活性の測定結果を図８に示す。線維化阻害実験は前記線維化阻害実験で記したとおりに行った。ＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１，Ｂ６－Ｌ１－ＴＡＴ，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｃ１５，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｓ１５は線維化阻害活性があることが明らかとなった。前記のコントロールペプチドは全く阻害活性を示さなかった。

（７）ＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｃ１５ペプチドによるＡβコンホーマー（Ａβオリゴマー及びＡβ線維）の沈降実験

ＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｃ１５ペプチドの沈降実験の結果を図９に示す。Ａβ１－４２を２０ｍＭリン酸バッファーｐＨ７．０に４０μＭの濃度で溶解し、その１．５時間目にビオチン化ＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１又はビオチン化ＴＡＴ－Ｂ７－Ｃ１５ペプチドを加え結合物をストレプトアビジン－マグネットビーズで沈降させた。沈降前はＡβオリゴマーやＡβ線維などのバンドが確認できるが、ＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１，ＴＡＴ－Ｂ７－

Ｃ１５ペプチドで沈降を行った上清にはＡβオリゴマーやＡβ線維は確認されず、沈殿物の方で確認できた。この結果からＡβ１－４２溶解後１．５時間目に形成されるＡβオリゴマーやＡβ線維とＴＡＴ－Ｂ６－Ｌ１，ＴＡＴ－Ｂ７－Ｃ１５ペプチドが結合することが明らかとなった。無関係なコントロールペプチドでは沈降反応は認められなかった（図９には示されていない）。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

【産業上の利用可能性】

【０００７】

本発明のペプチドは、アルツハイマー病の予防・治療剤として有用である。

［配列表］

SEQUENCE LISTING

<110> KAGOSHIMA UNIVERSITY

<120> Peptide inhibiting fibril formation of Amiroid-beta

<130> PH-3127-PCT

<150> JP 2006-125769
<151> 2006-04-28

<160> 27

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Met Ser Gly Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Gly Arg Phe Arg Asn Arg Arg Ser Asp Gly Phe Asp Thr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 109
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Gly Lys Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Ser Ser Gly Asn Ala Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Thr Ser Gly Asn His
85 90 95
Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 3
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Gly Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Thr Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Gly Val Asn Gly Gly Gly Gln Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Gly Arg Phe Arg Asn Arg Arg Pro Asp Gly Phe Asp Thr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Asn Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Thr Leu Arg Asn Asn Phe Pro
20 25 30
Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Phe Tyr
35 40 45
Gly Lys Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Arg Ser Gly Thr Thr Ala Ser Leu Val Ile Thr Gly Ala Gln Ala Gln
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Gly Gly His His
85 90 95
Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 5
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Lys Tyr
20 25 30
Tyr Met Ala Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Leu
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Lys Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Asp Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu

100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ile Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Gly Lys Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Ile Ser Gly Ser
50 55 60
Arg Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95
Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 7
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Lys Arg Phe Ala Ala Ala Arg Arg Gly Leu Asp Ala Phe
100 105 110
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95
Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 9
Gly Met Leu Asp Ile Phe Ala Pro Ile Arg His Val

1 5 10

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 10
Thr Ser Pro Ile Leu Asp Val Leu Thr Pro Pro Arg
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 11
Gly Ser Pro Phe Leu Asp Leu Leu Ala Pro Ala Ala
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 12
Ser Ser Ile Ile Asp Ile Leu Leu Pro Pro Ile Tyr

1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 13
Ser Ile Leu Asp Ile Leu Ser Pro Arg Leu Ala Glu
1 5 10

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 14
Gly Asn Thr Leu Leu Asp Thr Leu Val Pro Leu Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 15
Asn Pro Leu Asp Phe Tyr Ala Pro Ser Ile Leu Pro

1 5 10

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 16
Cys Tyr Gly Thr Lys Pro Trp Met Cys
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 17
Cys Tyr Gly Thr Glu Pro Trp Met Cys
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 18
Cys Phe Gly His Glu Pro Trp Met Cys

1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 19
Cys Gln Gly His Leu Pro Trp Met Cys
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 20
Cys Phe Gly His Lys Pro Trp Met Cys
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 21
Cys Phe Gly Arg Leu Pro Trp Met Cys

1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 22
Cys Phe Gly Ser Leu Pro Trp Met Cys
1 5

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 23
Ser Tyr Gly Thr Lys Pro Trp Met Ser Gly
1 5

<210> 24
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 24

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Asp Ile
1 5 10 15

Phe Ala Pro Ile Arg His Val
20

<210> 25
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 25

Gly Met Leu Asp Ile Phe Ala Pro Ile Arg His Val Tyr Gly Arg Lys
1 5 10 15

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
20

<210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 26

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Tyr Gly Thr Lys
1 5 10 15

Pro Trp Met Cys Gly
20

<210> 27
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

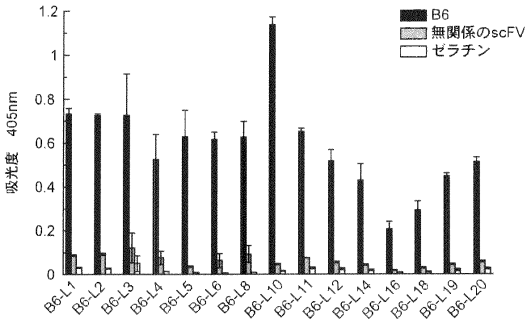
<400> 27

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Thr Lys
1 5 10 15

Pro Trp Met Ser Gly
20

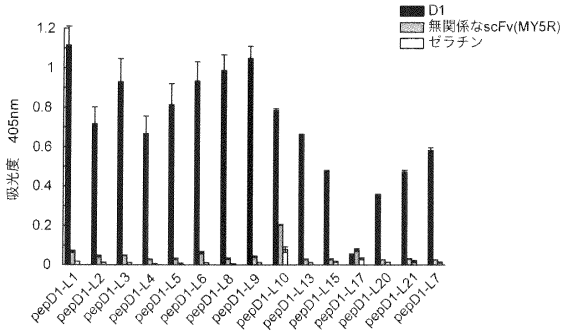
【図１】

図1



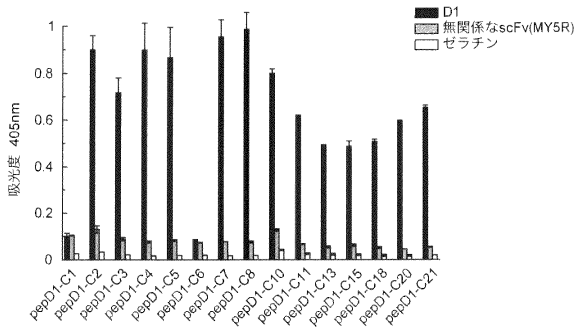
【図２】

図2



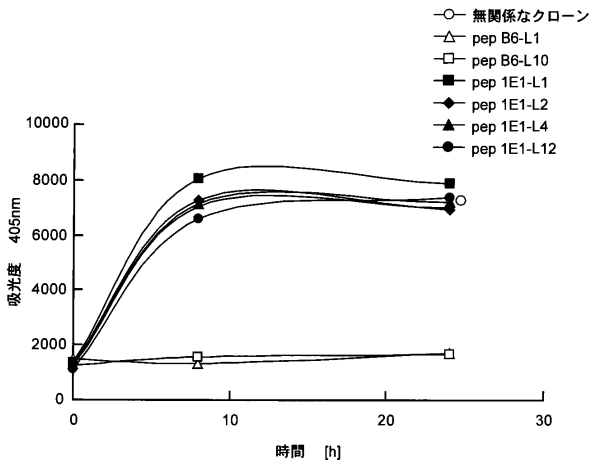
【図３】

図3



【図４】

図4



【図５】

図５

	ファージクローン名	鋳型抗体名	ペプチドのアミノ酸配列
12 mer*	pepB6-L1	B6	G M L D I F A P I R H V
	pepB6-L10	B6	T S P I L D V L T P P R
	pepD1-L5, L9	D1	G S P F L D L L A P A A
	pepD1-L6	D1	S S I D I L L P P I Y
	pepD1-L7	D1	S I L D I L S P R L A E
	pepD1-L13	D1	G N T L L D T L V P L I
	pepD1-L20	D1	N P L D F Y A P S I L P
C7C*	pepB7-C15	B7	C Y G T K P W M C
	pepD1-C2, C13	D1	C Y G T E P W M C
	pepD1-C18	D1	C F G H E P W M C
	pepD1-C3	D1	C Q G H L P W M C
	pepD1-C11	D1	C F G H K P W M C
	pepD1-C5, C7, C20	D1	C Y G T K P W M C
	pepD1-C8	D1	C F G R L P W M C
	pepD1-C10	D1	C F G S L P W M C

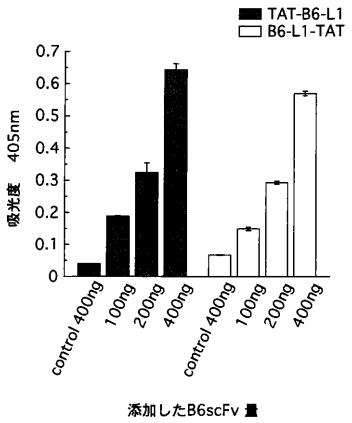
【図６】

図６

結合配列名	アミノ酸配列
B6-L1	GMLDIFAPIRHV
B7-C15G	CYGTKPWMCG
B7-S15	SYGTKPWMSG
TAT	YGRKKRRQRRR
TAT-B6-L1	biotin-YGRKKRRQRRRGMLDIFAPIRHV
B6-L1-TAT	biotin-GMLDIFAPIRHVYGRKKRRQRRR
TAT-B7-C15	biotin-YGRKKRRQRRRCYGTKPWMCG
TAT-B7-S15	biotin-YGRKKRRQRRRSYGTKPWMSG

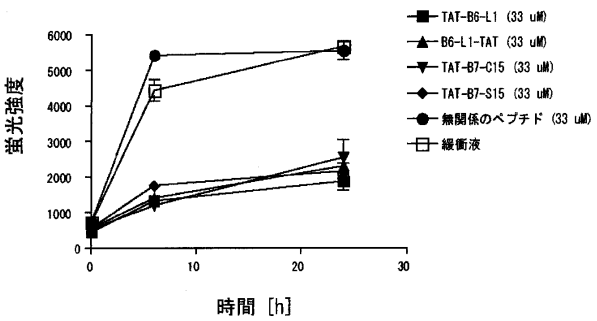
【図７】

図７



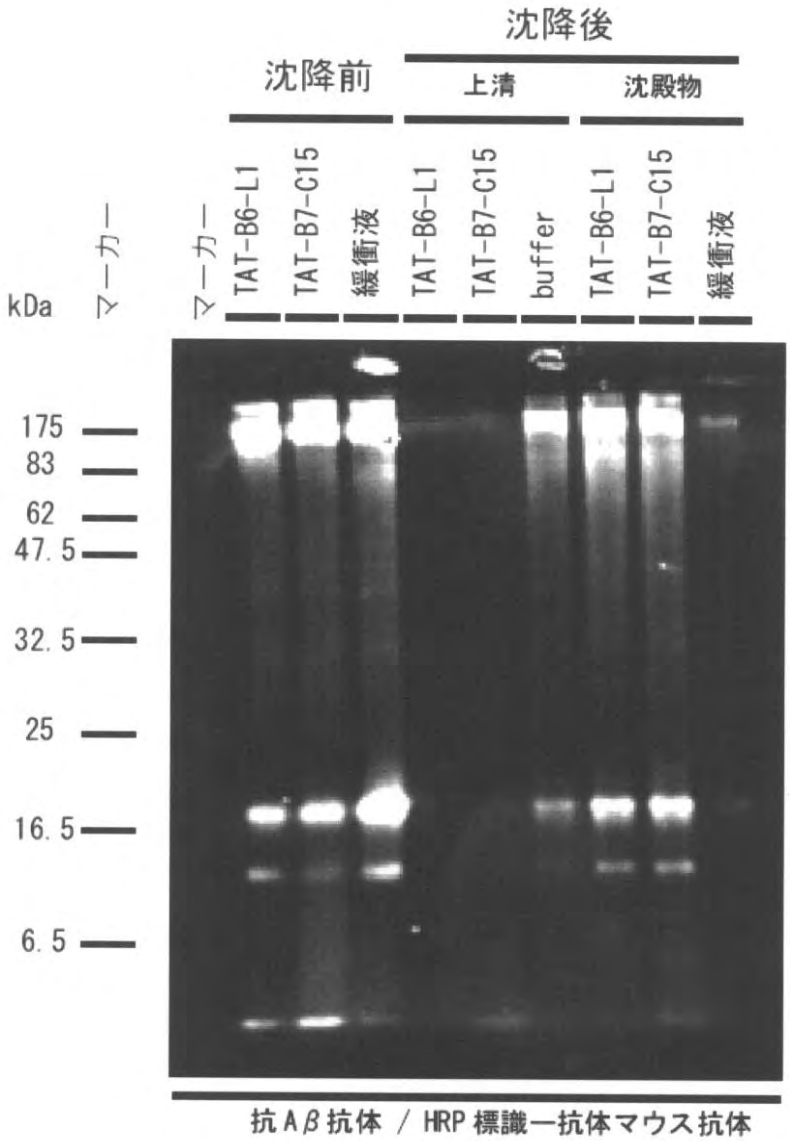
【図８】

図８



【図９】

図９


沈降後
沈降前
上清
沈殿物
kDa
マーカー
マーカー
TAT-B6-L1
TAT-B7-C15
緩衝液
TAT-B6-L1
TAT-B7-C15
buffer
TAT-B6-L1
TAT-B7-C15
緩衝液
175
83
62
47.5
32.5
25
16.5
6.5
抗Aβ抗体 / HRP標識一抗体マウス抗体

フロントページの続き

(56)参考文献　特表２００１－５１９７５３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００３／０８２９０６（WO，Ａ１）
国際公開第２００４／０９６８４５（WO，Ａ１）
国際公開第９８／０３０２２９（WO，Ａ１）
国際公開第２００３／０６３７６０（WO，Ａ１）
国際公開第２００３／０８９４６０（WO，Ａ１）
国際公開第２００４／０１３１７２（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２００５／０００９７４９（ＵＳ，Ａ１）
米国特許第０５８５４２０４（ＵＳ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K　7/00