

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02010/087480**

発行日 平成24年8月2日(2012.8.2)

(43) 国際公開日 **平成22年8月5日(2010.8.5)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 B 0 1 8
<b>A 6 1 P 25/22 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/22	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 25/20 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/20	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 25/24 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/24	
<b>A 6 1 P 25/18 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2010-548585 (P2010-548585)	(71) 出願人	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/051362	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(22) 国際出願日	平成22年2月1日(2010.2.1)	(72) 発明者	大日向 耕作 京都府宇治市五ヶ庄 国立大学法人京都大学大学院農学研究科内
(31) 優先権主張番号	特願2009-21958 (P2009-21958)	(72) 発明者	金川 典正 京都府宇治市五ヶ庄 国立大学法人京都大学大学院農学研究科内
(32) 優先日	平成21年2月2日(2009.2.2)	Fターム(参考)	4B018 LB01 LB08 LE01 LE02 LE03 LE04 LE05 MD19 MD20 ME14 4C084 AA02 BA04 BA16 BA23 NA14 ZA05 ZA11 ZA12 ZA18 ZC42 最終頁に続く
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 ペプチドを含む医薬または食品

## (57) 【要約】

本発明は、Tyr(Y)、Phe(F)、Trp(W)あるいはHis(H)と疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を有効成分とする医薬または食品を提供するものである。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

Tyr(以下、Yと略すこともある)、Phe(以下、Fと略すときもある)、Trp(以下、Wと略すときもある)あるいはHis(以下、Hと略すときもある)と疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を有効成分とする医薬ないし医薬組成物。

## 【請求項2】

TyrあるいはPheと疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を有効成分とする請求項1に記載の医薬ないし医薬組成物。

## 【請求項3】

Y L、F L、W L、H L、Y I、F I、Y V、L Y、L F、L W、I Y、I F、(Y/F/W/H) L (Y/F/W)、(Y/F/W/H) L Q、L (Y/F/W) Lまたは(Y/F/W/H) L (Y/F/W) E I A R (但し、LはLeu、IはIle、VはVal、QはGln、EはGlu、AはAla、RはArgを表し、(Y/F/W/H)は、H、W、YまたはFを表し、(Y/F/W)は、W、FまたはYを表す。以下同じ。)を有効成分とする請求項1に記載の医薬ないし医薬組成物。 10

## 【請求項4】

Y L、F L、W L、H L、Y I、F I、F V、L Y、L F、L W、I Y、I F、Y L Y、Y L Q、L Y LまたはY L Y E I A Rを有効成分とする請求項3に記載の医薬ないし医薬組成物。

## 【請求項5】

抗不安剤、睡眠導入剤、睡眠改善剤、統合失調症治療薬または抗うつ薬である、請求項1~4のいずれかに記載の医薬ないし医薬組成物。 20

## 【請求項6】

Tyr、Phe、TrpあるいはHisと疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を添加することを特徴とする、抗不安または睡眠改善用食品。

## 【請求項7】

TyrあるいはPheと疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を添加することを特徴とする、請求項6に記載の抗不安または睡眠改善用食品。

## 【請求項8】

Y L、F L、W L、H L、Y I、F I、Y V、L Y、L F、L W、I Y、I F、(Y/F/W/H) L (Y/F/W)、(Y/F/W/H) L Q、L (Y/F/W) Lまたは(Y/F/W/H) L (Y/F/W) E I A Rを添加することを特徴とする、請求項6に記載の抗不安または睡眠改善用食品。 30

## 【請求項9】

Y L、F L、W L、H L、Y I、F I、F V、L Y、L F、L W、I Y、I F、Y L Y、Y L Q、L Y LまたはY L Y E I A Rを添加することを特徴とする、請求項8に記載の抗不安または睡眠改善用食品。

## 【請求項10】

Tyr、Phe、TrpあるいはHisと疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を必要とする対象に有効量投与することを特徴とする、不安軽減または睡眠改善方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

40

## 【0001】

本発明は神経系に作用する医薬ないし医薬組成物に関する。また、本発明は、ペプチドまたはその類縁体に関し、詳しくは5-HT<sub>1A</sub>受容体、D<sub>1</sub>受容体およびGABA<sub>A</sub>受容体の少なくとも1種を活性化するペプチドまたはその類縁体に関する。さらに本発明は、抗不安または睡眠改善用食品に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

現代のストレス社会を反映し、不安障害、統合失調症、うつ病などの精神疾患の増加が問題となっている。不安感、生体において危険を回避するための警告として本来必要なものであるが、過剰な不安感、上記精神疾患の発症や症状の進行に関与するとともに、生 50

活習慣病の発症リスクを上昇させることが知られており、精神的ストレスを緩和する食品や医薬品の開発が期待されている。このような抗不安作用を有する化合物は、安価に製造が可能で、経口投与で有効なものが望ましい。

【0003】

ジペプチドは、合成も比較的簡単であり、食品タンパク質の酵素消化によっても大量に生産することができる。実際に、血圧降下作用を有するACE阻害ペプチドや高甘味度甘味料であるアスパルテームが食品として実用化されている。しかしながら、抗不安作用を示すジペプチドの報告はない。生理活性を示すオリゴペプチドとしては鎮痛作用を有するオピオイドペプチドが知られている。さらに、ダイズの主要タンパク質である  $\beta$ -コングリシニンに由来するsoymorphinが抗不安作用を有することを明らかにしている(特許文献1)。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2007-91656

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明者は、副作用がほとんど或いは全くない抗不安、鎮静、睡眠改善などの作用を有する薬剤及び食品を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

そこで上記課題を解決するべく、各種のペプチドの抗不安作用を調べていたところ、Tyr-Leu、Phe-Leu、Trp-Leu、His-Leu、Ile-Tyr、Leu-Trp、などの特定の短鎖ペプチドが強力な抗不安、鎮静などの作用、5-HT<sub>1A</sub>受容体、D<sub>1</sub>受容体およびGABA<sub>A</sub>受容体からなる群から選ばれる少なくとも1種の受容体を活性化する作用を有することを見出し、本発明を完成した。

【0007】

本発明は、以下の医薬、抗不安または睡眠改善用食品、不安軽減または睡眠改善方法を提供するものである。

30

項1. Tyr(以下、Yと略すこともある)、Phe(以下、Fと略すときもある)、Trp(以下、Wと略すときもある)あるいはHis(以下、Hと略すときもある)と疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を有効成分とする医薬ないし医薬組成物。

項2. TyrあるいはPheと疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を有効成分とする項1に記載の医薬ないし医薬組成物。

項3. YL、FL、WL、HL、YI、FI、YV、LY、LF、LW、IY、IF、(Y/F/W/H)L(Y/F/W)、(Y/F/W/H)LQ、L(Y/F/W)Lまたは(Y/F/W/H)L(Y/F/W)E I A R(但し、LはLeu、IはIle、VはVal、QはGln、EはGlu、AはAla、RはArgを表し、(Y/F/W/H)は、H、W、YまたはFを表し、(Y/F/W)は、W、FまたはYを表す。以下同じ。)を有効成分とする項1に記載の医薬ないし医薬組成物。

40

項4. YL、FL、WL、HL、YI、FI、FV、LY、LF、LW、IY、IF、YLY、YLQ、LYLまたはYLYE I A Rを有効成分とする項3に記載の医薬ないし医薬組成物。

項5. 抗不安剤、睡眠導入剤、睡眠改善剤、統合失調症治療薬または抗うつ薬である、項1~4のいずれかに記載の医薬ないし医薬組成物。

項6. Tyr、Phe、TrpあるいはHisと疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を添加することを特徴とする、抗不安または睡眠改善用食品。

項7. TyrあるいはPheと疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を添加することを特徴とする、項6に記載の抗不安または睡眠改善用食品。

項8. YL、FL、WL、HL、YI、FI、YV、LY、LF、LW、IY、IF、

50

(Y/F/W/H) L (Y/F/W) , (Y/F/W/H) L Q、 L (Y/F/W) L または (Y/F/W/H) L (Y/F/W) E I A R を添加することを特徴とする、項 6 に記載の抗不安または睡眠改善用食品。

項 9 . Y L、 F L、 W L、 H L、 Y I、 F I、 F V、 L Y、 L F、 L W、 I Y、 I F、 Y L Y、 Y L Q、 L Y L または Y L Y E I A R を添加することを特徴とする、項 8 に記載の抗不安または睡眠改善用食品。

項 10 . Tyr、 Phe、 Trp あるいは His と疎水性アミノ酸が隣接しているペプチドまたはその類縁体を必要とする対象に有効量投与することを特徴とする、不安軽減または睡眠改善方法。

【発明の効果】

【0008】

本発明のペプチドまたはその類縁体を有効成分とする抗不安薬、睡眠障害治療薬、統合失調症治療薬、抗うつ薬、或いはこれら疾患の予防薬は、副作用が低く長期の服用に適したものである。

【0009】

また、本発明の薬剤は経口投与で有効である。

【0010】

さらに、天然の短鎖ペプチドは食品として摂取することも可能であり、疾患には至らないが、不安傾向や睡眠に問題を有する個体が食品として摂取することで、疾患を予防することが期待できる。

【0011】

本発明のペプチドまたはその類縁体は、5 - H T <sub>1 A</sub> 受容体、D <sub>1</sub> 受容体および G A B A <sub>A</sub> 受容体からなる群から選ばれる少なくとも1種の受容体を活性化する作用を有し、これらの受容体活性化作用に基づく各種疾患の予防ないし治療作用を有することが期待される。

【0012】

さらに、オピオイド受容体作動薬の活性化に基づく副作用は問題にならない。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】高架式十字迷路

【図2A】Y L の腹腔内投与による抗不安作用（実施例1）

【図2B】Y L の経口投与による抗不安作用（実施例1）

【図3】F L の腹腔内投与による抗不安作用（実施例2）

【図4】Y I の腹腔内投与による抗不安作用（実施例3）

【図5】F I の腹腔内投与による抗不安作用（実施例4）

【図6】L Y の腹腔内投与による抗不安作用（実施例5）

【図7】L F の腹腔内投与による抗不安作用（実施例6）

【図8】I Y の腹腔内投与による抗不安作用（実施例7）

【図9】I F の腹腔内投与による抗不安作用（実施例8）

【図10】Y L Y の腹腔内投与による抗不安作用（実施例9）

【図11】Y L Q の腹腔内投与による抗不安作用（実施例10）

【図12】L Y L の腹腔内投与による抗不安作用（実施例11）

【図13】Y L Y E I A R の腹腔内投与による抗不安作用（実施例12）

【図14】Y および Y & L の腹腔内投与による抗不安作用（比較例1、2）

【図15】Y L の抗不安作用に及ぼす5 H T <sub>1 A</sub> 受容体アンタゴニストの影響

【図16】Y L の抗不安作用に及ぼすドーパミンD <sub>1</sub> 受容体アンタゴニストの影響

【図17】Y L の抗不安作用に及ぼすG A B A <sub>A</sub> 受容体アンタゴニストの影響

【図18】Y L の抗不安作用に及ぼすベンゾジアゼピンサイトアンタゴニストの影響

【図19】Y L の抗不安作用に及ぼすμオピオイド受容体アンタゴニストの影響

【図20】Y L の抗不安作用に及ぼすオピオイド受容体およびs <sub>1</sub> 受容体に対するアンタゴニストの影響

10

20

30

40

50

- 【図 2 1】 Y L の抗不安作用に及ぼすシクロオキシゲナーゼ阻害剤の影響
- 【図 2 2】 Y V の腹腔内投与による抗不安作用（実施例 1 3）
- 【図 2 3】 W L の腹腔内投与による抗不安作用（実施例 1 4）
- 【図 2 4】 L W の腹腔内投与による抗不安作用（実施例 1 5）
- 【図 2 5】 W L および L W の経口投与による抗不安作用（実施例 1 4、1 5）
- 【図 2 6】 H L の腹腔内投与による抗不安作用（実施例 1 6）
- 【図 2 7】 Y L とジアゼパムの抗不安作用の比較（比較例 3）
- 【図 2 8】 Y L の推定抗不安機構
- 【発明を実施するための形態】
- 【0014】

10

#### 薬理作用

本発明において、抗不安作用は、抗不安薬をスクリーニングするための不安関連行動評価法として開発され、広く用いられている高架式十字迷路試験により評価することができる（図 1）。具体的には抗不安薬の候補物質を経口投与または腹腔内投与し、30分後に高架式十字迷路にマウスを置いて、オープンアームに侵入した回数とオープンアーム上での滞在時間の変化を指標として、抗不安作用の強さを評価することができる。

#### 【0015】

本発明のペプチドの抗不安作用は 5 - H T <sub>1A</sub> 受容体アンタゴニストである WAY100135 によって阻害されるが、5 - H T <sub>1A</sub> 受容体に親和性を示さないことから、本発明のペプチドの抗不安作用は 5 - H T <sub>1A</sub> 受容体の活性化を介した作用（5 - H T <sub>1A</sub> 受容体アゴニストまたは部分アゴニストと同様の作用を有する）であることが明らかになった。おそらく内因性のセロトニン遊離が促進されているものと考えられる。本発明のペプチドは、5 - H T <sub>1A</sub> 受容体の活性化に基づきうつ病、統合失調症などの予防ないし治療作用、記憶改善作用などがあると推定され、本発明の医薬ないし医薬組成物は、5 - H T <sub>1A</sub> 受容体作動薬、うつ病の予防ないし治療薬、統合失調症の予防ないし治療薬、記憶改善剤、抗不安剤、睡眠改善剤などとしても有用であり得る。

20

#### 【0016】

本発明ペプチドの抗不安作用は、ドーパミン D <sub>1</sub> 受容体アンタゴニストである SCH23390 で阻害されたが、ドーパミン D <sub>1</sub> 受容体に親和性を示さないことから、ドーパミン D <sub>1</sub> 受容体の活性化を介する作用（D <sub>1</sub> 受容体のアゴニストまたは部分アゴニストと同様の作用を有する）であることが明らかになった。おそらく内因性ドーパミンの遊離が促進されているものと考えられる。空間認知機能がドーパミン D <sub>1</sub> 受容体を介すること、また、精神分裂病において D <sub>1</sub> 受容体の機能が低下していることから、認知症や精神分裂病などの疾患の予防ないし治療作用が期待できる。

30

#### 【0017】

本発明ペプチドの抗不安作用は、G A B A <sub>A</sub> 受容体アンタゴニスト (bicuculline) で阻害されたこと、ならびに G A B A <sub>A</sub> 受容体に親和性を示さないことから、G A B A <sub>A</sub> 受容体を介する作用（G A B A <sub>A</sub> 受容体のアゴニストまたは部分アゴニストと同様の作用を有する）であることが明らかになった。おそらく内因性 G A B A の遊離が促進されているものと考えられる。また、本発明ペプチドの抗不安作用は、ベンゾジアゼピン受容体アンタゴニスト flumazenil によって有意に阻害されたことから、抗不安作用は、G A B A <sub>A</sub> 受容体のベンゾジアゼピンサイトを部分的に介していることが明らかになった。G A B A <sub>A</sub> 受容体は、睡眠誘発作用を有することが知られているので、本発明のペプチドまたはその類縁体は、抗不安作用だけでなく睡眠誘発作用を有すると考えられ、睡眠導入剤としても有用である。特に L F は、運動量の低下が観察され、睡眠導入剤として有用である。

40

#### 【0018】

これまでダイズの主要タンパク質である  $\beta$ -コングリシニン由来の  $\mu$  オピオイドペプチドの soymorphin が  $\mu$  オピオイド受容体を介して抗不安作用を示すことを本発明者らは見出しているが（特許文献 1）、本発明のペプチドの抗不安作用は、 $\mu$  オピオイド受容体アンタゴニストである naloxone によって阻害されなかったことから、本発明のペプチドの抗不

50

安作用は、特許文献1のペプチドと異なり $\mu$ オピオイド受容体を介していないことが明らかになった。

【0019】

緑葉の主要タンパク質Rubisco由来のオピオイドrubiscolinは、オピオイド受容体に直接作用した後、 $\mu$ 受容体を活性化して抗不安作用を示すことが公知である。本発明のペプチドの抗不安作用は、オピオイド受容体アンタゴニストであるnaltrindoleによって阻害されなかったことから、本発明のペプチドの抗不安作用は、オピオイド受容体を介していないことが明らかになった。本発明のペプチドの抗不安作用は、 $\mu$ 受容体アンタゴニストであるBMY14802によって阻害されなかったことから、本発明のペプチドの抗不安作用は、 $\mu$ 受容体を介していないことが明らかになった。

10

【0020】

Rubisco由来のもう一つの抗不安ペプチドMRW (rubimetide) は、プロスタグランジン $D_2$ の放出促進および、2種類のPGD<sub>2</sub>受容体のうちDP<sub>1</sub>受容体の活性化を介して抗不安作用を示す。本発明のペプチドの抗不安作用は、シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるindomethacinによって阻害されなかったことから、本発明のペプチドの抗不安作用は、プロスタグランジン類とは関係しないことが明らかになった。したがって、本発明のペプチドは従来の抗不安ペプチドとは全く異なる作用機構を介しているものと考えられる。

【0021】

本発明の好ましい有効成分は経口投与で有効であるのが確認されている。

20

【0022】

有効成分

本発明の抗不安剤の有効成分は、ペプチドないしその類縁体である。

【0023】

ペプチドとしては、Y (Tyr)、F (Phe)、W (Trp)あるいはH (His)、好ましくは、Y (Tyr)、F (Phe)あるいはW (Trp)、より好ましくはY (Tyr)あるいはW (Trp)を有する2~8個、好ましくは2~7個、より好ましくは2~6個、さらに好ましくは2~5個、特に好ましくは2~4個、最も好ましくは2~3個のアミノ酸からなるペプチドである。

【0024】

ペプチドを構成するアミノ酸は、L体のアミノ酸、D体のアミノ酸或いはDL体のアミノ酸(D体とL体が混合されたアミノ酸であればラセミ体といずれか一方のエナンチオマーが過剰なアミノ酸のいずれも含まれる)のいずれであってもよい。好ましくはL体のアミノ酸のみ、或いはD体のアミノ酸のみからなるペプチド、特にL体のアミノ酸のみからなるペプチドがよい。

30

【0025】

また、本発明で使用するペプチドが2以上の不斉炭素を含む場合、各エナンチオマーないしジアステレオマー或いはこれらの任意の比率の混合物のいずれの形態であってもよい。エナンチオマーまたはジアステレオマーの分離は、通常のカラムで行ってもよく、光学活性カラムを使用したり、光学活性基を導入して誘導体の形態で光学分割した後、その光学活性基を除去する方法や、光学活性の酸または塩基との塩を形成して光学分割するなどの公知のいずれの方法を用いてもよい。

40

【0026】

ペプチドまたはその類縁体の塩としては、酸付加塩と塩基塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、臭化水素酸、過塩素酸などの無機塩、クエン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、メタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸などの有機酸の塩が挙げられる。塩基塩としては、ナトリウム、カリウム、リチウムなどのアルカリ金属塩、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属塩などが挙げられる。

【0027】

溶媒和物としては、水(水和物の場合)、メタノール、エタノール、イソプロパノール、酢酸、テトラヒドロフラン、アセトン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、

50

ジメチルアセトアミド、アセトアミド、エチレングリコール、プロピレングリコール、ジメトキシエタンなどの溶媒和物が挙げられる。

【0028】

有効成分がペプチドの場合

本発明の好ましい実施形態において、有効成分となるペプチドを構成するアミノ酸は、少なくとも2種のアミノ酸を有する；1つはY (Tyr)、F (Phe)、W (Trp) あるいはH (His)であり、もう1つはL (Leu)、I (Ile)、V (Val) 及びノルロイシン (Nle)、ノルバリン (Nva) からなる群から選ばれるいずれかの疎水性アミノ酸である。これらの2種のアミノ酸は隣接したユニットを構成しており、HL、WL、YL、FL、YV、FV、(Y/F/W/H) - ノルロイシン、(Y/F/W/H) - ノルバリンのようにH、W、YまたはFがN末端側にあってもよく、LY、LF、LW、LH、IY、IF、IW、IH、VH、VW、VY、VF、ノルロイシン - (Y/F/W/H)、ノルバリン - (Y/F/W/H) のようにH、W、YまたはFがC末端側にあってもよく、これらの2種のアミノ酸ユニットのN末端側もしくはC末端側にさらに1~6個、1~5個、1~4個、1~3個、1~2個または1個のアミノ酸がペプチド結合により結合してもよい。

10

【0029】

なお、Y/F/W/HはY、F、W、またはHを示し、HW、HY、HF、WH、YH、FH、WY、WF、YW、FW、HH、WW、YF、FY、YY、FFなどのY、F、W、Hから選ばれる2個以上（好ましくは2個）のアミノ酸が連結されたペプチドであってもよい。Y/Fは、YまたはFを示し、YF、FY、YY、FFなどのYとFから選ばれる2個以上（好ましくは2個）のアミノ酸が連結されたペプチドであってもよい。

20

【0030】

H、W、Y、Fに代えて3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA)、4-メトキシフェニルアラニン、4-メルカプトフェニルアラニンなどを使用し得る。

【0031】

本発明のペプチドにおいて、Y、F、WあるいはHはN末端にあるのが好ましい。

【0032】

本発明で好ましく使用できる抗不安作用を有するペプチドを以下に示す。

Y - (疎水性アミノ酸) ;

F - (疎水性アミノ酸) ;

W - (疎水性アミノ酸) ;

H - (疎水性アミノ酸) ;

(疎水性アミノ酸) - H ;

(疎水性アミノ酸) - W ;

(疎水性アミノ酸) - Y ;

(疎水性アミノ酸) - F ;

(Y/F/W/H) - L - (任意のアミノ酸)<sub>n</sub> ;

(任意のアミノ酸)<sub>n</sub> - (Y/F/W/H) - L ;

(任意のアミノ酸)<sub>n<sub>1</sub></sub> - (Y/F/W/H) - L - (任意のアミノ酸)<sub>n<sub>2</sub></sub> ;

40

(疎水性アミノ酸) - (Y/F/W/H) - (疎水性アミノ酸) ;

(Y/F/W/H) - (疎水性アミノ酸) - (Y/F/W/H) ;

{ (Y/F/W/H) - (疎水性アミノ酸) }<sub>m</sub> ;

{ (疎水性アミノ酸) - (Y/F/W/H) }<sub>p</sub> ;

{ (Y/F/W/H) - (疎水性アミノ酸) }<sub>q</sub> - Y ;

{ (疎水性アミノ酸) - (Y/F/W/H) }<sub>r</sub> - (疎水性アミノ酸) ;

(式中、疎水性アミノ酸は、同一または異なってL (Leu)、I (Ile)、V (Val) 及びノルロイシン (Nle) 及びノルバリン (Nva) からなる群から選択され、好ましくはL (Leu)、I (Ile) またはV (Val)、より好ましくはL (Leu) またはI (Ile)、特にL (Leu) である。

50

## 【0033】

任意のアミノ酸は、Leu, Ile, Val, Ala, Gly, Met, Ser, Cys, His, Asn, Asp, Glu, Gln, Thr, Lys, Trp, Phe, Arg, Tyr, Proからなる20種の天然アミノ酸と、アラニン、サルコシン、オルニチン、ノルロイシン(Nle)及びノルバリン(Nva)からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸である。

$n = 1 \sim 6$ の整数、 $n_1 = 1 \sim 6$ の整数、 $n_2 = 1 \sim 6$ の整数、 $0 \leq n_1 + n_2 \leq 6$ 、 $m = 2 \sim 4$ の整数、 $p = 2 \sim 4$ の整数である。 $q = 1 \sim 3$ の整数、 $r = 1 \sim 3$ の整数である。) )

## 【0034】

より好ましいペプチドは、以下である。

Y - (疎水性アミノ酸) ;

F - (疎水性アミノ酸) ;

W - (疎水性アミノ酸) ;

H - (疎水性アミノ酸) ;

(疎水性アミノ酸) - Y ;

(疎水性アミノ酸) - F ;

(疎水性アミノ酸) - W ;

(Y/F/W/H) - L - (任意のアミノ酸)<sub>n</sub> ;

(Y/F/W/H) - (疎水性アミノ酸) - (Y/F/W/H) ;

{ (Y/F/W/H) - (疎水性アミノ酸) }<sub>m</sub> ;

(式中、疎水性アミノ酸、任意のアミノ酸、(Y/F/W/H)は、前記に定義されるとおりである。)

## 【0035】

有効成分がペプチド類縁体の場合

ペプチド類縁体には、有効成分の上記ペプチドの(1)N末端の修飾、(2)C末端の修飾、(3)チロシン残基、フェニルアラニン残基の類縁体が含まれる。

(1)ペプチドのN末端のアミノ基は、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、プロピルアミノ、ジプロピルアミノ、n-ブチルアミノ、ジn-ブチルアミノ、などの直鎖または分岐を有する炭素数1~4のアルキル基でモノ置換またはジ置換されたアミノ基でもよい。或いは、N末端のアミノ基または側鎖のアミノ基(Lysを含む場合)は、ベンジル基、フェネチル基などのアラルキル基でモノ置換またはジ置換されていてもよく、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基などの炭素数1~6の直鎖または分岐を有するアルカノイル基、ベンゾイル基などのアシル基で修飾されていてもよい。

(2)ペプチドのC末端のカルボキシル基は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどの炭素数1~6のアルキル基とのエステル、ベンジル、フェネチルなどのアラルキル基とのエステル、アミノ基、メチルアミン、ジメチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、プロピルアミン、ジプロピルアミン、n-ブチルアミン、ジn-ブチルアミンなどの直鎖または分岐を有する炭素数1~4のアルキル基でモノ置換またはジ置換されたアミン、またはアンモニアとのアミドを形成してもよい。

(3)チロシン残基の類縁体(I)、フェニルアラニン残基の類縁体(II)、ヒスチジン残基の類縁体(III)、トリプトファン残基の類縁体(IV)、としては、以下の式で示される残基が挙げられる：

## 【0036】

10

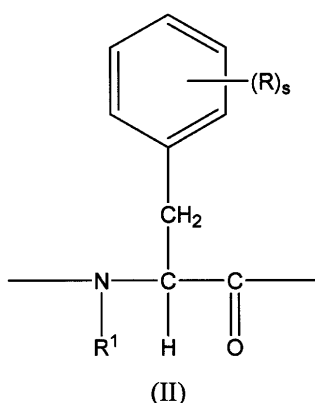
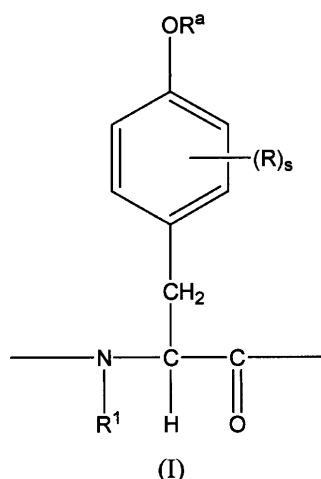
20

30

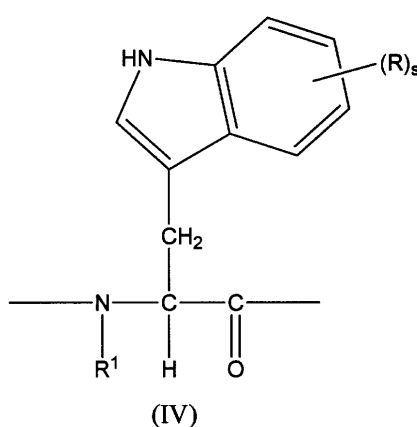
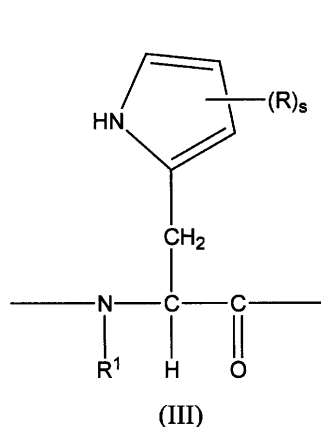
40



## 【化 1】



10



20

## 【 0 0 3 7 】

(式中、 $R^1$  は炭素数 1 ~ 6 の直鎖または分岐を有するアルキル基、アラルキル基または水素原子を示す。 $R^a$  は、水素原子、アルカリ金属、アルカリ土類金属、メトキシメチル、2 - テトラヒドロフラン、2 - テトラヒドロピラニルなどの酸性で切断可能な保護基、メチル、トリフルオロメチルのいずれかである。 $R$  は同一または異なって、炭素数 1 ~ 6 の直鎖または分岐を有するアルキル基 (例えばメチル、エチル、*n* - プロピル、イソプロピル、*n* - ブチル、イソブチル、*t* - ブチル、ペンチル、ヘキシル)、アラルキル基 (例えばベンジル又はヘキシル)、炭素数 1 ~ 6 の直鎖または分岐を有するアルコキシ基 (例えばメトキシ、エトキシ、*n* - プロピルオキシ、イソプロピルオキシ、*n* - ブトキシ、イソブトキシ、*t* - ブトキシ、ペントキシ、ヘキシルオキシ)、SH、炭素数 1 ~ 6 の直鎖または分岐を有するアルキルチオ基 (例えばメチルチオ、エチルチオ、*n* - プロピルチオ、イソプロピルチオ、*n* - ブチルチオ、イソブチルチオ、*t* - ブチルチオ、ペンチルチオ、ヘキシルチオ)、CN、NO<sub>2</sub>、ハロゲン原子 (F、Cl、Br、I)、アミノ (NH<sub>2</sub>)、モノまたはジ (C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> 低級アルキル) アミノ (例えばメチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、ブチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ、ジブチルアミノ)、アセトアミド、アセチル、トリフルオロメチル、水酸基、或いは、隣接する 2 つの R もしくは隣接する R と OR<sup>a</sup> が一緒になって、メチレンジオキシまたはエチレンジオキシを示す。

30

40

## 【 0 0 3 8 】

本発明の薬剤 (抗不安剤、睡眠改善剤、統合失調症治療薬または抗うつ薬) または食品の有効成分のペプチドとしては、好ましくは YL、FL、WL、HL、YI、FI、YV、LY、LF、LW、IY、IF、(Y/F/W/H)L (Y/F/W)、(Y/F/W/H)LQ、L (Y/F/W)L または (Y/F/W/H)L (Y/F/W)E I A R、より好ましくは YL、FL、WL、HL、YI、FI

50

、FV、LY、LF、LW、IY、IF、YLY、YLQ、LYLまたはLYE I A Rなどが挙げられる。

【0039】

本発明のペプチドまたはその類縁体は、ACE阻害作用を有するものがあるが、例えばYLはIYよりもACE阻害作用が弱いにもかかわらず、抗不安作用は強いことから、ACE阻害作用と抗不安作用は無関係と考えられる。

【0040】

本発明のペプチドは、天然のタンパク質ないしポリペプチドの加水分解により得ることもでき、化学合成により得ることもできる。加水分解されるタンパク質ないしポリペプチドとしては、牛乳または人乳由来のカゼイン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、ラクトフェリン、オボアルブミン、ウシおよびブタミオシン、血清アルブミン、ダイズ $\beta$ -コングリシニン、グリシニン、コムギグルテニン、コメグルテリン、緑葉Rubiscol, ナタネnapin、動物および植物に広く存在することが知られているアクチン（例えば、ヒト、ダイズ、コムギなど）などが挙げられ、ほとんどの食品タンパク質中に本発明のジペプチド配列が含まれる。これらの食品素材由来のペプチドは、そのまま或いは必要に応じて濃縮、脱塩、精製等の処理を行うことにより、そのまま食品とすることができる。

10

【0041】

タンパク質の加水分解には、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、ペプシン、カルボキシペプチダーゼ、サーモリシン、サチライシンなどの動物、植物ないし微生物由来の加水分解酵素の使用が例示され、これらの酵素を用い、pHを酵素に応じて適切な値に調製し、30~40程度の温度下に30分から48時間程度反応させることにより、本発明の有効成分のペプチドを得ることができる。得られた反応液から本発明のペプチドを精製して用いてもよく、食品素材を酵素分解した場合には、そのまま或いは他の食品素材に添加して食品ないし食品組成物とすることもできる。加水分解は、強酸（例えば塩酸、硝酸、硫酸など）または強塩基（水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウムなどのアルカリ金属水酸化物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどのアルカリ金属炭酸塩、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウムなどのアルカリ金属炭酸水素塩）などの存在下に水中で、1~100の温度で、30分から48時間反応させることにより、本発明の有効成分のペプチドを得ることができる。加水分解の反応生成物は、pHを調製した後、そのまま使用してもよく、精製により有効成分のペプチドを分離して使用してもよい。

20

30

【0042】

また本発明のペプチドは、ペプチド合成法で取得することもできる。即ち、ペプチド合成に通常用いられる方法である液相法または固相法で、反応性カルボキシル基を有する原料と、反応性アミノ基を有する原料とをHBTU等の活性エステルを用いた方法や、カルボジイミドなどのカップリング剤を用いた方法等のペプチド合成において通常の方法により縮合させることができる。生成する縮合物が保護基を有する場合、その保護基を除去することによっても製造し得る。

【0043】

この反応工程において反応に関与すべきでない官能基は、保護基により保護される。アミノ基の保護基としては、例えばベンジルオキシカルボニル(CBZ)、t-ブチルオキシカルボニル(Boc)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)等が挙げられる。カルボキシル基の保護剤としては例えばアルキルエステル、ベンジルエステル等を形成し得る基が挙げられるが、固相法の場合は、C末端のカルボキシル基はクロロトリチル樹脂、クロルメチル樹脂、オキシメチル樹脂、p-アルコキシベンジルアルコール樹脂等の担体に結合している。縮合反応は、カルボジイミド等の縮合剤の存在下にあるいはN-保護アミノ酸活性エステルまたはペプチド活性エステルを用いて実施する。

40

【0044】

縮合反応終了後、保護基は除去されるが、固相法の場合はさらにペプチドのC末端と樹脂との結合を切断する。更に、本発明のペプチドは通常の方法に従い精製される。例えば

50

イオン交換クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等が挙げられる。合成したペプチドの合成はエドマン分解法でC-末端からアミノ酸配列を読み取るプロテインシーケンサー、GC-MS等で分析される。

【0045】

本発明のペプチドは、酵素法によっても合成することが可能である（W02003/010307参照）。

【0046】

本発明のペプチドの投与経路は特に限定されるものではなく、経口投与、非経口投与、直腸内投与のいずれを採用することも可能であり、経口的あるいは非経口的に投与することができる。本ペプチドの投与量は化合物の種類、投与方法、投与される者の状態や年齢等により異なるが、成人1日あたり通常は0.01~500mg/kg、好ましくは0.05~100mg/kg、より好ましくは0.1~30mg/kgである。本発明のペプチド(有効成分)は通常、製剤用担体と混合して調製した医薬組成物の形で投与される。製剤用担体としては、製剤分野において常用され、かつ本発明のペプチドと反応しない物質が用いられる。

10

【0047】

例えば、YL、FL、YLYEIARのように有効量の範囲が広いペプチドの場合の成人1日当たりの経口投与での投与量は、5~500mg程度であり、注射などの非経口投与の場合には、それよりやや少ない投与量(例えば1~100mg程度)とすることができる。

20

【0048】

また、WL、HLのように、有効な投与量の幅が比較的狭い場合には、成人1日当たりの経口投与での投与量は、5~100mg程度であって、この範囲内で最適な投与量を常法に従い決定することができる。

【0049】

上記以外のペプチドの成人1日当たりの投与量は、上記のペプチドの場合を参考にして容易に決定できる。

【0050】

本発明のペプチドはそれ自体食品または医薬として利用することができ、或いは単独で、もしくは適当な無毒性の経口摂取用担体、希釈剤または賦形剤とともに、タブレット(素錠、糖衣錠、発泡錠、フィルムコート錠、チュアブル錠など)、カプセル、トローチ、粉末、細粒剤、顆粒剤、液剤、懸濁液、乳濁液、ペースト、クリーム、注射剤(アミノ酸輸液、電解質輸液等の輸液に配合する場合を含む)、或いは腸溶性の錠剤、カプセル剤、顆粒剤などの徐放性製剤などの食品用もしくは医薬用の製剤にすることが可能である。食品中のペプチドの含有量は適宜選択が可能であるが一般に、0.01~100重量%の範囲である。

30

【0051】

具体的には、医薬または食品に加えることができる製剤用担体ないし経口摂取用担体、希釈剤または賦形剤のような物質の例として乳糖、ブドウ糖、マンニット、デキストリン、シクロデキストリン、デンプン、蔗糖、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルデンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、イオン交換樹脂、メチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、軽質無水ケイ酸、ステアリン酸マグネシウム、タルク、トラガント、ベントナイト、ビーガム、酸化チタン、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、グリセリン、脂肪酸グリセリンエステル、精製ラノリン、グリセロゼラチン、ポリソルベート、マクロゴール、植物油、ロウ、流動パラフィン、白色ワセリン、フルオロカーボン、非イオン性界面活性剤、プロピレングルコール、水等が挙げられる。

40

【0052】

50

剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、坐剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製される。尚、液体製剤にあつては、用時、水又は他の適当な溶媒に溶解または懸濁する形であってもよい。また錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしてもよい。注射剤の場合には、本発明のペプチドを水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水あるいはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また緩衝剤や保存剤を添加してもよい。

【0053】

これらの製剤は、本発明のペプチドを0.01%~100重量%、好ましくは1~90重量%の割合で含有することができる。これらの製剤はまた、治療上価値のある他の成分を含有していてもよい。

10

【0054】

経口投与用の固形製剤を製造するには、有効成分と賦形剤成分例えば乳糖、澱粉、結晶セルロース、乳酸カルシウム、無水ケイ酸などと混合して散剤とするか、さらに必要に応じて白糖、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンなどの結合剤、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウムなどの崩壊剤などを加えて湿式又は乾式造粒して顆粒剤とする。錠剤を製造するには、これらの散剤及び顆粒剤をそのまま或いはステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤を加えて打錠すればよい。これらの顆粒又は錠剤はヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタクリル酸-メタクリル酸メチルポリマーなどの腸溶剤基剤で被覆して腸溶剤製剤、あるいはエチルセルロース、カルナウバロウ、硬化油などで被覆して持続性製剤とすることもできる。また、カプセル剤を製造するには、散剤又は顆粒剤を硬カプセルに充填するか、有効成分をそのまま或いはグリセリン、ポリエチレングリコール、ゴマ油、オリーブ油などに溶解した後ゼラチン膜で被覆し軟カプセルとすることができる。

20

【0055】

経口投与用の液状製剤を製造するには、有効成分と白糖、ソルビトール、グリセリンなどの甘味剤とを水に溶解して透明なシロップ剤、更に精油、エタノールなどを加えてエリキシル剤とするか、アラビアゴム、トラガント、ポリソルベート80、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどを加えて乳剤又は懸濁剤としてもよい。これらの液状製剤には所望により矯味剤、着色剤、保存剤などを加えてもよい。

【0056】

注射剤を製造するには、有効成分を必要に応じて塩酸、水酸化ナトリウム、乳糖、乳酸、ナトリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムなどのpH調整剤、塩化ナトリウム、ぶどう糖などの等張化剤と共に注射用蒸留水に溶解し、無菌濾過してアンブルに充填するか、更にマンニトール、デキストリン、シクロデキストリン、ゼラチンなどを加えて真空凍結乾燥し、用事溶解型の注射剤としてもよい。また、有効成分にレチシン、ポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などを加えて水中で乳化せしめ注射剤用乳剤とすることもできる。

30

【0057】

直腸投与剤または膣投与剤を製造するには、有効成分をカカオ脂、脂肪酸のトリ、ジ及びモノグリセリド、ポリエチレングリコールなどの座剤用基材と共に加湿して溶解し型に流し込んで冷却するか、有効成分をポリエチレングリコール、大豆油などに溶解した後、ゼラチン膜で被覆すればよい。

40

【0058】

皮膚用外用剤を製造するには、有効成分を白色ワセリン、ミツロウ、流動パラフィン、ポリエチレングリコールなどに加えて必要ならば加湿して練合し軟膏剤とするか、ロジン、アクリル酸アルキルエステル重合体などの粘着剤と練合した後ポリアルキルなどの不織布に展延してテープ剤とする。

【0059】

本発明に係るペプチドを添加・配合して調製しうる食品の具体的形態としては、例えば、飲料類(コーヒー、ココア、ジュース、清涼飲料、ミネラル飲料、茶飲料、緑茶、紅茶

50

、烏龍茶、乳飲料、乳酸菌飲料、ヨーグルト飲料、炭酸飲料)、ガム、グミ、ゼリー、キャンデー、クッキー、クラッカー、ビスケット、氷菓(アイスクリーム、アイスキャンデー、シャーベット、かき氷等)、レトルト食品、ゼリー状食品(ゼリー、寒天、ゼリー状飲料等)、等を挙げることができる。本発明のペプチドを添加・配合して調製しうる食品としては、いわゆる健康食品、機能性食品、栄養補助食品、サプリメント、特定保健用食品、病者用食品・病者用組合わせ食品(厚生労働省、特別用途食品の一種)又は高齢者用食品(厚生労働省、特別用途食品の一種)としてもよく、素錠、フィルムコート錠、糖衣錠、顆粒、粉末、タブレット、カプセル(ハードカプセルとソフトカプセルとのいずれも含む。)、チュアブルタイプ、シロップタイプ、ドリンクタイプ等とすることもできる。本発明に係るペプチドを添加・配合した食品の調製は、それ自体公知の方法で行うことができる。

#### 【実施例】

##### 【0060】

次に実施例により本発明を更に具体的に説明する。しかし下記の実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

##### 【0061】

(高架式十字迷路実験)

高架式十字迷路(Elevated plus maze: EPM)は、2つのオープンアーム(open arm; 25cm x 5cm)と2つのクローズドアーム(closed arm; 25cm x 5cm x 15 cm)からなり、それらのアームは床から50cm高くなった中央プラットフォームと結合している(図1参照)。高い位置にあるにも関わらず、クローズドアームの周りには囲いがあるために、マウスは安全に歩行する事ができる。一方、オープンアームの周囲は開放されていて囲いがないために、オープンアームを歩行するマウスは高い位置から転落するという不安感を感じる。そのために、マウスがオープンアームにいる時間が長いほど、あるいは進入回数が多いほど、マウスの不安感は緩和されており、抗不安活性の指標となる。

##### 【0062】

オープンアームの一つに面している中央プラットフォーム上にマウスを置いて試験を開始した。5分の試験時間の間、オープンアーム内で過ごした累積時間(time in open arms)、オープンアームを訪れた回数(visit to open arms)、いずれかのアームを訪れた回数の総数(total visits)を記録した。オープンアーム内で過ごした時間のパーセンテージ、オープンアームを訪れた回数のパーセンテージを不安の指標として計算した。

##### 【0063】

(オープンフィールド試験)

本実験に用いたオープンフィールドは、直径60 cm、高さ50 cm円筒状の灰色の装置で、黒い線で25区画に分割されている。マウスは新規環境におかれた場合に探索行動を行なうが、通常であれば装置の中央への探索は少ない。しかし抗不安薬を処置すると、中央の円への滞在時間および進入回数が増加する。ペプチドを投与して30分後にマウスを装置の中央に置き、5分間行動を観測した。

##### 【0064】

(統計解析)

高架式十字迷路試験で得たデータを、平均とSEMで表した。データを1方向または2方向ANOVAにより解析し、引き続いて多重比較のためのFisher試験を行った。

##### 【0065】

実施例1~16及び比較例1~3(抗不安作用)

(実験及び結果)

生理食塩水溶液に溶解したYL(実施例1、比較例3)、FL(実施例2)、YI(実施例3)、FI(実施例4)、LY(実施例5)、LF(実施例6)、IY(実施例7)、IF(実施例8)、YLY(実施例9)、YLQ(実施例10)、LYL(実施例11)、YLYEIR(実施例12)、YV(実施例13)、WL(実施例14)、LW(実施例15)、HL(実施例16)、Y(比較例1)、YおよびL(比較例2)、をマウスを高架式十字迷路上に置く前に各

々図面に示される量で腹腔内投与(i.p.)あるいは経口投与(p.o.)した(n=3~14)。そして各ペプチドないしアミノ酸の投与群と非投与群(0 mg/kg)において、オープンアーム内で過ごした時間のパーセンテージとオープンアームを訪れた回数、アームを訪れた総数(total visits)を比較した。また、YLについては、オープンフィールド試験により抗不安作用を調べた。その結果を図2~図14、図22~図27および表3に示す。図2~図14、図22~図27および表3に示されるように、本発明のペプチドは、有意または有意傾向をもってアームを訪れる回数とアームで過ごす時間の割合を延長した。また、YLについては、高架式十字迷路実験でジアゼパムと同等以上の抗不安作用を示し、オープンフィールド試験においても有効性を示した。一方、Y、Lの2つのアミノ酸は、抗不安作用はなかった。

10

## 【0066】

また、得られた結果のまとめを表1に示す。

## 【0067】

## 【表1】

低分子ペプチドによる抗不安作用の構造・活性相関

投与したペプチドないしアミノ酸	最少有効量(mg/kg, i.p.)
YL	0.1
FL	0.1
WL	0.1
HL	0.1
YI	3
FI	(3)
YV	3
LY	30
LF	30
LW	(0.1)
IY	10
IF	(30)
YLY	0.3
YLQ	1
LYL	(10)
YLYE IAR	0.3
Y	—
L	—

20

30

40

( ): 傾向あり

— : 作用なし

## 【0068】

## 試験例1

本発明の抗不安ペプチドであるYLと各種受容体の以下のアンタゴニストを併用投与し、実施例1と同様に試験して、アンタゴニストによるYLの抗不安作用への影響、即ち、本発明のペプチドが作用する受容体を特定するための試験を行った。結果を図15~図21と表2に示す。

## 【0069】

【表 2】

表2. YLの抗不安作用に及ぼす各種アンタゴニストの影響

阻害剤名	阻害剤の性質	YLの抗不安作用
WAY100135	5HT <sub>1A</sub> antagonist	○
SCH23390	dopamine D <sub>1</sub> antagonist	○
bicuculline	GABA <sub>A</sub> antagonist	○
flumazenil	benzodiazepine antagonist	△
naloxone	μ opioid antagonist	×
naltrindole	δ opioid antagonist	×
BMY14802	σ <sub>1</sub> antagonist	×
indomethacin	cyclooxygenase inhibitor	×

○:阻害された、×:阻害されなかった、△:一部阻害された

10

20

30

40

【 0 0 7 0 】

【表 3】

表3 実施例1 オープンフィールド解析によるYLの抗不安作用

	cont.	YL (0.1 mg/kg, i.p.)
中心円滞在時間(%)	0.889 ± 0.318	2.06 ± 0.234*
中心円進入回数(%)	1.53 ± 0.428	3.02 ± 0.404*
行動量	187 ± 13.4	189 ± 22.2

mean ± SEM (n = 6). \*p<0.05

10

20

30

40

【0071】

表2に示される結果と、セロトニン、ドーパミン、GABAの上下関係を示す他の実験結果(データは示さない)から、図28に示すような作用経路が考えられる。

【0072】

50



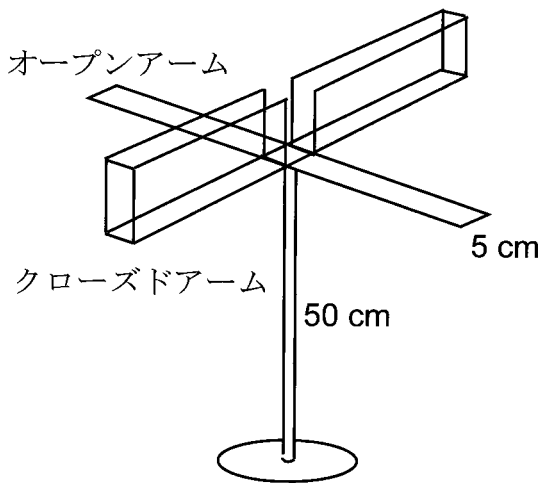
また、YLの抗不安作用は、高架式十字迷路実験とオープンフィールド試験の両方で確認されており、本発明のペプチドの有用性が実証された。

【産業上の利用可能性】

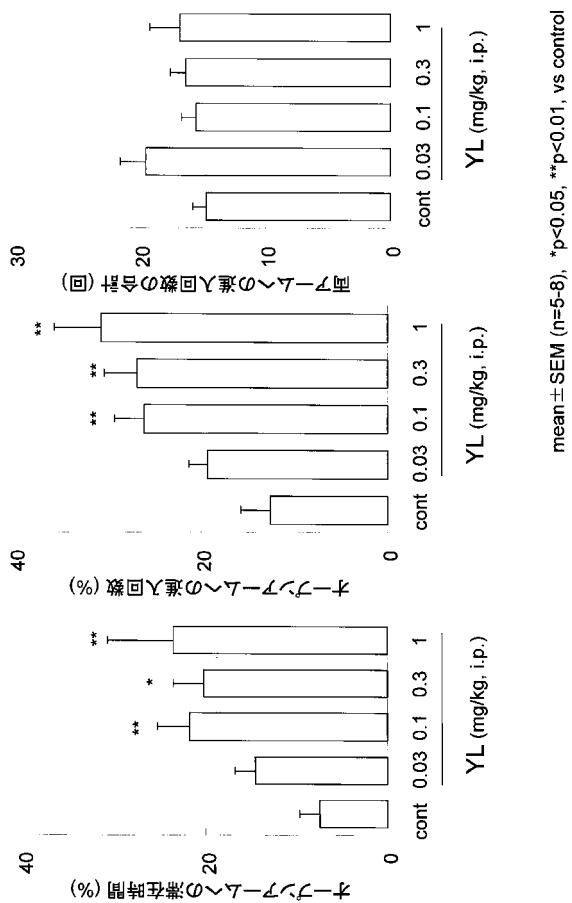
【0073】

本発明の抗不安薬は、従来の抗不安薬とは異なる作用メカニズムを持っている可能性があり、新しいタイプの薬剤を提供できる。

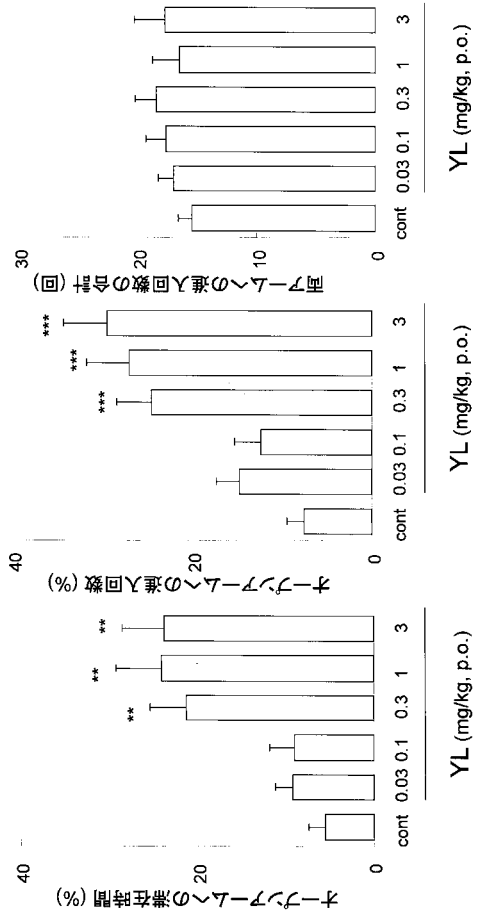
【図1】



【図2A】

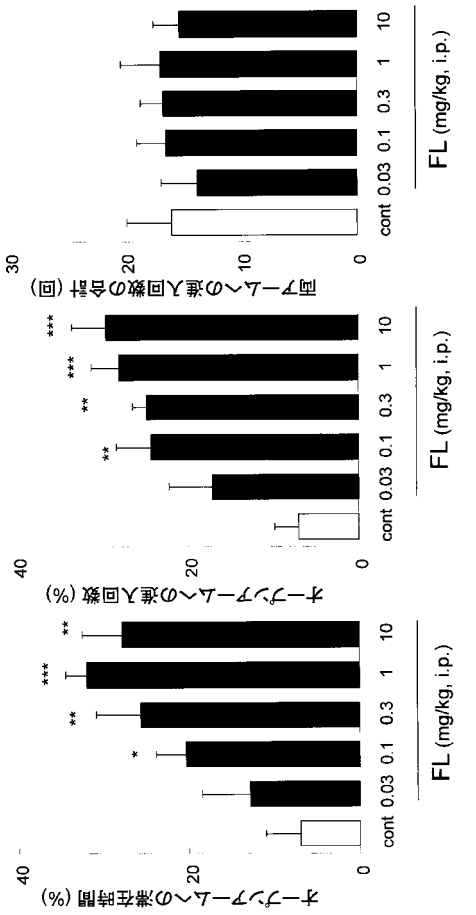


【 図 2 B 】



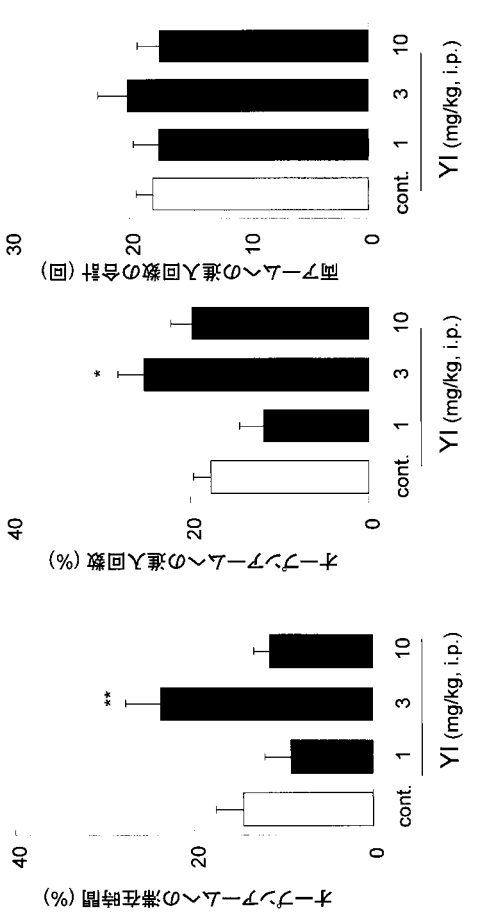
mean±SEM (n=5-14), \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, vs control

【 図 3 】



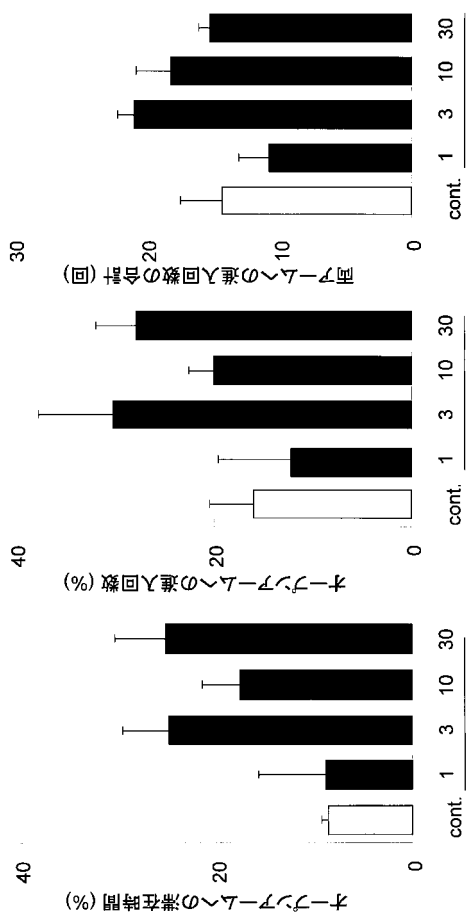
mean±SEM (n=4), \*p<0.05, \*\*p<0.01, vs control

【 図 4 】



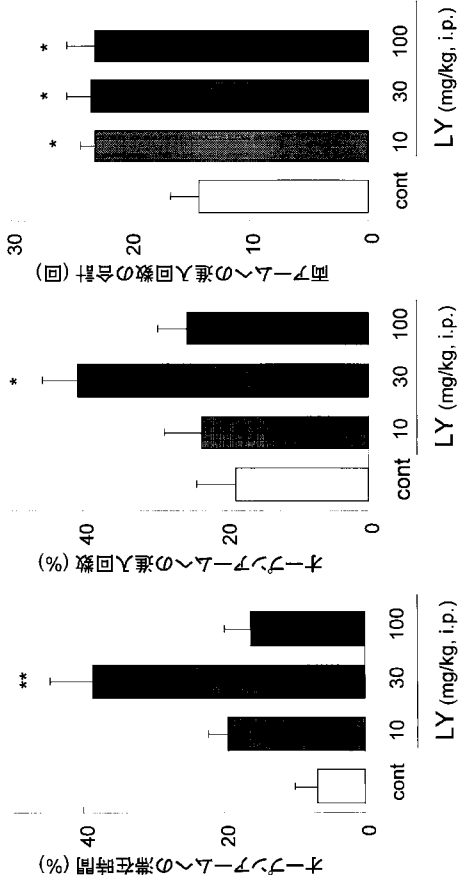
mean±SEM (n=6-11), \*p<0.05, \*\*p<0.01

【 図 5 】

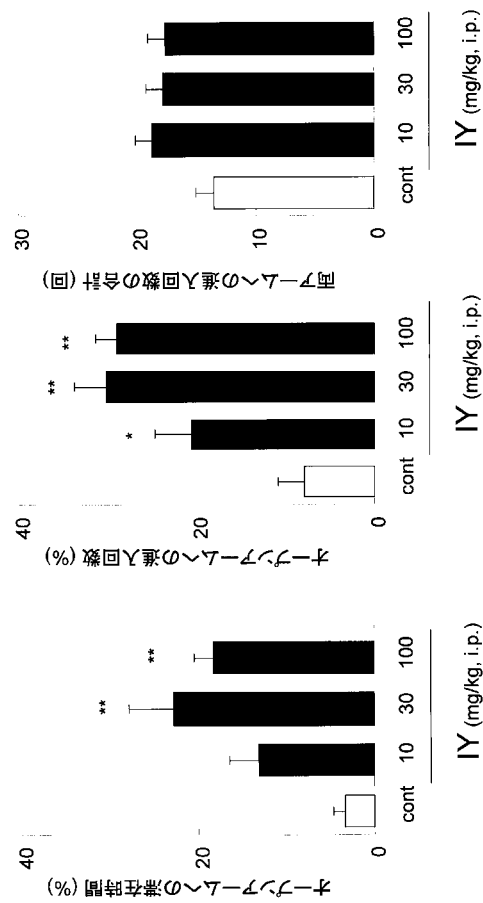


mean±SEM (n=3-5)

【 図 6 】

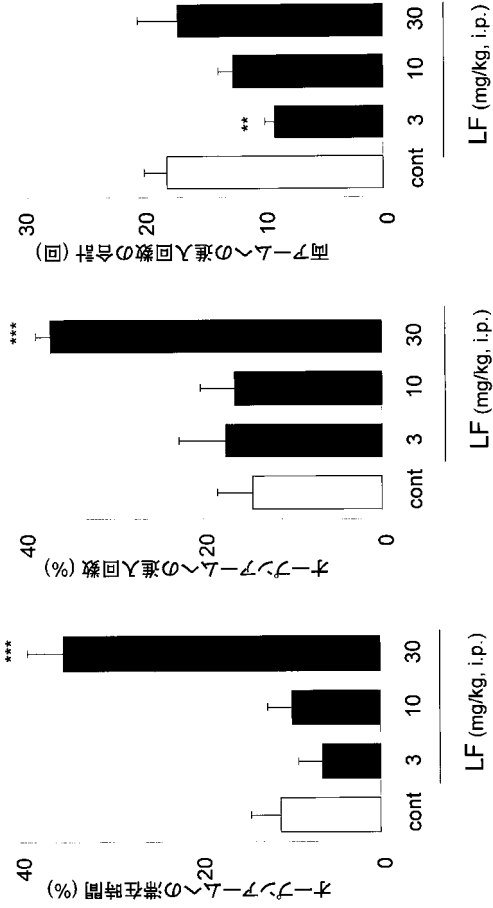


【 図 8 】



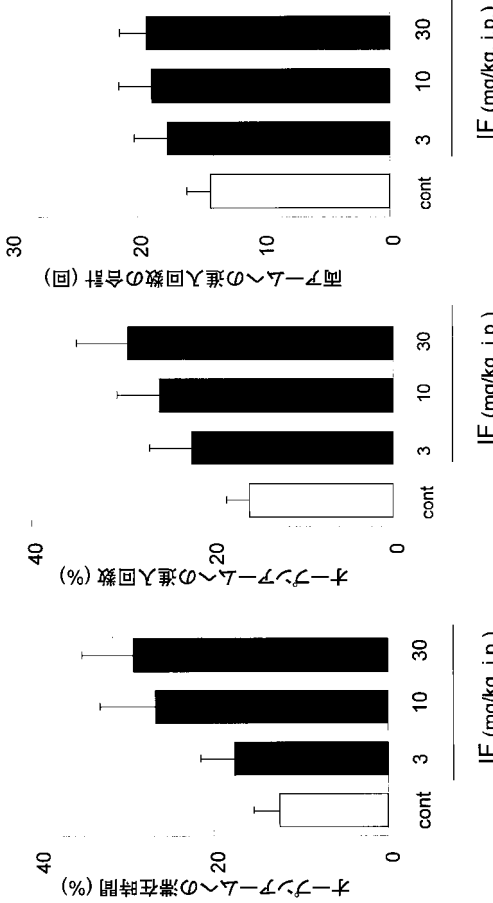
mean±SEM (n=3), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, vs control

【 図 7 】



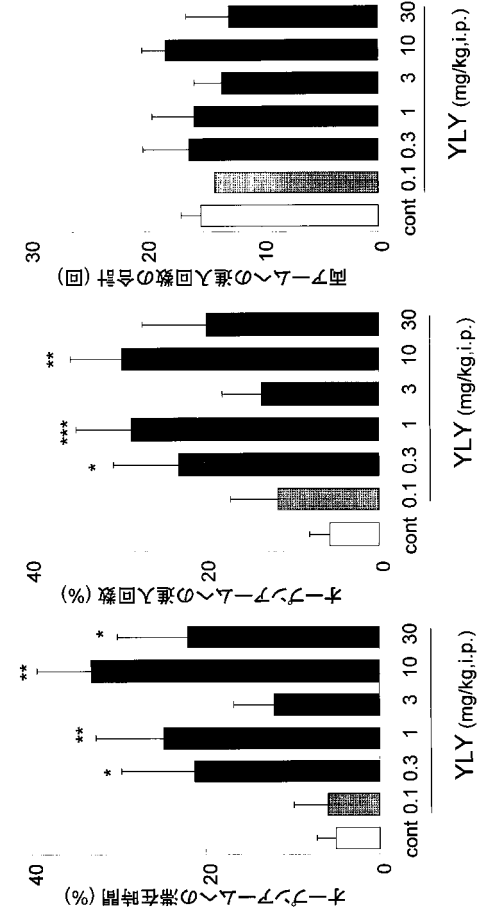
mean±SEM (n=4), \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, vs control

【 図 6 】



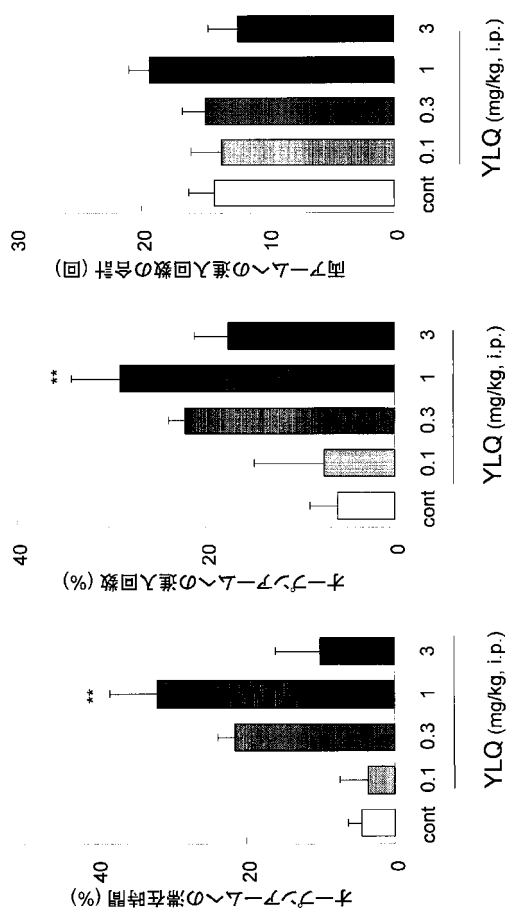
mean±SEM (n=5-6)

【図10】



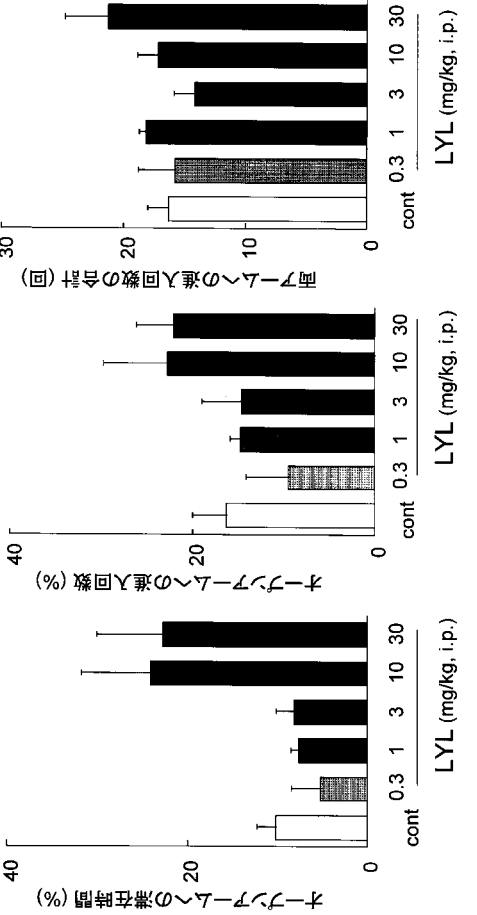
mean±SEM (n=4-9), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs control

【図11】



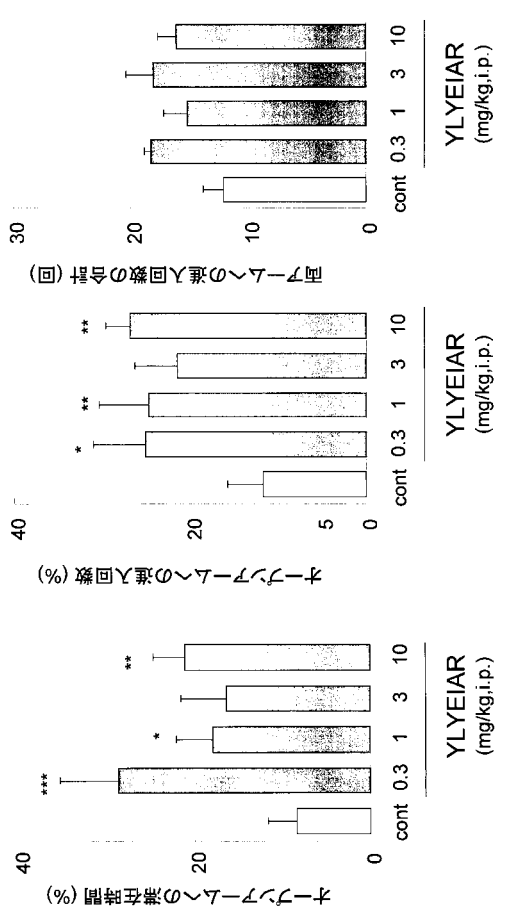
mean±SEM (n=3-9), \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs control

【図12】



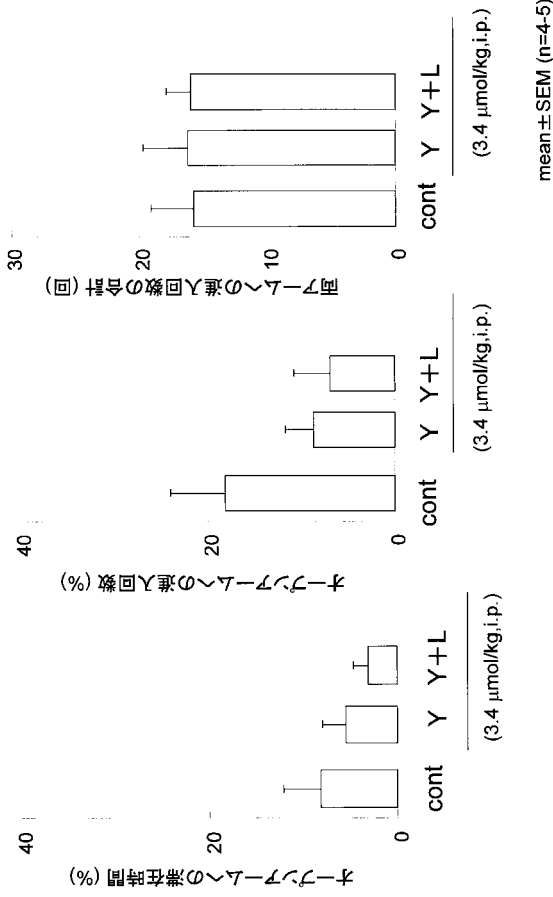
mean±SEM (n=4-8)

【図13】

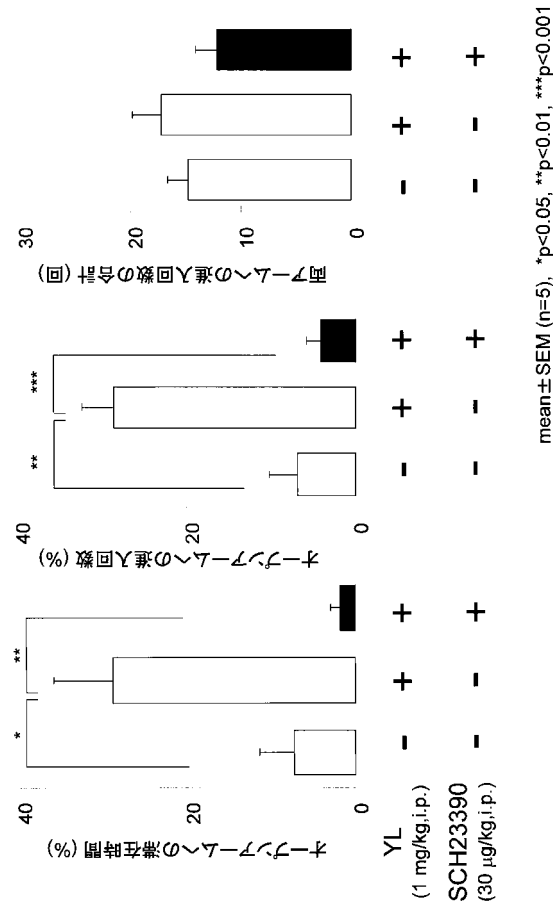


mean±SEM (n=4-9), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs control

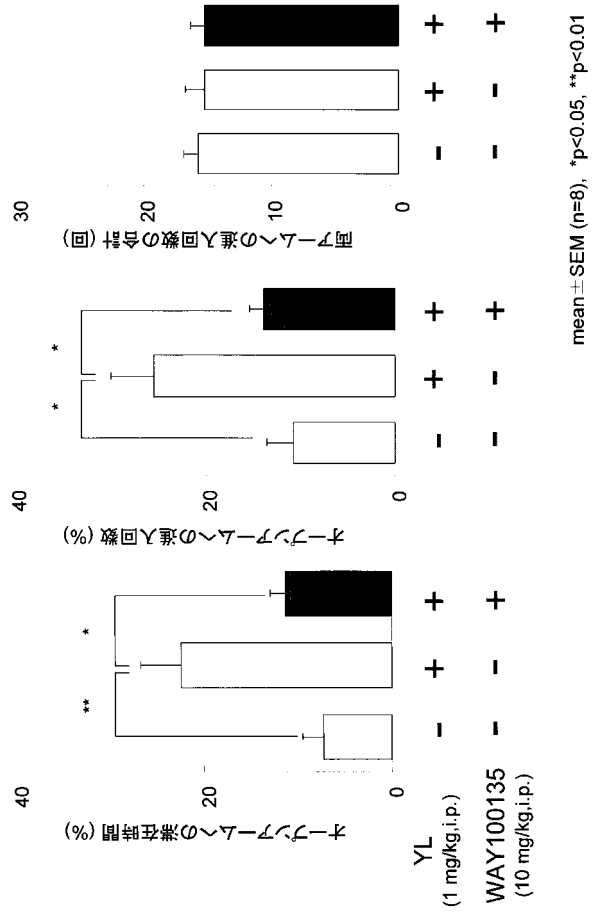
【 図 1 4 】



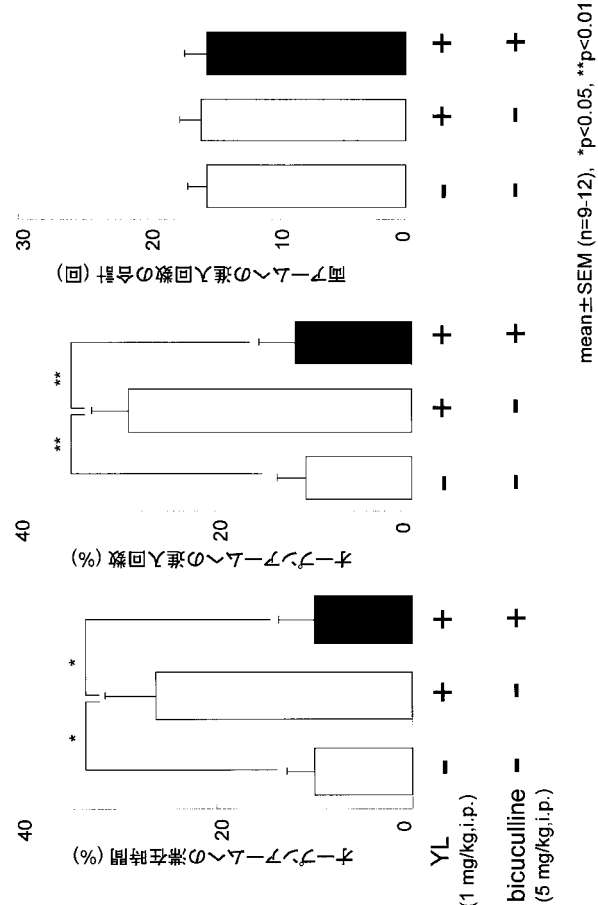
【 図 1 6 】



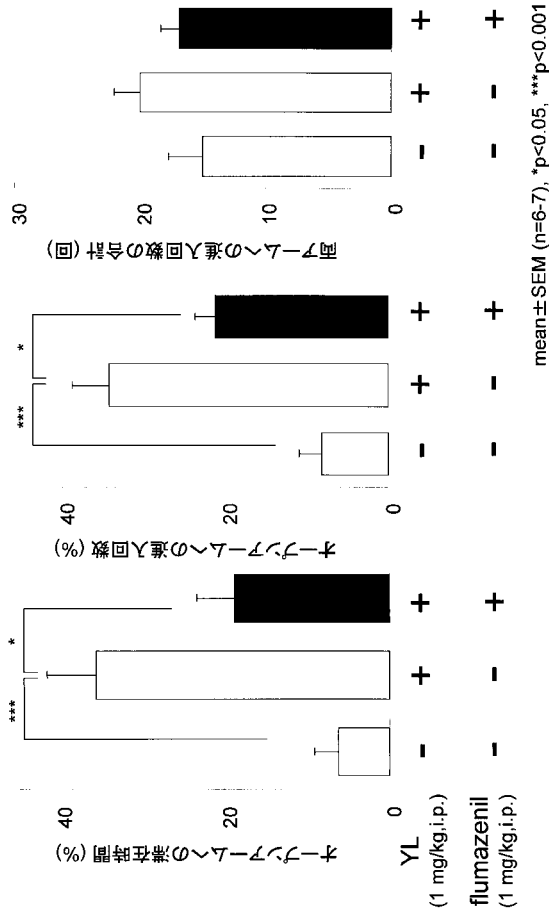
【 図 1 5 】



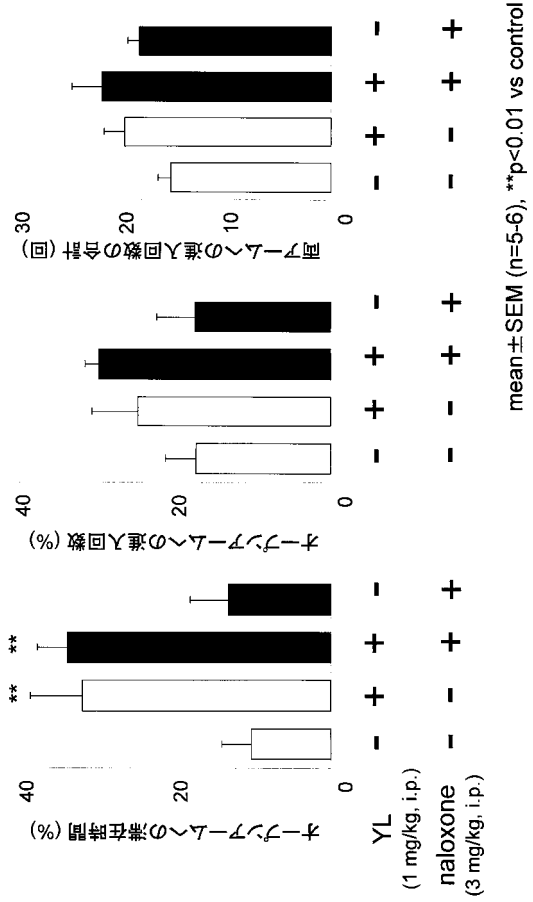
【 図 1 7 】



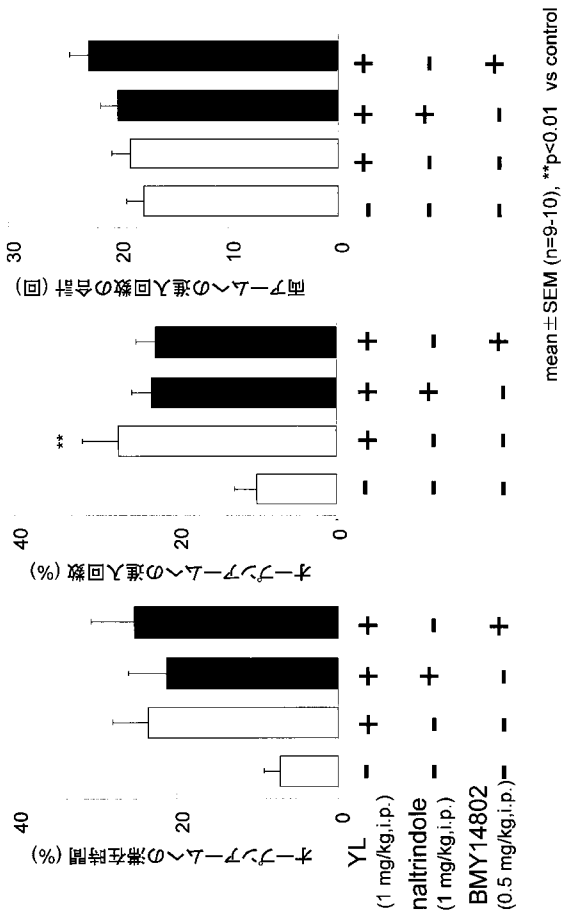
【 図 1 8 】



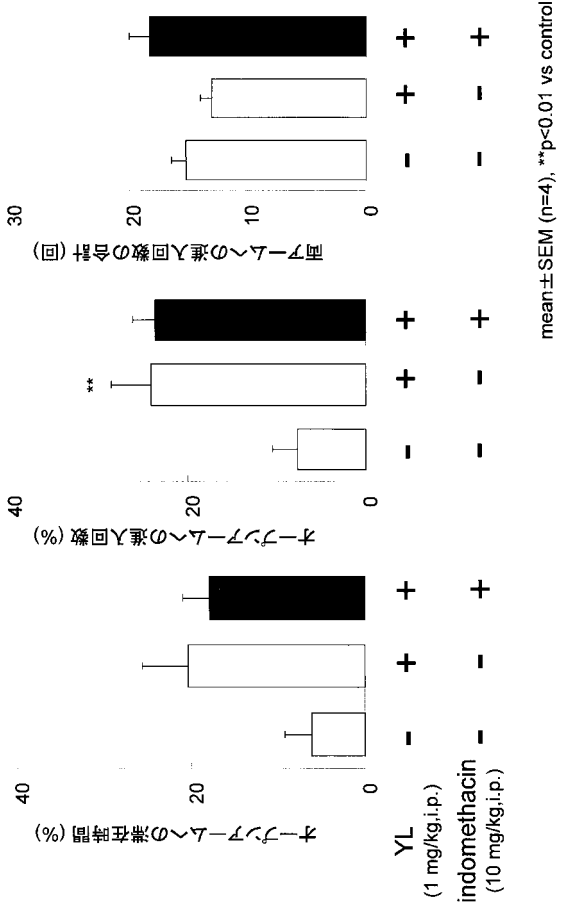
【 図 1 9 】



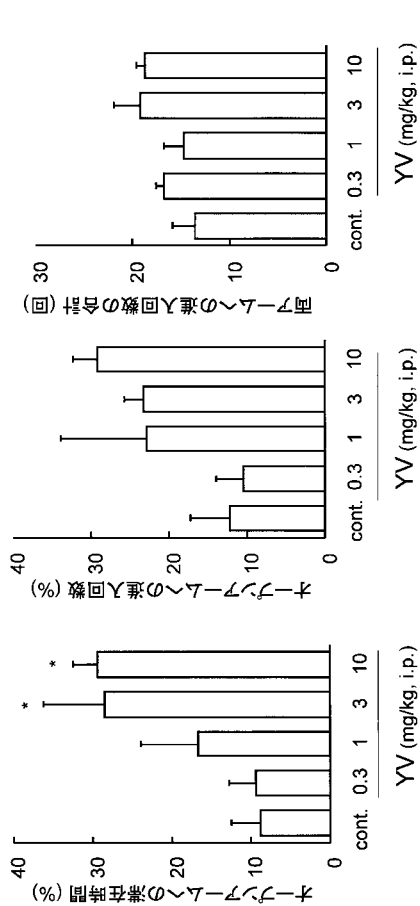
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】

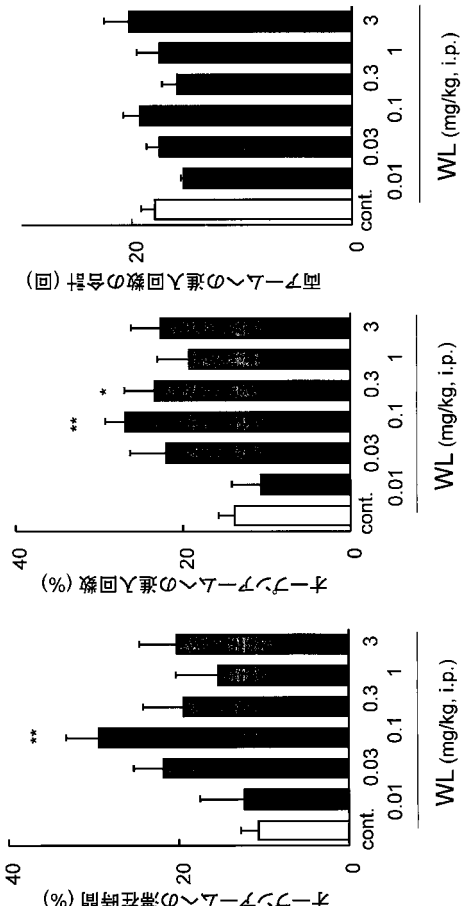


【 図 2 2 】



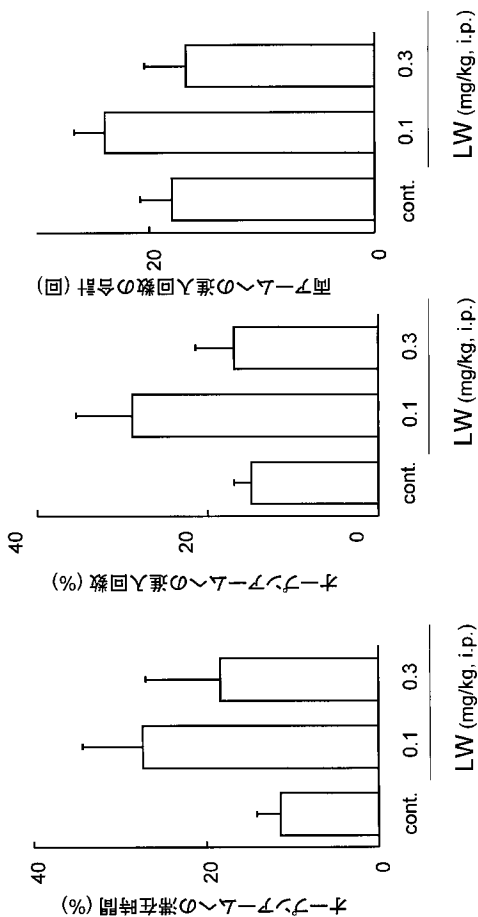
mean±SEM (n=4-5), \*p<0.05 vs control

【 図 2 3 】



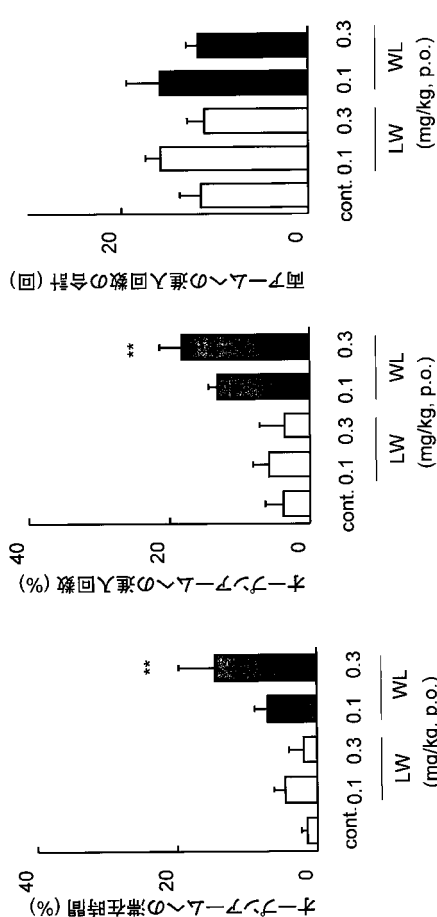
mean±SEM (n=3-9), \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs control

【 図 2 4 】



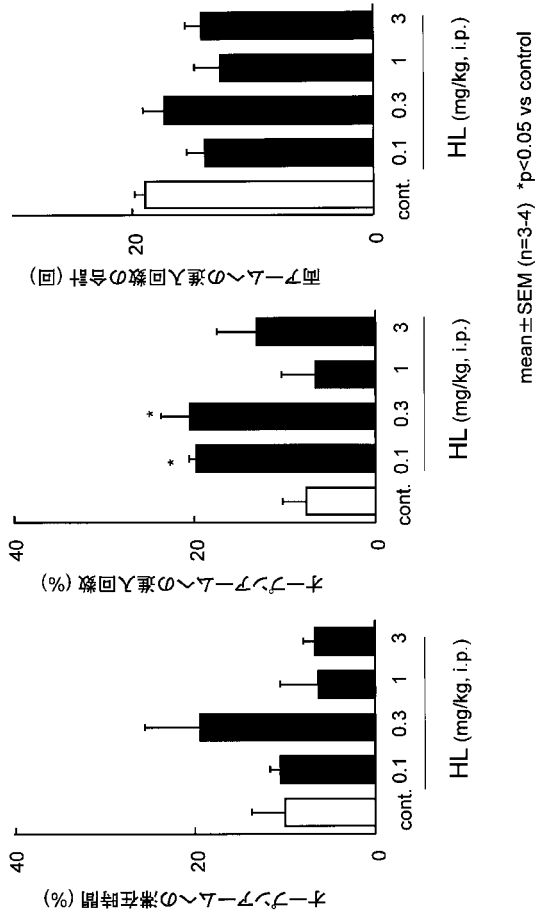
mean±SEM (n=4-5)

【 図 2 5 】

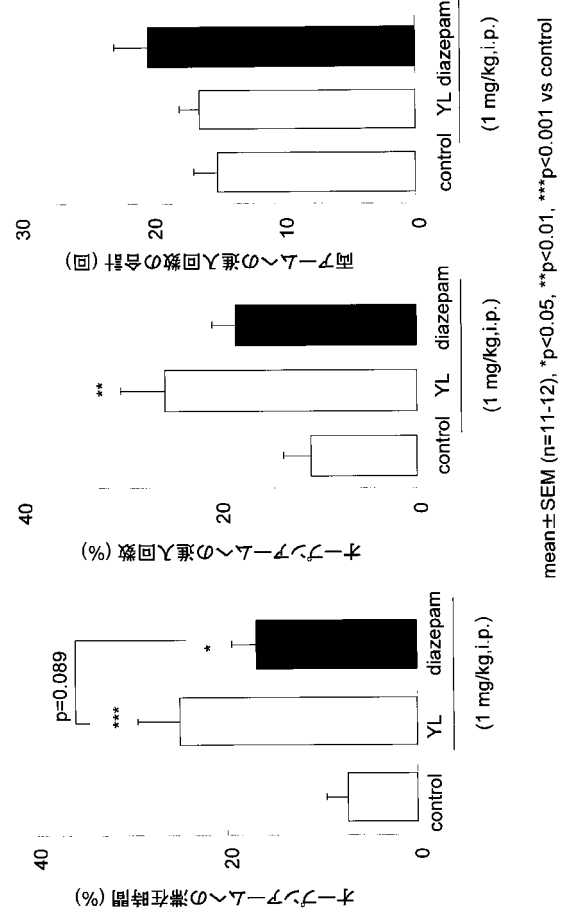


mean±SEM (n=3) \*\*p<0.01 vs control

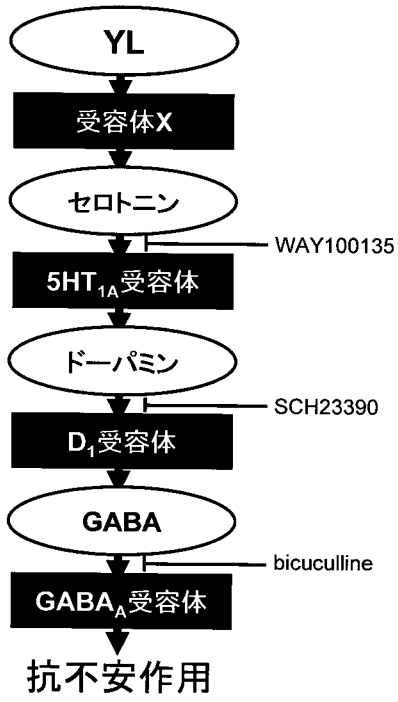
【 図 2 6 】



【 図 2 7 】



【 図 2 8 】





## 【配列表】

2010087480000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成22年12月2日(2010.12.2)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(削除)

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

YL、FL、WL、HL、YI、FI、YV、LY、LF、LW、IY、IF、(Y/F/W/H)L(Y/F/W)、(Y/F/W/H)LQ、L(Y/F/W)Lまたは(Y/F/W/H)L(Y/F/W)EIAR(但し、LはLeu、IはIle、VはVal、QはGln、EはGlu、AはAla、RはArgを表し、(Y/F/W/H)は、H、W、YまたはFを表し、(Y/F/W)は、W、FまたはYを表す。以下同じ。)を有効成分とし、抗不安剤、睡眠導入剤、睡眠改善剤、統合失調症治療薬または抗うつ薬である医薬ないし医薬組成物。

【請求項4】

YL、FL、WL、HL、YI、FI、FV、LY、LF、LW、IY、IF、YLY、YLQ、LYLまたはYLYEIARを有効成分とする請求項3に記載の医薬ないし医薬組成物。

【請求項5】

(削除)

【請求項6】

(削除)

【請求項7】

(削除)

【請求項8】

YL、FL、WL、HL、YI、FI、YV、LY、LF、LW、IY、IF、(Y/F/W/H)L(Y/F/W)、(Y/F/W/H)LQ、L(Y/F/W)Lまたは(Y/F/W/H)L(Y/F/W)EIARを添加することを特徴とする、抗不安または睡眠改善用食品。

【請求項9】

YL、FL、WL、HL、YI、FI、FV、LY、LF、LW、IY、IF、YLY、YLQ、LYLまたはYLYEIARを添加することを特徴とする、請求項8に記載の抗不安または睡眠改善用食品。

【請求項10】

請求項3又は4に記載の医薬ないし医薬組成物、または請求項8又は9に記載の抗不安または睡眠改善用食品を必要とする対象に有効量投与することを特徴とする、不安軽減または睡眠改善方法。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/051362
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K38/00(2006.01)i, A23L1/305(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i, A61P25/20(2006.01)i, A61P25/22(2006.01)i, A61P25/24(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K38/00, A23L1/305, A61P25/18, A61P25/20, A61P25/22, A61P25/24, A61P43/00, C07K7/06 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-88162 A (Gakko Hojin Takahashi Gakuen), 17 April 2008 (17.04.2008), claim 1; example 4; fig. 8 (Family: none)	1-9
X A	WO 2008/143280 A1 (Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.), 27 November 2008 (27.11.2008), paragraph [0007]; test example 1; fig. 1 to 2 (Family: none)	1-2,5-7 3-4
X A	JP 2007-91656 A (Kyoto University), 12 April 2007 (12.04.2007), claims 1, 2; examples; fig. 1 to 2 (Family: none)	1-2,5-7 3-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 06 April, 2010 (06.04.10)		Date of mailing of the international search report 20 April, 2010 (20.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051362

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 06-166697 A (Senmi Ekisu Co., Ltd.), 14 June 1994 (14.06.1994), claims 1, 3, 4; examples (Family: none)	1-4, 6-9 5
X A	JP 2006-512371 A (Her Majesty the Queen in Right of Canada as Represented by the Minister of Agriculture and Agri-Food Canada), 13 April 2006 (13.04.2006), claim 20; paragraph [0018]; table 7 & US 2006/0217318 A1	1-4, 6-9 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051362

**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.: 10  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 10 includes a method for treatment of the human body by surgery or therapy.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

The inventions in claims 1 - 9 are described in the following documents 1 - 5 and cannot be considered to be novel, and therefore, the inventions do not have any special technical feature.

(continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying 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/JP2010/051362

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

- Document 1: JP 2008-88162 A (Gakko Hojin Takahashi Gakuen) 17 April 2008 (17.04.2008)  
Document 2: WO 2008/143280 A1 (Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.) 27 November 2008 (27.11.2008)  
Document 3: JP 2007-91656 A (Kyoto University) 12 April 2007 (12.04.2007)  
Document 4: JP 06-166697 A (Senmi Ekisu Co., Ltd.) 14 June 1994 (14.06.1994)  
Document 5: JP 2006-512371 A (Her Majesty the Queen in Right of Canada as Represented by the Minister of Agriculture and Agri-Food Canada) 13 April 2006 (13.04.2006)

Subject to be searched:

Claims 1 - 3, 6 - 8 involve an extremely large number of peptides. However, among the peptides set forth in claims, few numbers of peptides only are disclosed in the meaning of PCT Article 5. Consequently, claims lack the support by the disclosure in the description in the meaning of PCT Article 6.

In conclusion, the search has been carried out on the matter disclosed and supported by the description, i.e., the peptides set forth in claims 4, 9.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/051362	
<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A23L1/305(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i, A61P25/20(2006.01)i, A61P25/22(2006.01)i, A61P25/24(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)n			
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K38/00, A23L1/305, A61P25/18, A61P25/20, A61P25/22, A61P25/24, A61P43/00, C07K7/06			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)			
<b>C. 関連すると認められる文献</b>			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	JP 2008-88162 A (学校法人高梁学園) 2008.04.17, 請求項1、実施例4、図8 (ファミリーなし)	1-9	
X A	WO 2008/143280 A1 (協和発酵バイオ株式会社) 2008.11.27, [0007], 試験例1、図1-2 (ファミリーなし)	1-2, 5-7 3-4	
X A	JP 2007-91656 A (国立大学法人京都大学) 2007.04.12, 請求項1、2、実施例、図1-2 (ファミリーなし)	1-2, 5-7 3-4	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 06.04.2010		国際調査報告の発送日 20.04.2010	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小堀 麻子	4C 4667 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/051362

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 06-166697 A (仙味エキス株式会社) 1994.06.14, 請求項1、3、 4、実施例 (ファミリーなし)	1-4, 6-9 5
X A	JP 2006-512371 A (ハー マジェスティ ザ クイーン イン ラ イト オブ カナダ アズ リプレゼンティッド バイ ザ ミニ スター オブ アグリカルチャー アンド アグリーフード カナ ダ) 2006.04.13, 請求項20、【0018】、表7 & US 2006/0217318 A1	1-4, 6-9 5

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP2010/051362
<p>第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</p> <p>法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求項 10 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項10は、人の身体の手術又は治療による処置を包含するものである。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</p> <p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。</p> <p>請求項1-9に係る発明は、以下の文献1-5に記載されており、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。</p> <p>文献1 : JP 2008-88162 A (学校法人高梁学園) 2008.04.17</p> <p>文献2 : WO 2008/143280 A1 (協和発酵バイオ株式会社) 2008.11.27</p> <p>文献3 : JP 2007-91656 A (国立大学法人京都大学) 2007.04.12</p> <p>文献4 : JP 06-166697 A (仙味エキス株式会社) 1994.06.14</p> <p>文献5 : JP 2006-512371 A (ハー マジェスティ ザ クイーン イン ライト オブ カナダ アズ リプレゼンティッド バイ ザ ミニスター オブ アグリカルチャー アンド アグリーフード カナダ) 2006.04.13</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。</p> <p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。</p>	



国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/051362

<調査の対象について>

請求項1-3、6-8は、非常に多数のペプチドを包含している。しかしながら、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされたペプチドのごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

したがって、調査は、明細書に開示され、裏付けられている部分、すなわち請求項4、9に列挙されているペプチドについて行った。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
<b>A 2 3 L 1/305 (2006.01)</b>	A 2 3 L	1/305	Z N A	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06		

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

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA11 BA12 BA13 BA14 EA01 EA21 FA20

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。