

(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2020-502995

(P2020-502995A)

(43) 公表日 令和2年1月30日 (2020.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	4 B 0 6 4
C O 7 K 14/72 (2006.01)	C O 7 K 14/72	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-518949 (P2019-518949)
 (86) (22) 出願日 平成29年10月11日 (2017.10.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年4月8日 (2019.4.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2017/052788
 (87) 国際公開番号 W02018/069641
 (87) 国際公開日 平成30年4月19日 (2018.4.19)
 (31) 優先権主張番号 1659781
 (32) 優先日 平成28年10月11日 (2016.10.11)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 1752162
 (32) 優先日 平成29年3月16日 (2017.3.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 フランス (FR)

(71) 出願人 506316557
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
 ルシュ シアンティフィック
 フランス国 75794 パリ セデックス
 ス 16、リュ ミシエル アンジュ
 、3
 (71) 出願人 505039767
 ユニベルシティ・ドゥ・ニース・ソフィア
 ・アンティポリス
 フランス国、エフー06108、ニース・
 セデックス 02、パルク・バルロス (番地
 なし)
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロペプチド N T S R 3 に由来するペプチド、及びうつ病の治療におけるその使用

(57) 【要約】

本発明は、ニューロテンシン受容体 3 (N T S R 3) に由来する新規ペプチド、および特に様々な疾患、特にうつ病の治療におけるそれらの使用に関する。

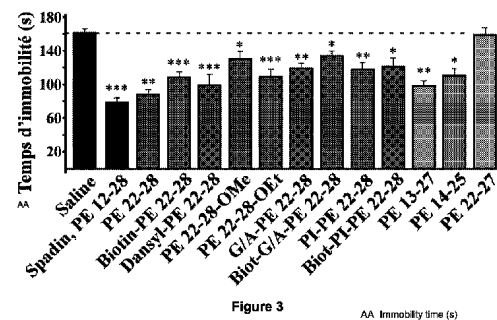


Figure 3

AA Immobility time (s)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 4 の配列 (P L P R W S G P I G V S W G L) のペプチド P E (1 3 ~ 2 7) 、配列番号 5 の配列 (L P R W S G P I G V S W) のペプチド P E (1 4 ~ 2 5) 、ビオチン化された配列番号 3 の配列に対応するビオチン化ペプチド P E (2 2 ~ 2 8) 、配列番号 6 の配列 (P I G V S W G L R) のペプチド P I - P E (2 2 ~ 2 8) 、ビオチン化された配列番号 6 の配列に対応するビオチン化ペプチド P I - P E (2 2 ~ 2 8) 、22 位のグリシンがアラニンで置換された配列番号 3 の配列に対応する配列番号 7 の配列 (A V S W G L R) のペプチド G / A - P E (2 2 ~ 2 8) 、ビオチン化された配列番号 7 の配列に対応するビオチン化ペプチド G / A - P E (2 2 ~ 2 8) 、N 末端にダンシル酸化化学基が付加された配列番号 3 の配列に対応するペプチドダンシル - P E (2 2 ~ 2 8) 、及び C 末端に O - メチルと O - エチルがそれぞれ付加された配列番号 3 の配列に対応するペプチド O - メチル - P E (2 2 ~ 2 8) および O - エチル - P E (2 2 ~ 2 8) から選択されるニューロテンシン受容体 3 (N T S R 3) のプロペプチド (P E) 由来のペプチド。

10

【請求項 2】

配列番号 4 の配列 (P L P R W S G P I G V S W G L) のペプチド P E (1 3 ~ 2 7) 、配列番号 5 の配列 (L P R W S G P I G V S W) のペプチド P E (1 4 ~ 2 5) 、配列番号 6 の配列 (P I G V S W G L R) のペプチド P I - P E (2 2 ~ 2 8) 、ビオチン化された配列番号 6 の配列に対応するビオチン化ペプチド P I - P E (2 2 ~ 2 8) 、22 位のグリシンがアラニンで置換された配列番号 3 の配列に対応する配列番号 7 の配列 (A V S W G L R) のペプチド G / A - P E (2 2 ~ 2 8) 、ビオチン化された配列番号 7 の配列に対応するビオチン化ペプチド G / A - P E (2 2 ~ 2 8) 、から成るペプチドをコードする核酸配列。

20

【請求項 3】

請求項 2 に記載の核酸配列を含むベクター。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のペプチドおよび / または請求項 2 に記載の核酸配列および / または請求項 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 5】

- 請求項 2 に記載の核酸で宿主細胞をトランスフェクトする工程、または請求項 3 に記載のベクターで宿主細胞を形質転換する工程 ;
- 前記ペプチドの発現を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程 ; 及び
- 前記ペプチドを回収する工程
を含む、請求項 2 に規定されたペプチドの製造方法。

30

【請求項 6】

医薬として使用するための請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 7】

前記医薬が抗うつ薬である、請求項 6 に記載の使用のためのペプチド。

【請求項 8】

うつ病の治療に使用するための、請求項 1 に記載のペプチド。

40

【請求項 9】

糖尿病または癌の治療に使用するための、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 10】

てんかんまたは卒中に対する神経保護に使用するための請求項 1 に記載のペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ニューロテンシン受容体 3 (N T S R 3) に由来する短いペプチド、および様々な病状 (糖尿病、癌、てんかん、卒中、神経変性病理など) 、特に精神病理学、特に

50

例えば脳卒中の後など、うつ病を患っているまたはうつ病を患ったことがある患者の治療におけるその使用に関する。本発明は、特に、医薬品、例えば抗うつ薬の製造のためのこれらのペプチドの使用に関する。

【0002】

本発明は製薬産業の分野、特に様々な病状（糖尿病、癌、卒中、てんかん、精神疾患、神経変性病など）の治療に使用される医薬の開発の分野に用途がある。

【0003】

以下の説明では、大括弧（〔 〕）内の参考文献は、テキストの末尾に表示される参考文献のリストを表す。

【背景技術】

10

【0004】

うつ病は公衆衛生上の大きな問題である。最新の研究では、うつ病の有病率が高いことが確認されている。一生の間に、女性の20%、男性の10%がうつ病のエピソードを経験したことがある。そのような数字は明らかに印象的である。フランスのような国々では、年間12000人の死亡にあたる、うつ病の主要な合併症、自殺を見ると、その数字はもっと大きくなる〔2〕。

【0005】

うつ病は非常に一般的でしばしば衰弱させる病気である。それは先進国の人口の最大20%に影響を及ぼしている。その起源は多様で様々である。この病理は、精神、ならびに患者の行動および生理学に影響を及ぼすものである。うつ病の治療法も複数あり、使用される薬の作用機序は明確に確立されてはいない。

20

【0006】

世界保健機関（WHO）は、単極性うつ病が2020年までに身体障害の2番目に主要な原因になると予測している。うつ病の個人的および家族的苦しみには、この病状の重要な社会的重みが加わる。うつ病はすでに労働停止の主な原因の1つであり、年間300億ユーロを超える経済的負担がある。医療専門家、特にSSRI（選択的セロトニン再取り込み阻害薬）およびSNRI（セロトニンノルアドレナリン再取り込み阻害薬）に利用可能な治療用手段にもかかわらず、うつ病人口の30%は治療を受けていない。さらに、抗うつ剤の作用時間は3～6週間のオーダーであり、そして副作用はしばしば重大である。

【0007】

30

一般に、うつ病患者の15%が自殺により死亡すると推定されている。ほとんどの患者で、うつ病は遺伝的素因とストレスや感情的外傷などの環境要因との相互作用によるものである〔3〕。この疾患は一般的であり、抗うつ薬（AD）市場は巨大である（少なくとも年間100億ユーロ）。

【0008】

それにもかかわらず、これらの抗うつ剤は約70%の症例で患者の状態を改善するが、それらは患者の30～40%でのみ疾患の完全な寛解をもたらす。さらに、治療を受けた被験者のほぼ3分の1が既存の治療に抵抗性を示している。このような事態により、うつ病のメカニズムを考慮に入れることができる新しい治療法を検討することがますます必要になっている〔3〕。

40

【0009】

医療専門家に利用可能にされた治療用兵器庫において、アミトリプチリンおよびイミプラミンを含む三環式抗うつ剤（TCA）が最初に発見され、続いてフェルネジンおよびバルギリンのような不可逆的かつ非選択的なモノアミンオキシダーゼ阻害剤（MAOI）が発見された。有害な影響、特にTCAの心毒性（特に過剰摂取の場合）およびMAOIの高血圧の危機（消化性チラミンとの相互作用、有名な「チーズ効果」）は、同一の治療効果であるがより良い容認性を有する新しい分子に向かって研究を進めている。

【0010】

選択性の概念は、ノルアドレナリン（NA）またはセロトニン（5-ヒドロキシトリプタミンまたは5HT）の再取り込みに特異的な阻害剤で出現した。第IIIフェーズ臨床

50

試験では、これらの新しい分子が第一世代の抗うつ薬と同等の有効性と、特に過量投与の場合のより優れた安全性を提供することが実証されている。

【 0 0 1 1 】

特異的セロトニン再取り込み阻害剤 (S S R I) および特異的ノルアドレナリン再取り込み阻害剤 (S N R I) は現在最も広く使用されている分子である [4 ~ 5]。したがって、A D は、モノアミン作動系の伝達を促進することと最も頻繁に関連している。

【 0 0 1 2 】

セロトニン、ノルアドレナリンおよびドーパミンは明らかに関係しているが、現在ではA D によって生じるモノアミンレベルの変化およびそれらから生じる適応過程、特にそれらの受容体のいくつかの感受性の変化はそれ自体では説明できないことが認められている。

10

【 0 0 1 3 】

抗うつ薬の作用機序。

したがって、A D を得るのに必要な 3 ~ 6 週間の時間をモノアミンのシナプスレベルの増加と関連させることは困難であり、これは製品の最初の投与と同時に起こる。半世紀近く、うつ病の病因とその治療法に関する仮説の数は増え続けている。

【 0 0 1 4 】

例えば、高濃度のグルココルチコイドは、一般に、B D N F (脳由来神経栄養因子) 合成の減少、グルタミン酸の過剰分泌、および / またはグルコース摂取の減少による海馬の負の気分効果、ならびに構造変化に関連している [6]。

20

【 0 0 1 5 】

これらの観察によると、グルココルチコイド合成阻害薬およびグルココルチコイド受容体拮抗薬はA D 様の効果を発揮する [7]。

【 0 0 1 6 】

サブスタンス P 受容体、特に N K 1、または C R F 受容体 (コルチコトロピン放出因子) に作用する拮抗薬、ならびに N M D A 受容体拮抗薬は、ある程度の成功を収めて開発されている [8 ~ 1 0]。

【 0 0 1 7 】

ストレスの多い状況やうつ病のモデルで行われた最近の様々な研究は、主要なうつ病性障害の病因に神経新生を関与させている [1 1 ~ 1 3]。電気ショックを含む全ての慢性的なA D 治療は、海馬の顆粒層のニューロンの起源で前駆細胞の増殖を刺激することが示されている。

30

【 0 0 1 8 】

A D は、C R E B、B c 1 2、またはM A P キナーゼなどの細胞の生存および増殖に関与する様々な因子の発現を調節することも知られている。しかしながら、気分障害の病態生理学におけるこれらの新形成ニューロンの機能的重要性は物議を醸している [1 4]。

【 0 0 1 9 】

これらすべての適応症は、うつ病がその病態生理学が多因子性である複雑な疾患であり、その結果、そのような病状の治療が依然として課題であることを実証している。

【 0 0 2 0 】

4 0 年以上にわたり、うつ病および有効な薬物の開発に関する研究は、モノアミン作動性仮説によって支配されてきた。モノアミン作動性神経伝達物質 (セロトニン、ノルアドレナリンおよびドーパミン) は明らかに関係しているが、うつ病の病態生理学およびA D の作用機序に関する仮説の数は進化し続けている。

40

【 0 0 2 1 】

今日使用されているA D 薬は、口渇、かすみ目、腸機能障害 (下痢または便秘) など、さまざまな副作用を引き起こしている。多くの副作用は一過性 (吐き気など) であるが、中には (性的影響など) 一貫しているように見え、長期的な治療順守に影響を与える可能性がある。これが、うつ病において新たに同定された受容体またはチャネルに作用する新しい分子の探索が非常に重要である理由である。

50

【 0 0 2 2 】

いくつかのタンパク質、受容体およびチャンネルは、うつ病の分子メカニズムに関係しているとされてきた。これは、ニューロテンシン受容体 3 (N T S R 3) (特にソルチリンとも呼ばれる) の場合であり、マウスでの不活性化は基礎カリウムチャンネル T R E K - 1 について無効化されたマウスで観察されるのと同様のうつ病耐性の表現型を生じる。

【 0 0 2 3 】

最近の S T A R * D (うつ病を緩和するための連続治療法) 研究 [1 5] は、ヒトの抗うつ反応に關与する遺伝子として T R E K - 1 を薬理学的に同定した。この研究はまた、ヒトにおける研究のための候補遺伝子の同定における抗うつ治療の探索のための動物モデルの有用性を示唆している。したがって、T R E K - 1 チャンネル遮断薬は抗うつ薬のデザインの分野における新しい概念を表している。

10

【 0 0 2 4 】

今日までに、T R E K - 1 チャンネルと効果的に相互作用する分子が同定されている。これはプロペプチド (P E) : Q D R L D A P P P P A A P L P R W S G P I G V S W G L R A A A A G G A F P R G G R W R R (配列番号 1) と呼ばれる 4 4 アミノ酸のペプチドであり、成熟と同時に、同じ受容体のリガンドとなるニューロテンシン受容体 3 (N T S R 3) のフリンによって放出される。興味深いことに、このプロペプチドはまた T R E K - 1 チャンネルの活性を遮断することができることが示された。スパジン (Y A P L P R W S G P I G S W G L R 、配列番号 2) と呼ばれる前記プロペプチド由来の 1 7 アミノ酸の一部が受容体に対する全ての結合活性を保有することが示されている [1 6] 。最近、スパジンが T R E K - 1 チャンネルを特異的に遮断することが示された。うつ病のげっ歯類モデルでは、心臓および血糖インデックスレベルで、このチャンネルおよび他のカリウムチャンネルの他の機能に副作用を引き起こすことなく、抗うつ薬として作用している [1 7] 。最近、シナプス形成の調節におけるスパジンの役割が確認された [1 8] 。

20

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 2 5 】

【 非特許文献 1 】 Wong, M. & Licinic, J. Research and treatment approaches to depression. Nat Rev Neurosci. 2, 343-351 (2001)

【 発明の概要 】

30

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 2 6 】

したがって、うつ病の治療に使用できる新しい分子、より効果的で、より耐容性があり、そしてより速い作用を有する分子が本当に必要とされている。

【 0 0 2 7 】

本発明はまさにその必要性に応えそして従来技術の不利益を解決するという役割を有する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 8 】

この目的のために、本発明者らは、スパジンの分解から生じるより小さなペプチドも抗うつ剤の役割を有することができるかどうかを調査し、そして予期せずに、変性されたまたはされていないプロペプチド (P E) から誘導される新規の活性ペプチド、特に配列番号 4 の配列 (P L P R W S G P I G S W G L) のペプチド (1 3 ~ 2 7) 及び配列番号 5 の配列 (L P R W S G P I G V S W) のペプチド (1 4 ~ 2 5) を同定した。これらはスパジンの分解生成物に対応し、抗うつ薬の性質を保持している。

40

【 0 0 2 9 】

さらに、やはりプロペプチドに由来する配列番号 3 の配列 (G V S W G L R) の P E (2 2 ~ 2 8) ペプチドを、他のペプチド : ビオチン化ペプチド P E (2 2 ~ 2 8) 、配列番号 6 の配列 (P I G V S W G L R) のペプチド P I - P A (2 2 ~ 2 8) 、ビオチン化ペプチド P I - P A (2 2 ~ 2 8) 、 2 2 位のグリシンがアラニンで置換された配列番号

50

3の配列に対応する配列番号7の配列(A V S W G L R)のペプチドG / A - P E (2 2 ~ 2 8)、ビオチン化G / A - P E (2 2 ~ 2 8)ペプチド、N末端にダンシル酸化学基が付加された配列番号3の配列に対応するダンシル - P E (2 2 ~ 2 8)ペプチド、C末端にO - メチルとO - エチルがそれぞれ付加された配列番号3の配列に対応するペプチドO - メチル - P E (2 2 ~ 2 8)およびO - エチル - P E (2 2 ~ 2 8)ペプチドの設計のための基本ペプチドとして使用した。

【0030】

これらのP E (2 2 ~ 2 8)類似体(以後、スパジン類似体と呼ぶ)は、行動試験(強制泳動試験、学習性無力試験)によって測定されるように、マウスにおいて有意な抗うつ剤(A D)作用を示し、そして迅速かつより効率的に神経発生およびシナプス形成を誘導する。これらのスパジン類似体の生理学的標的はスパジンのそれらと同じであるので、それらの作用機序はスパジンのそれらと非常に類似している。これらのスパジン類似体は、T R E K - 1チャネルの阻害によって、スパジン自体よりも優れた親和性(×333)で作用する(スパジン類似体では0.12 nM、スパジンでは40 nM)。より優れた親和性とより小さいサイズのスパジン類似体を見ると、これらのペプチドの主な利点は、投与される製品の量の減少であり、潜在的に関連する副作用(毒性、腫瘍形成性など)の減少をもたらす。そして第二に、製造コストならびに既知の投与経路(i c v、i v、i p および経口)の利用可能性の減少をもたらす。従来抗うつ薬では21日ではなく4日で、スパジンが急速な効果を発揮することが以前に示されている。したがって、迅速に入手可能でありかつ迅速に生物から除去される短いペプチドの使用は、副作用のない有効な治療用製品の保証を表す。これは公衆衛生において非常に重要である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

したがって、本発明の目的は、配列番号4の配列(P L P R W S G P I G V S W G L)のペプチドP E (1 3 ~ 2 7)、配列番号5の配列(L P R W S G P I G V S W)のペプチドP E (1 4 ~ 2 5)、ビオチン化された配列番号3の配列に対応するビオチン化ペプチドP E (2 2 ~ 2 8)、配列番号6の配列(P I G V S W G L R)のペプチドP I - P E (2 2 ~ 2 8)、ビオチン化された配列番号6の配列に対応するビオチン化ペプチドP I - P E (2 2 ~ 2 8)、22位のグリシンがアラニンで置換された配列番号3の配列に対応する配列番号7の配列(A V S W G L R)のペプチドG / A - P E (2 2 ~ 2 8)、ビオチン化された配列番号7の配列に対応するビオチン化ペプチドG / A - P E (2 2 ~ 2 8)、N末端にダンシル酸化学基が付加された配列番号3の配列に対応するペプチドダンシル - P E (2 2 ~ 2 8)、及びC末端にO - メチルとO - エチル化学基がそれぞれ付加された配列番号3の配列に対応するペプチドO - メチル - P E (2 2 ~ 2 8)およびO - エチル - P E (2 2 ~ 2 8)から選択されるニューロテンシン受容体3(N T S R 3)のプロペプチド(P E)由来のペプチドである。

【0032】

本発明はまた、本発明のペプチドをコードする核酸配列に関する。この配列は、本発明のペプチドまたはそのフラグメントもしくは誘導体をトランスフェクションにより製造するために好ましく使用可能である。これは、例えば、ソルチリンS O R T 1のメッセンジャーRNAについてのG e n B a n k登録番号の配列：マウスにおけるN M _ 0 1 9 9 7 2、ヒトにおいて：N M _ 0 0 2 9 5 9である。

【0033】

本発明はまた、本発明による核酸配列を含むベクターに関する。それは、遺伝子組換え技術を介して前記細胞により本発明のペプチドを製造する目的で宿主細胞を形質転換するための任意の適切なベクターであり得る。ベクターは、例えば、p I R E Sおよびp I R E S 2およびそれらの誘導体、p c D N A 3およびその誘導体、p G E Xおよびその誘導体を含む群から選択されるベクターから得ることができる。

【0034】

本発明はまた、本発明によるペプチドおよび/または本発明による核酸配列および/ま

10

20

30

40

50

たは本発明によるベクターを含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、形質転換されそして本発明の前記ペプチドまたはそのフラグメントもしくは誘導体を製造するのに適した任意の細胞であり得る。それは、例えば、C O S - 7、H E K 2 9 3 およびその由来、N 1 E 1 1 5 および関連細胞であり得る。

【 0 0 3 5 】

したがって、本発明はまた、以下の工程を含む、本発明によるペプチドの製造方法に関する：

- 宿主細胞を本発明による核酸でトランスフェクトすること、または本発明のベクターで宿主細胞を形質転換する工程；
- 本発明によるペプチドの発現を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程；及
- 前記ペプチドを回収する工程。

【 0 0 3 6 】

本発明のペプチドを製造するために使用され得るトランスフェクションおよび形質転換技術は、当業者に公知のもの、例えば、Alloui A.ら、EMBO J. 2006 [1 9] に記載されているものである。

【 0 0 3 7 】

本発明によれば、小さいサイズの本発明のペプチドを考えると、ペプチドの好ましい製造方法は、例えば固相での化学合成である。当業者に知られている任意の技術を使用することができる。例えば、ペプチドは、Krieger D.E.ら、Proc Nat Acad Sci USA 1976年 [2 0] の固相技術に従って合成することができる。

【 0 0 3 8 】

本発明のペプチドは、新しいクラスの抗うつ剤および新しいうつ病治療戦略の確立において新しい道を開く。

【 0 0 3 9 】

本発明の目的はまた、医薬として、特に抗うつ剤として使用するための本発明によるペプチドである。

【 0 0 4 0 】

本発明の目的はまた、糖尿病、癌、卒中、神経変性病理、精神病理、特にうつ病、例えば卒中後うつ病のような種々の病状の治療に使用するための本発明によるペプチドである。いくつかの実験的事実によって裏付けられているT R E K - 1チャネルは、 β - T C 3細胞などの β - 膵臓細胞の表面に存在する。さらに、スパジン (Y A P L P R W S G P I G S W G L R、配列番号2) は、高血糖症に対してインスリン分泌をさらに増加させることが示されている (Hivelin C.ら、J Diabetes Res.2016) [2 7]。さらに、 β T C 3細胞上で、本発明者らは、配列番号3 : G V S W G L Rの配列のペプチドP E (2 2 ~ 2 8) がアラキドン酸 (a a) 感受性カリウム電流を遮断することを実証した。スパジン、ペプチドP E (2 2 ~ 2 8)、および本発明のペプチドが同じ生理学的標的を有する限り、これらのペプチドは低血糖分子と見なすこともできる。さらに、T R E K - 1チャネルはL N C a P細胞 (前立腺癌) などの癌細胞の表面にも存在している。L N C a P細胞において、本発明者らは、P E (2 2 ~ 2 8) ペプチドがアラキドン酸 (a a) 感受性カリウム電流を遮断し、そしてそれらの増殖を阻害することを実証した。ペプチドP E (2 2 ~ 2 8) および本発明のペプチドは同じ生理学的標的を有するので、それらは抗癌活性を有するとも考えられ得る。本発明によるペプチドの使用はまた、卒中に対する神経保護またはてんかんにおいても想定され得る。

【 0 0 4 1 】

G / A - P E (2 2 ~ 2 8) を除いて、上で定義された本発明のペプチドは、新しいタイプの抗うつ剤を構成する天然物である。それらは、うつ病の治療に現在使用されている薬物の全ての望ましくない副作用を回避することを可能にする。従来技術で使用されている薬物の副作用はそれらの化学的性質から由来する。これらの先行技術の薬物は、細胞膜を受動的に通過する性質をしばしば持ち、細胞内エフェクターとの非特異的相互作用をも

たらず分子である。本発明のペプチドの性質はこの問題を回避することを可能にする。

【0042】

さらに、カリウムチャネルTREK-1に対する本発明のペプチドの直接的な作用は、従来の抗うつ剤の作用時間、しばしば長い時間を十分に短縮することができた。

【0043】

当然のことながら、添付の図面を参照しながら非限定的に与えられる以下の実施例を読めば、当業者には他の利点が明らかになり得る。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】図1は、電気生理学的実験によりインピトロで測定された、スパジンおよびペプチドPE(22~28)の活性と比較した、TREK-1チャネルの活性に対する本発明のスパジン類似体の作用を示す。

10

【図2】図2は、スパジンおよびペプチドPE(22~28)の活性と比較した、電気生理学的実験によりインピトロで測定された、TREK-1チャネルの活性に対するスパジン類似体G/A-PE(22~28)およびビオチン化G/A-PE(22~28)の作用を示す。

【図3】図3は、強制泳動試験(FST)を受けたマウスにおいてインピボで測定された、本発明によるスパジン類似体の抗うつ活性を、スパジンおよびペプチドPE(22~28)のそれと比較して示す。

【図4】図4は、スパジンおよびペプチドPE(22~28)のそれと比較した、学習無力試験(LHT)を受けたマウスのin vivoで測定した、スパジン類似体G/A-PE(22~28)およびビオチン化G/A-PE(22~28)の抗うつ活性を示す。

20

【図5】図5は、ペプチドPE(22~28)のそれと比較した、スパジン類似体G/A-PE(22~28)およびビオチン化G/A-PE(22~28)の神経発生に対する作用の免疫組織化学的研究を示す。

【図6】図6は、ペプチドPE(22~28)(A)と比較した、スパジン類似体G/A-PE(22~28)およびビオチン化G/A-PE(22~28)(それぞれBおよびC)の作用の研究を示す。各ペプチドについてのPSD-95のシナプス形成ヒストグラムが(D)である。

【図7】図7は、電気生理学的実験によって同様にインピトロで測定された、膵臓細胞βTC3(A)および癌性細胞LNCaP(B)において発現されたTREK-1チャネルの活性に対するペプチドPE(22~28)の作用を示す。並びにLNCaP癌細胞の増殖についての結果が(C)である。

30

【実施例】

【0045】

実施例1：TREK-1チャネル活性に対するスパジンアナログの作用

スパジン類似体およびスパジンの効果を測定するすべての実験は、TREK-1チャネル、hTREK-1/HEK293で安定的にトランスフェクトされたβTC3またはLNCaPまたはHEK293細胞に対して行われた。hTREK-1/HEK293細胞株は研究室で調製された[21]。これらの細胞はまたレポーター遺伝子：それらの可視化を可能にするE-グリーン蛍光タンパク質(EGFP)を発現する。

40

【0046】

これらの細胞を、使用する24~72時間前に、直径35mmの20,000細胞/皿の密度で播種した。

【0047】

HEK293細胞をDMEM培地(Gibco)/10%ウシ胎児血清(FCS、ICN)/1%ストレプトマイシン+ペニシリン混合物(Gibco)/1%グルタマックス(Gibco)/0.5mg/mLのG418(Sigma)中で5%CO₂の存在下で37℃で培養した。

【0048】

50

β TC3細胞を、2.5%FCS、50 μ Mベータ-メルカプトエタノール、10mM HEPES、1mMピルビン酸ナトリウム、50 μ g/ml ゲンタマイシンおよび1% ストレプトマイシン+ペニシリン混合物を補充したRPMI 1640培地中、37℃で5%CO₂の存在下で培養した。

【0049】

LNCaP細胞をDMEM培地(Gibco)/10%ウシ胎児血清(FCS、ICN)/1%ストレプトマイシン+ペニシリン混合物(Gibco)/1%グルタマックス(Gibco)/5%CO₂の存在下で37℃で培養した。1日目に、hTREK-1/HEK293または β TC3またはLNCaP細胞を、2mlの培地を含有する直径35mm皿あたり20,000細胞で播種した。2日目から4日目まで、細胞を電気生理学的方法で測定した。

10

【0050】

全ての測定は室温、すなわち21~22℃で行われた。hTREK-1/HEK293細胞は、480nmでの励起後にEGFPによって放出された蛍光によって同定された。

【0051】

全細胞パッチクランプ法を用いてTREK-1チャネル活性を測定した。使用した装置はRK400パッチクランプ増幅器(Axon Instruments、米国)である。1.3~8M Ω 抵抗パッチピペットをハウケイ酸ガラスキャピラリーから調製し、そして155mM KCl、3mM MgCl₂、5mM EGTA、10mM HEPES/KOH pH7.2の溶液で満たした。

20

【0052】

細胞培養培地を、10mMテトラエチルアンモニウムクロリド、3mM 4-アミノピリジンを含む150mM NaCl、5mM KCl、3mM MgCl₂、1mM CaCl₂、10mM HEPES/NaOH pH7.4の溶液と交換した。細胞にこの溶液を連続的に注入した。測定された細胞の膜の静止電位は-80mVに設定された。

【0053】

電圧変化は、連続的なランプ(-100から+60mVへ)または10mVの電位ジャンプ(-100から+60mVへの1ジャンプ当たり1.5秒)のいずれかによって得られた。得られたデータをPclampソフトウェアで分析した。

30

【0054】

図1および2に記載の電流は0mVで得た。表された図1および2の結果は平均値 $\pm$ 標準偏差である。図2のIC50値は、シグモイド関数を用いて実験データをプロットすることによって得られた。

【0055】

次いで、チャネル活性を、上記のように全細胞構成において「パッチクランプ」技術によって測定した。

【0056】

0mVで測定された本発明の全てのスパジン類似体およびスパジンのTREK-1チャネル活性の阻害を図1に示す。これは、ペプチドPE(14~25)、PE(22~25)を除く全てのスパジン類似体を示す。およびPE(22~27)は、スパジン(PE(12~28))と同程度にTREK-1チャネルの活性を遮断することができる。

40

【0057】

0mVで測定されたTREK-1チャネル活性阻害の用量反応曲線は、類似体G/A-PE(22~28)またはビオチン化G/A-PE(22~28)またはスパジンの存在下で行われた。これらの曲線を図2に示す。これは、ペプチドG/A-PE(22~28)およびビオチン化G/A-PE(22~28)について、それぞれ0.12nMおよび0.13nMの半減濃度(IC50)を示し、およびスパジンについては40nMの半減濃度(IC50)を示す。

【0058】

50

全ての結果は、ほとんどのスパジン類似体が、スパジンよりも優れた親和性（× 3 3 3）で、そしていくつかの類似体については、ペプチド P E（2 2 ~ 2 8）と同等の親和性で T R E K - 1 チャネルを遮断できることを示す。

【 0 0 5 9 】

図 7 A に記載の β T C 3 細胞に印加された電圧 [$I = f(V)$] の関数として測定された電流強度は、スパジンが β T C 3 細胞上に発現されかつアラキドン酸（a a）で以前に活性化された T R E K - 1 チャネルを遮断することができることを示す。本発明のスパジンおよびペプチドは同じ生理学的標的を有し、したがってこれらのペプチドは血糖降下分子と見なすことができる。

【 0 0 6 0 】

10

図 7 B に記載された L N C a P 細胞に印加された電圧 [$I = f(V)$] の関数として測定された電流強度は、ペプチド P E（2 2 ~ 2 8）が、L N C a P 細胞上に発現され、以前にアラキドン酸（a a）で活性化した T R E K - 1 チャネルを遮断することができることを示す。さらに、ペプチド P E（2 2 ~ 2 8）の存在下または非存在下で 2 4 または 4 8 時間後に培養中の細胞を計数した後に得られた L N C a P 細胞の増殖は、ペプチド P E（2 2 ~ 2 8）が阻害することができることを示す。細胞増殖ペプチド P E（2 2 ~ 2 8）および本発明のペプチドは同じ生理学的標的を有し、したがってこれらのペプチドも抗癌活性を有すると見なすことができる。

【 0 0 6 1 】

20

実施例 2：挙動試験

強制泳動試験（F S T）

物質の抗うつ活性を決定するために古典的行動試験が開発された（Nestier E.J. et al、2002、Cryan J. and Holmes A.、2005）[2 2 ~ 2 3]。本発明のスパジン類似体の効果を、本発明のスパジン類似体が溶解されている食塩水の効果およびスパジンの効果と比較した。使用したマウス系統は、C 5 7 B I / 6 J 系統であった。

【 0 0 6 2 】

食塩水、スパジン類似体およびスパジンを 1 0 0 μ l のボーラスで 1 0 0 μ g / k g の用量で腹腔内（I P）にマウスに投与した。

【 0 0 6 3 】

実験は、試験物質の投与から 3 0 分後に、マウスを直径 1 5 c m、高さ 3 0 c m、1 1 c m の水を含有する 2 2 の容器に 6 分間浸し、最後の 4 分の間の無動時間を測定することからなる。

30

【 0 0 6 4 】

これらの試験の結果を図 3 に示す：F S T 試験、値 $\pm$ S E M を対照条件（生理食塩水）と統計的に比較した。*** $P < 0.001$ 、（「A N O V A」試験 = 分散分析の試験）。

【 0 0 6 5 】

結果は、T R E K - 1 チャネルの作用を阻害することができるスパジン類似体が、マウスへのそれらの I P 注射後の強制水泳試験において有効であることを示している。他方、T R E K - 1 チャネルを阻害するのに有効ではないペプチド P E（2 2 ~ 2 7）もまた、強制泳動試験における不動時間を短縮するのには無効である。

40

【 0 0 6 6 】

学習無力試験（L H T）

学習した甘受または学習した無力感は、動物に甘受状態を誘導するための電気ショックの反復投与に基づくモデルである。確かに、避けられない電気ショックを受けた動物はそれらを受けることを甘受し、逃げようとしないことが示されている（Seligman および Beagley、ラット J Comp Physiol Psychol 88、534-541、1975）[2 4]。

【 0 0 6 7 】

この装置は、スライドドアによって分離された 2 つの区画と、電気パルスが供給される金属グリッドからなる床とを備えている。学習された無力感のプロトコルは、動物のコンディショニング段階とテスト段階の 2 つの段階に分けられる。

50

【0068】

条件付けは4日間にわたって行われ、その間にマウスは1時間0.3mAの回避不可能な360回の電気ショックを受けた(ドア、2つの区画を分離し、閉じている)。衝撃は2秒間続き、各衝撃の間に8秒間の間隔を置いた。このコンディショニングステップは、動物に無力感という現象をもたらす。

【0069】

試験当日、マウスを同じ区画に入れたが、ショックを回避する可能性がある。テストは30試行を数えた。ショックの施行中、2つの区画を隔てる扉が開き、動物が逃げる事ができた。動物がコンパートメントを変えると、試験は終了し、そしてショックは止まる。マウスがコンパートメントを変えなければ、ショックは24秒後に止まり、テストは終了する。この試験により、動物の逃避潜時を記録することが可能になった。次に、30のテストを5でグループ化し、平均逃避時間を計算した。

10

【0070】

分子であるG/A-PE(22~28)およびビオチン化G/A-PE(22~28)または食塩水を、調整の30分前に、食塩水中で調製した 10^{-6} M溶液100 μ Lのボラスの形態で注射する。

【0071】

図4に示された結果は、以前に記載されたのと同じ条件下でマウスに投与されたペプチドG/A-PE(22~28)およびビオチン化G/A-PE(22~28)が、ペプチドPE(22~28)と同等の方法で学習した甘受試験における逃避潜時を短縮できることを示す。

20

【0072】

実施例3：神経発生およびシナプス形成に対するスパジンアナログの作用

免疫組織化学による神経発生の研究

BrdU(5-プロモ-2'-デオキシウリジン)は、チミジンに類似の合成ヌクレオシドである。分裂中の細胞のS期(間期中の染色体複製)中のDNA複製中に取り込まれる。BrdUの注射は、免疫学的標識によって分析されるべき組織の分割における細胞を視覚化することを可能にする。本研究では、マウスの海馬神経発生を、スパジンまたは異なる類似体での治療後に評価した。

【0073】

30

行動試験の後、Beauquis、J.ら(Eur J Neurosci 23、1539-1546、2007)[25]の改良プロトコルに従って、マウスに120mg/kgの最終濃度でBrdUを腹腔内注射した。2時間間隔で10mg/mlの300 μ Lの4回注射を行った。注射の24時間後、マウスをペントバルビタール(100mg/kg)で麻酔した後、心臓内に灌流した。心臓内灌流の間、生理食塩水を投与してマウスの体から全ての血液を除去し、次いで4%パラホルムアルデヒド(PFA)を灌流して臓器を固定した。4%PFA中での固定後もまた一晩行った。マウスの脳をビブラトーム(Leica)で切断したところ、40 μ mの浮遊前頭切片が得られた。免疫学的反応のために選択された切片は、ブレグマ3.3から5.3の範囲のものであった。8つの切片を規則的な間隔で選択し、海馬全体を覆うことができるようにしながら、一方の脳から他方の脳へと均質に保った。

40

【0074】

免疫学的反応は、抗BrdU一次抗体(BD Pharmingen、1/8000)を脳切片と共に4で一晩インキュベートすることによって行った。次いで脳切片をPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で洗浄し、二次抗体(ビオチン化ヤギ抗マウス抗体、Vector laboratories、1/400)と共に2時間インキュベートした。免疫学的反応を増幅するために、アビジン/ビオチン/ペルオキシダーゼ複合体(ABC Vectastain Kit、Vector Laboratories)中で1時間インキュベートした。最後に、ニッケルの溶液、3-3'ジアミノベンジジンの溶液およびH₂O₂を含むペルオキシダーゼ基質キット(Vector Laboratories)を用いて明らかにした。

50

【 0 0 7 5 】

次に切片をスライドに載せ、エンテランで固定した。海馬の歯状回のBrdU陽性細胞を各脳の両方の半球で計数した。次いで、8つの切片で得られた細胞数を40倍して、海馬全体の増殖細胞の総数を説明した。

【 0 0 7 6 】

図5に示す結果は、ペプチドG/A-PE(22~28)およびビオチン化G/A-PE(22~28)が、わずか4日間の治療後に神経新生の増加を誘導することができることを示している。これらの増加は、未修飾ペプチドPEについて同じ条件下で得られた増加よりも大きい(22~28)。

【 0 0 7 7 】

シナプス形成

妊娠した雌C57Bl/6Jマウス(20~25g、Janvier Labs、St Berthevin、フランス)を、30%酸素および70%亜酸化窒素と混合した2%イソフルランの吸入によって麻酔し、次いで屠殺した。胚(E14)を取り出し、大脳皮質を1%グルコースを含有するPBS中で解剖した。ニューロンは、Brewer and Torrice III、2007[26]に記載されているように、大脳皮質から機械的解離によって調製した。解離したニューロンをポリ-L-リジン処理プレートに分配し、37℃で2%B27(Invitrogen、Fisher Scientific、Illkirch、フランス)および50μg/mlゲンタマイシン(Sigma、フランス)を含有する神経基礎培地中で最大10日間培養した。5%CO₂下での温度。

【 0 0 7 8 】

スパジンG/A-PE(22~28)およびビオチン化G/A-PE(22~28)の類似体は、Covallab(Villeurbanne、フランス)によって合成された。

【 0 0 7 9 】

14日目の段階(E14)でC57Bl/6Jマウス胚(Janvier)の新皮質から単離した皮質ニューロン培養物を、1μMの各スパジン類似体と共にインキュベートした。インキュベーションは、140mMのNaCl、5mMのKCl、1.8mMのCaCl₂、3.6mMのMgCl₂、および0.1%のBSAを含有するpH7.4のイーグルス-Tris-HEPES緩衝液中で行った。

【 0 0 8 0 】

ペプチドG/A-PE(22~28)およびビオチン化G/A-PE(22~28)で様々な期間(0、5、8、24および36時間)処理した皮質ニューロンをLaemmli緩衝液中でホモジナイズし、以下を使用して分析した。10%SDS-Pageゲル。次いで、分離したタンパク質をゲルからニトロセルロース膜(VWR、Fontenay-sous-Bois、フランス)に移し、5%スキムミルクまたは5%BSAのPBS溶液で室温で30分間ブロッキングした。膜をPSD-95タンパク質(Cell Signaling、非標識、Montigny-le-Bretonneux、フランス)に対する抗体と4℃で一晩インキュベートした。β-アクチン含有量は、抽出後、1/5000希釈の抗β-アクチン抗体(Santa Cruzマウスモノクローナル抗体、1/5000希釈)を用いて決定した。PBS-Tween 0.1%中で4回洗浄した後、HRP結合抗マウスおよび抗ウサギ二次抗体(Amersham Biosciences、Orsay、フランス、1/10000)を室温で1時間インキュベートする。タンパク質は、LAS-3000イメージングシステム(富士通、デュッセルドルフ、ドイツ)を用いてECL Plus検出試薬(Amersham Biosciences)で検出した。各標識バンドの相対強度は、ImageJソフトウェア(Wayne Rasband、National Institute of Health、米国メリーランド州ベセスダ)を使用して濃度測定スキニングによって分析した。示されるように、タンパク質活性化を全βアクチンを用いて正規化した。

【 0 0 8 1 】

図 6 に示す結果は、スパジン類似体がシナプス形成を急速に増加させたことを示している。スパジン類似体 G / A - P E (2 2 ~ 2 8) またはビオチン化 G / A - P E (2 2 ~ 2 8) (1 μ M) で処置した皮質ニューロンは、24 時間後およびより重要なことには 36 後に観察可能な P S D - 9 5 シナプスタンパク質発現の増加を示す。時間です。最初の 5 時間の間のわずかな減少を除いて、スパジン類似体での処置は 36 時間まで P S D - 9 5 の発現を連続的に増加させることに留意されたい (図 6 D)。これらの増加は、未修飾ペプチド P E について同じ条件下で得られた増加よりも大きい (2 2 ~ 2 8)。これらの結果は、スパジン類似体 G / A - P E (2 2 ~ 2 8) またはビオチン化 G / A - P E (2 2 ~ 2 8) がペプチド P E (2 2 ~ 2 8) よりも強力に神経新生を増加させるがシナプス形成もより強力に増加することを示す。大部分の新形成細胞の成熟は、成熟ニューロンを生成することである。

【 0 0 8 2 】

[参考文献]

- [1] Wong, M. & Licinic, J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.* 2, 343-351 (2001).
- [2] Moller HJ. Suicide, suicidality and suicide prevention in affective disorders. *Acta Psychiatr Scand*; 418 (suppl) : 73-80 (2003).
- [3] Nestler, E. et al. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25 (2002).
- [4] Baghai TC, Volz HP, Moller HJ. Drug treatment of depression in the 2000s: An overview of achievements in the last 10 years and future possibilities. *World J Biol Psychiatry*; 7(4):198-222 (2006). 10
- [5] Weilburg JB. An overview of SSRI and SNRI therapies for depression. *Manag Care.* Jun; 13 (6 Suppl Depression): 25-337 (2004).
- [6] Manji HK, Gottesman II, Gould TD. Signal transduction and genes-to-behaviors pathways in psychiatric diseases. *Sci STKE*; 207 : pe49 (2003).
- [7] Reus VI, Wolkowitz OM. Antigluco-corticoid drugs in the treatment of depression. *Expert Opin Investig Drugs*; 10: 1789-96 (2001).
- [8] Griebel G, Simiand J, Steinberg R, et al. 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methylN-(2-propynyl)-1, 3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR1 25543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *J Pharmacol Exp Ther*; 301 : 333-45 (2002). 20
- [9] Kramer MS, Gutler N, Feighner J, et al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281 : 1640-1645 (1998).
- [10] Skolnick P. Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol* 375 :31-40(1999).
- [11] Kempermann G, Kronenberg G. Depressed new neurons. Adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* ; 54 : 499-503 (2003). 30
- [12] Malberg JE, Schechter LE. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs. *Curr Pharm Des*; 11 : 145-155 (2005)
- [13] Duman, R. & Monteggia, L. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* (9, 1116-1127 (2006).

- [14] Henn FA, Vollmayr B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biol Psychiatry*; 56 : 146-50.(2004).
- [15] Perlis, R. H., Moorjani, P., Fagerness, J., Purcell, S., Trivedi, M. H., Fava, M., Rush, A. J., Smoller, J. W.,. Pharmacogenetic Analysis of Genes Implicated in Rodent Models of Antidepressant Response: Association of TREK1 and Treatment Resistance in the STAR(*)D Study. *Neuropsychopharmacology*. Nov;33(12):2810-9 (2008)
- [16] Jean Mazella, Olivier Petraut, Marc Borsotto, Catherine Heurteaux, Catherine Widmann Peptide dérivé du récepteur 3 de la neurotensine et utilisation dans le traitement de maladies psychiatriques. W02009103898 A1; PCT/FR2008/001784, date de publication 27 août 2009 10
- [17] H. Moha ou Maati, J. Veyssiere, F. Labbal, T. Coppola, C. Gandin, C. Widmann, J. Mazella, C. Heurteaux, M. Borsotto. Spadin as a new antidepressant: absence of side effects on TREK-1 controlled functions. *Neuropharmacology*. 2012 Jan;62(1):278-88. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.019. Epub 2011 Jul 22.
- [18] C. Devader, A. Khayachi, J. Veyssière, H. Moha ou Maati, M. Roulot, S. Moreno, M. Borsotto, S. Martin, C. Heurteaux and J. Mazella. In vitro and in vivo regulation of synaptogenesis by novel antidepressant spadin. *British Journal of Pharmacology*. 2015 May; 172(10):2604-17. doi: 10.1111/bph.13083. Epub 2015 Mar 24. 20
- [19] Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noël J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J*. 2006 Jun 7; 25(11):2368-76.
- [20] Krieger DE, Erickson BW, Merrifield RB. Affinity purification of synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Sep; 73(9):3160-4. 30
- [21] Moha ou Maati, H., Peyronnet, R., Devader, C., Veyssiere, J., Labbal, F., Gandin, C., Mazella, J., Heurteaux, C., Borsotto, M.A. human TREK-1/HEK cells: a highly efficient screening tool for drug development in neurological diseases. *PLoS One*. 2011;6(10):e25602. doi: 10.1371/journal.pone.0025602. Epub 2011 Oct 14. (2011).
- [22] Nestler, E.J. et al. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry*. 15, 503-528 (2002).
- [23] Cryan, J. & Holmes, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*. 4, 775-790 (2005). 40

- [24] Seligman and Beagley, Learned helplessness in the rat. J Camp Physiol Psychol 88, 534-541. (1975).
- [25] Beauquis, J. et al. Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. Eur J Neurosci 23, 1539-1546. (2006)
- [26] Brewer et Torricelli JR. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. Nat Protoc.;2(6):1 490-8. (2007).
- [27] Hivelin C, Béraud-Dufour S, Devader C, Abderrahmani A, Moreno S, Moha Ou Maati H, Djillani A, Heurteaux C, Borsoito M, Mazella J, Coppola T.(2016) Potentiation of Calcium Influx and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cell by the Specific TREK-1 Blocker Spadin. J Diabetes Res. 2016:2016:3142175. doi: 10.1155/2016/3142175).

10

【 図 1 】

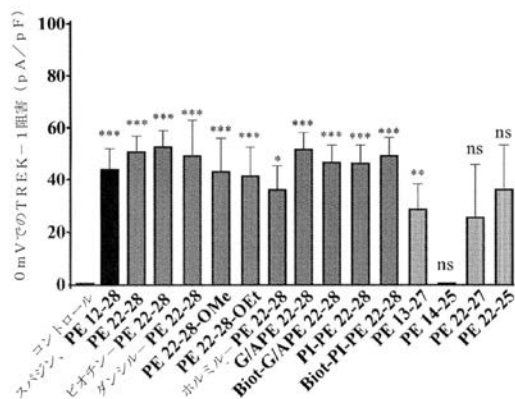


Figure 1

【 図 2 】

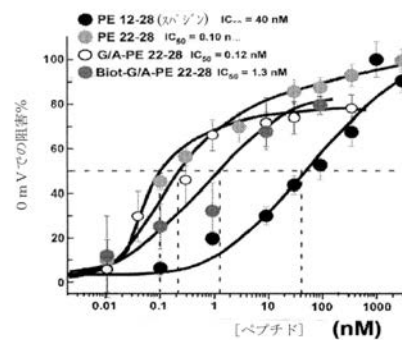


Figure 2

【 図 3 】

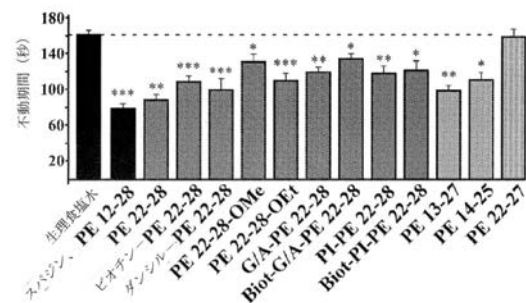
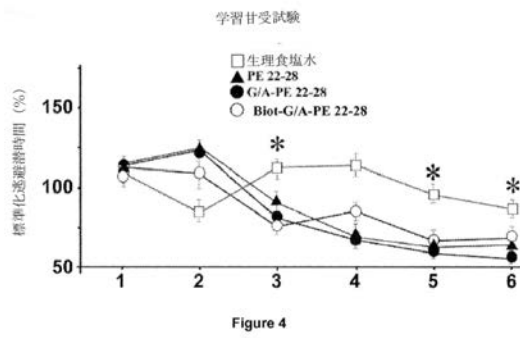
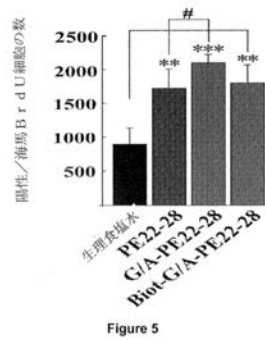


Figure 3

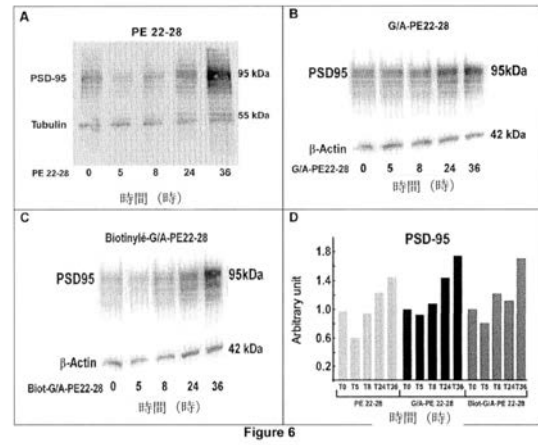
【図 4】



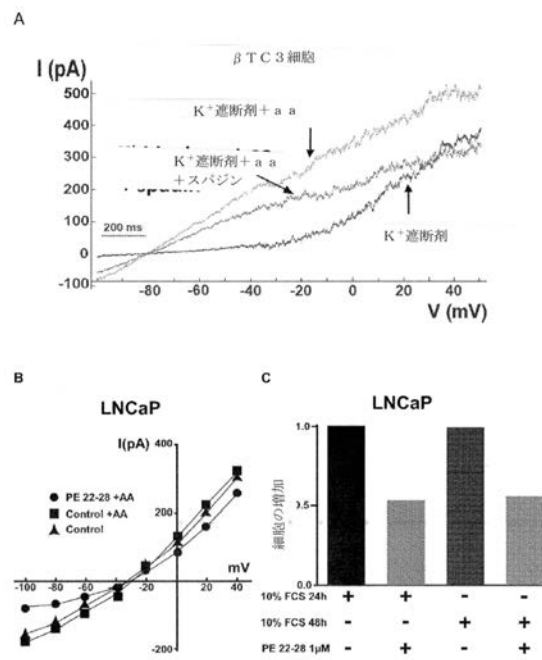
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

2020502995000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2017/052788

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/72 A61K38/08 A61K38/10 C07K7/06 C07K7/08 ADD.		
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) A61K C07K		
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) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/110915 A2 (MEDINCELL [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 30 July 2015 (2015-07-30) page 4, line 29 - page 5, line 17 claim 40; figure 1 -----	1-10
X	US 2012/322060 A1 (MAZELLA JEAN [FR] ET AL) 20 December 2012 (2012-12-20) paragraph [0064] -----	1-10
X	WO 2004/056385 A2 (UNIV AARHUS [DK]; NYKJAER ANDERS [DK]; PETERSEN CLAUS MUNCK [DK]) 8 July 2004 (2004-07-08) page 21, line 5 - line 17 page 28, line 8 - line 13 claims 17,27,29 ----- -/--	1-10
☒ 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		Date of mailing of the international search report
13 February 2018		01/03/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pilat, Daniel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2017/052788

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/103898 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV NICE SOPHIA ANTIPOLIS [FR]; MAZELLA) 27 August 2009 (2009-08-27) abstract -----	1-10
A	"LICENSING OPPORTUNITIES CNRS patent portfolio related to Central Nervous System Disorders", 1 January 2014 (2014-01-01), XP055191985, Retrieved from the Internet: URL:http://www.fist.fr/wp-content/uploads/file/Portefeuilles/CNRS [retrieved on 2015-05-28] abstract -----	1-10
X,P	DEVADER CHRISTELLE ET AL: "Serum sortilin-derived propeptides concentrations are decreased in major depressive disorder patients", JOURNAL OF AFFECTIVE DISORDERS, ELSEVIER BIOCHEMICAL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 208, 4 November 2016 (2016-11-04), pages 443-447, XP029835021, ISSN: 0165-0327, DOI: 10.1016/J.JAD.2016.10.049 the whole document -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2017/052788

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:

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.:

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/FR2017/052788

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

1. Claims: I-10 (in part)

Peptide derived from the neurotensin receptor-3 (NTSR3) propeptide (PE) PE(13-27) of sequence SEQ ID NO: 4 (PLPRWSGPIGVSWGL)

2. Claims: I-10 (in part)

Peptide derived from the neurotensin receptor-3 (NTSR3) propeptide (PE) peptide PE(14-25) of sequence SEQ NO: 5 (LPRWSGPIGVSW)

3. Claims: I-10 (in part)

Biotinylated peptide derived from the neurotensin receptor-3 (NTSR3) propeptide (PE) PE(22-28) corresponding to the biotinylated sequence SEQ ID NO : 3, the peptide PI-PE(22-28) of sequence SEQ ID NO : 6 (PIGVSWGLR), the biotinylated peptide PI-PE(22-28) corresponding to the biotinylated sequence SEQ ID NO : 6, the peptide G/A-PE(22-28) of sequence SEQ ID NO : 7 (AVSWGLR) corresponding to the sequence SEQ ID NO : 3 in which the glycine at position 22 has been replaced by an alanine, the biotinylated peptide G/A-PE(22-28) corresponding to the biotinylated sequence SEQ ID NO : 7, the peptide dansyl-PE(22-28) corresponding to the sequence SEQ ID NO : 3 in which a dansyl chemical group has been added at the N-terminal, and the peptides 0-methyl -PE(22-28) and 0-ethyl-PE(22-28) corresponding to the sequence SEQ ID NO : 3 in which a 0-methyl and 0-ethyl chemical group has been added at the C-terminal, respectively

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2017/052788

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015110915 A2	30-07-2015	CA 2938019 A1 EP 3099313 A2 JP 2017505772 A US 2017072013 A1 WO 2015110915 A2	30-07-2015 07-12-2016 23-02-2017 16-03-2017 30-07-2015
US 2012322060 A1	20-12-2012	NONE	
WO 2004056385 A2	08-07-2004	AT 545429 T AU 2003287930 A1 DK 1891966 T3 EP 1589988 A2 EP 1891966 A1 ES 2380055 T3 US 2007264195 A1 US 2012082671 A1 US 2013164297 A1 US 2015232565 A1 US 2017158766 A1 WO 2004056385 A2	15-03-2012 14-07-2004 02-04-2012 02-11-2005 27-02-2008 08-05-2012 15-11-2007 05-04-2012 27-06-2013 20-08-2015 08-06-2017 08-07-2004
WO 2009103898 A1	27-08-2009	AT 535543 T CA 2709907 A1 EP 2077278 A1 EP 2229408 A1 ES 2377489 T3 JP 5487117 B2 JP 2011505864 A US 2011237515 A1 WO 2009103898 A1	15-12-2011 27-08-2009 08-07-2009 22-09-2010 28-03-2012 07-05-2014 03-03-2011 29-09-2011 27-08-2009

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/052788

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV. C07K14/72	A61K38/08	A61K38/10 C07K7/06 C07K7/08
ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2015/110915 A2 (MEDINCELL [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 30 juillet 2015 (2015-07-30) page 4, ligne 29 - page 5, ligne 17 revendication 40; figure 1 -----	1-10
X	US 2012/322060 A1 (MAZELLA JEAN [FR] ET AL) 20 décembre 2012 (2012-12-20) alinéa [0064] -----	1-10
X	WO 2004/056385 A2 (UNIV AARHUS [DK]; NYKJAER ANDERS [DK]; PETERSEN CLAUS MUNCK [DK]) 8 juillet 2004 (2004-07-08) page 21, ligne 5 - ligne 17 page 28, ligne 8 - ligne 13 revendications 17,27,29 ----- -/-	1-10
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
13 février 2018		01/03/2018
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Pilat, Daniel

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2017/052788

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 2009/103898 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV NICE SOPHIA ANTIPOLIS [FR]; MAZELLA) 27 août 2009 (2009-08-27) abrégé	1-10
A	----- "LICENSING OPPORTUNITIES CNRS patent portfolio related to Central Nervous System Disorders", 1 janvier 2014 (2014-01-01), XP055191985, Extrait de l'Internet: URL:http://www.fist.fr/wp-content/uploads/file/Portefeuilles/CNRS [extrait le 2015-05-28] abrégé	1-10
X,P	----- DEVADER CHRISTELLE ET AL: "Serum sortilin-derived propeptides concentrations are decreased in major depressive disorder patients", JOURNAL OF AFFECTIVE DISORDERS, ELSEVIER BIOCHEMICAL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 208, 4 novembre 2016 (2016-11-04), pages 443-447, XP029835021, ISSN: 0165-0327, DOI: 10.1016/J.JAD.2016.10.049 le document en entier -----	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE	Demande internationale n° PCT/FR2017/052788
Cadre n°. II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)	
Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes : 1. ☐ Les revendications n°^{es} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir : 2. ☐ Les revendications n°^{es} parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier : 3. ☐ Les revendications n°^{es} parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4. a).	
Cadre n°. III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)	
L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir: voir feuille supplémentaire 1. ☒ Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche. 2. ☐ Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature. 3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^{es}: 4. ☐ Aucune taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^{es}: Remarque quant à la réserve ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve. ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation. ☒ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.	

Demande internationale No. PCT/ FR2017/052788

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-10(en partie)

Peptide dérivé du propeptide (PE) du récepteur 3 de la neurotensine (NTSR3) PE(13-27) de séquence SEQ ID NO: 4 (PLPRWSGPIGVSWGL)

2. revendications: 1-10(en partie)

Peptide dérivé du propeptide (PE) du récepteur 3 de la neurotensine (NTSR3) peptide PE(14-25) de séquence SEQ ID NO: 5 (LPRWSGPIGVSW)

3. revendications: 1-10(en partie)

Peptide dérivé du propeptide (PE) du récepteur 3 de la neurotensine (NTSR3) PE(22-28) biotinylé correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3 biotinylée, le peptide PI-PE(22-28) de séquence SEQ ID NO : 6 (PIGVSWGLR), le peptide PI-PE(22-28) biotinylé correspondant à la séquence SEQ ID NO : 6 biotinylée, le peptide G/A-PE(22-28) de séquence SEQ ID NO : 7 (AVSWGLR) correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3 dans laquelle la glycine en position 22 a été remplacée par une alanine, le peptide G/A-PE(22-28) biotinylé correspondant à la séquence SEQ ID NO : 7 biotinylée, le peptide dansyle-PE(22-28) correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3 dans laquelle un groupe chimique dansylique a été ajouté en N-terminal, et les peptides O-méthyl-PE(22-28) et O-éthyl-PE(22-28) correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3 dans laquelle un groupe chimique O-méthyl et O-éthyl a été ajouté en C-terminal, respectivement

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2017/052788

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2015110915 A2	30-07-2015	CA 2938019 A1 EP 3099313 A2 JP 2017505772 A US 2017072013 A1 WO 2015110915 A2	30-07-2015 07-12-2016 23-02-2017 16-03-2017 30-07-2015
US 2012322060 A1	20-12-2012	AUCUN	
WO 2004056385 A2	08-07-2004	AT 545429 T AU 2003287930 A1 DK 1891966 T3 EP 1589988 A2 EP 1891966 A1 ES 2380055 T3 US 2007264195 A1 US 2012082671 A1 US 2013164297 A1 US 2015232565 A1 US 2017158766 A1 WO 2004056385 A2	15-03-2012 14-07-2004 02-04-2012 02-11-2005 27-02-2008 08-05-2012 15-11-2007 05-04-2012 27-06-2013 20-08-2015 08-06-2017 08-07-2004
WO 2009103898 A1	27-08-2009	AT 535543 T CA 2709907 A1 EP 2077278 A1 EP 2229408 A1 ES 2377489 T3 JP 5487117 B2 JP 2011505864 A US 2011237515 A1 WO 2009103898 A1	15-12-2011 27-08-2009 08-07-2009 22-09-2010 28-03-2012 07-05-2014 03-03-2011 29-09-2011 27-08-2009

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/08
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06
A 6 1 K	38/08	(2019.01)	A 6 1 K	38/08
A 6 1 K	38/10	(2006.01)	A 6 1 K	38/10
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 K	47/54	(2017.01)	A 6 1 K	47/54
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1

(31)優先権主張番号 1754127

(32)優先日 平成29年5月11日(2017.5.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関

フランス(FR)

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ジャン・マゼラ

フランス・0 6 4 1 0・ピオット・シュマン・デ・ヴィニャス・1 3 8 0

(72)発明者 マルク・ボルソット

フランス・0 6 1 3 0・グラス・ブールヴァール・エマニュエル・ルキエ・4 7

(72)発明者 カトリーヌ・ウルトー

フランス・0 6 4 8 0・ラ・コル・シュル・ルー・シュマン・ノートル・ダム・2 3 0

(72)発明者 アラディン・ジラニ

アルジェリア・1 9 2 0 0・セティフ・アイン・オウルメネ・シテ・デ・3 6 0・ロジュマン・1 6 7

(72)発明者 セバスチャン・モレノ

フランス・0 6 1 4 0・ヴァンス・シュマン・ドウ・ヴォージュラード・1 2 1 1

(72)発明者 マリエル・ピエトリ

フランス・２０００・アジャクシオ・リュ・ドクター・ボンパニ・９

Fターム(参考) 4B064 AG20 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C076 AA95 CC01 CC11 CC21 CC27 DD61 EE59 FF70

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17 BA18 CA59 DB63 NA14 ZA02

ZA06 ZA36 ZB26 ZC35 ZC51

4H045 AA10 AA20 AA30 BA14 BA41 CA40 DA50 EA20 EA27 EA28

FA74