

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011年10月13日(13.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/126054 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 7/06 (2006.01) A61P 25/22 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01) A61P 25/24 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) C07K 5/083 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01) C07K 5/107 (2006.01)
A61P 25/20 (2006.01) C07K 14/465 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/058728
- (22) 国際出願日: 2011年4月6日(06.04.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-088531 2010年4月7日(07.04.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 大日向 耕作(OHINATA, Kousaku) [JP/JP]; 〒6110011 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 Kyoto (JP). 小田 亜矢子(ODA, Ayako) [JP/JP]; 〒6110011 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 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(Saegusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, 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.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))



WO 2011/126054 A1

(54) Title: PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES

(54) 発明の名称: 生理活性ペプチド

(57) Abstract: Provided is a drug or a food which comprises, as the active ingredient, at least one kind of a peptide selected from the group consisting of Val-Tyr-Leu-Pro-Arg, Tyr-Leu-Pro-Arg and Leu-Pro-Arg or an analog thereof.

(57) 要約: 本発明は、Val-Tyr-Leu-Pro-Arg、Tyr-Leu-Pro-Arg および Leu-Pro-Arg からなる群から選ばれる少なくとも1種のペプチド又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。

明 細 書

発明の名称：生理活性ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、神経調節作用を有するペプチド、当該ペプチドを含む医薬ないし食品に関する。

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。不安感は、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、過剰な不安感は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] オボアルブミンは、主要な卵白タンパク質であり、食経験が豊富である。

[0004] 特許文献1は、ダイズの主要タンパク質である β -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。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開平11-285362号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 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。

課題を解決するための手段

[0007] 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、Val-Tyr-Leu-Pro-Arg、Tyr-Leu-Pro-ArgおよびLeu-Pro-Argなどの「Leu-Pro-Arg」を共通の配列として含む短鎖ペプチドが強力な抗不安、鎮静

などの作用、プロスタグランジン類の活性化およびGABA_A受容体を活性化作用を有することを見出し、本発明を完成した。

[0008] 本発明は、以下のペプチド、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。

項1. Val-Tyr-Leu-Pro-Arg、Tyr-Leu-Pro-ArgおよびLeu-Pro-Argからなる群から選ばれる少なくとも1種のペプチド又はその類縁体。

項2: 項1のペプチド又はその類縁体を含む医薬ないし医薬組成物。

項3: 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または2に記載の医薬ないし医薬組成物。

項4: 項1のペプチド又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5: 項1のペプチドの有効量を、それを必要とする対象に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

[0009] 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。

[0010] また、本発明の薬剤は経口投与で有効である。

[0011] 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。

[0012] 本発明のペプチドまたはその類縁体はプロスタグランジン類およびGABA_A受容体を活性化作用を有し、これらの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。

[0013] 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

[0014] [図1]高架式十字迷路

[図2] V Y L P Rの腹腔内投与による抗不安作用（実施例1）。mean±SEM (n=5-10), ***p<0.001 vs control。

[図3] V Y L P Rの経口投与による抗不安作用（実施例1）。mean±SEM (n=11-20), *p<0.05, **p<0.01 vs control。

[図4] Y L P Rの腹腔内投与による抗不安作用（実施例2）。mean±SEM (n=5-11), *p<0.05, **p<0.01 vs control。

[図5] L P Rの腹腔内投与による抗不安作用（実施例3）。mean±SEM (n=4-13), *p<0.05, **p<0.01 vs control。

[図6] VYLPRの抗不安作用の構造-活性相関。mean±SEM (n=4-13), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

[図7] V Y L P Rの抗不安作用に及ぼすCOX阻害剤の影響。mean±SEM (n=12-15), **p<0.01, ***p<0.001

[図8] V Y L P Rの抗不安作用に及ぼすGABA_A受容体アンタゴニストの影響。mean±SEM (n=9-12), *p<0.05, **p<0.01。

[図9] 想定されるV Y L P Rの抗不安機構。

[図10] VYLPRの抗不安作用に及ぼすプロスタグランジンDP1受容体アンタゴニスト (A) とアデノシンA2A受容体アンタゴニスト (B) の影響 (A, n = 7-9; B, n = 9-23)。VYLPRの抗不安作用はDP1受容体とA2A受容体に対するアンタゴニストで阻害されたことからPGD2とアデノシン遊離を促進し抗不安作用を示すことが明らかとなった。

[図11] オボアルブミン (OVA) のトリプシン消化物による抗不安作用。(A) トリプシン消化物の腹腔内投与により抗不安作用を示した。(B) 経口投与でも抗不安作用を示した。なお、オボアルブミンの未消化物は抗不安作用を示さなかった (A, n = 8-10; B, n = 6-7)。

発明を実施するための形態

[0015] 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。

[0016] 本発明ペプチドの抗不安作用は、シクロオキシゲナーゼの阻害剤indomethacinで阻害されたことから、プロスタグランジン類の放出を介しているものと考えられる（図7）。

[0017] 本発明ペプチドの抗不安作用は、DP1受容体（DP₁-R）アンタゴニストであるBWA868CとアデノシンA_{2A}受容体アンタゴニストであるSCH58261により阻害されたことからPGD₂とアデノシン遊離を促進し抗不安作用を示すものと考えられる（図10）。

[0018] 本発明ペプチドの抗不安作用は、GABA_A受容体アンタゴニストbicucullineで阻害されたことから、GABA_A受容体を介する作用（GABA_A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（図8）。おそらく内因性GABAの遊離が促進されているものと考えられる。GABA_A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。

[0019] これまでダイズの主要タンパク質であるβ-コングリシニン由来のμオピオイドペプチドのsoymorphinがμ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、μ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安作用は、特許文献1のペプチドと異なりμ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。

[0020] 緑葉の主要タンパク質Rubisco由来のδオピオイドrubiscolinは、δオピオイド受容体に直接作用した後、σ₁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、δ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、 δ 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。

[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。

[0022] 有効成分

本発明の抗不安剤の有効成分は、Val-Tyr-Leu-Pro-Arg、Tyr-Leu-Pro-Arg およびLeu-Pro-Argからなる群から選ばれる少なくとも1種のペプチドである。加熱処理したオボアルブミン溶液にトリプシンを添加し、37°Cで5時間インキュベートしたところ、Val-Tyr-Leu-Pro-Argがモル換算で約44%生成することを見出している。本発明の抗不安剤の有効成分は、オボアルブミンなどのVal-Tyr-Leu-Pro-Argを含むタンパク質をトリプシンなどの蛋白分解酵素で加水分解した加水分解物を包含する。

[0023] 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。

[0024] ペプチドの塩としては、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。

[0025] 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、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。

[0026] 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) チロシン残基の類縁体が含まれる。

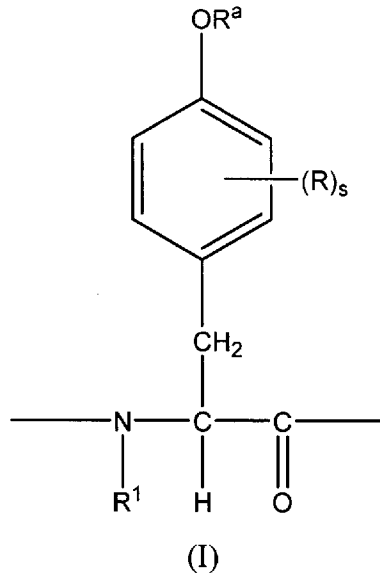
[0027] (1) ペプチドのN末端のアミノ基は、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、プロピルアミノ、ジプロピルアミノ、n-ブチルアミノ、ジn-ブチルアミノ、などの直鎖または分岐を有する炭素数1~4のアルキル基でモノ置換またはジ置換されたアミノ基でもよい。或いは、N末端のアミノ基または側鎖のアミノ基(Lysを含む場合)は、ベンジル基、フェネチル基などのアラルキル基でモノ置換またはジ置換されていてもよく、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基などの炭素数1~6の直鎖または分岐を有するアルカノイル基、ベンゾイル基などのアシル基で修飾されていてもよい。

[0028] (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。

[0029] (3) チロシン残基の類縁体(1)としては、以下の式で示される残基が挙げられる：

[0030]

[化1]



[0031] (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ニル、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、NO₂、ハロゲン原子（F、Cl、Br、I）、アミノ（NH₂）、モノまたはジ（C₁～C₆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^o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。

- [0032] 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、オボアルブミンが挙げられる。オボアルブミンのトリプシン消化物が腹腔内投与、経口投与でいずれも抗不安作用を示すことを実施例で確認した(図11)
- [0033] 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整し、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。
- [0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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。この文献は本明細書に参考として援用される。）。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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、無菌濾過してアンプルに充填するか、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。

[0046] 直腸投与剤または腔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。

[0047] 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。

[0048] 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、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、アイスキャンディ、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

[0049] 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。

[0050] (高架式十字迷路実験)

高架式十字迷路 (Elevated plus-maze) は、2つのオープンアーム (open arm; 25cm×5cm) と2つのクローズドアーム (closed arm; 25cm×5cm×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ことができる。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いると考えられ、抗不安活性の指標となる。

[0051] 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。

[0052] (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。

[0053] 実施例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VYLPR (実施例1)、YLPR (実施例2

）、LPR（実施例3）を各々図面に示される用量で、マウスに腹腔内投与（i.p.）あるいは経口投与（p.o.）し（n = 3~14）、高架式十字迷路上の中心部分に置いた。そして各ペプチド投与群および非投与群（0 mg/kg）の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、両アームを訪れた総数（total visits）を比較した。その結果を図2～図5、図7、8および表1に示す。図2～図5、図7、8および表1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。

[0054] [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	最小有効量 (mg/kg, i.p.)
VYLPR	0.3
YLPR	0.3
LPR	0.3

[0055] 実施例4

有効成分として、オボアルブミンのトリプシン消化物を使用し、腹腔内投与、経口投与を行い、実施例1～3と同様にして、オープンアームを使用した抗不安作用の試験を行った。結果を図11に示す。

[0056] オボアルブミン水溶液（20 mg/ml）を加熱処理し（10分ポイル）、ウシトリプシン（E:S=1:100）を添加し、37°Cで5時間反応させた。その結果、44 mol%の高効率でVYLPRが生成することが判明した。なお、事前に加熱処理しなかった場合にはトリプシン処理してもVYLPRは検出限界以下であり、ほとんど生成しなかった。ウシトリプシンとして、Trypsin, TPCK treated, from bovine pancreas (SIGMA)を用いた。

[0057] 消化管内にはトリプシンが存在するため未消化物を投与しても抗不安作用を示す可能性が考えられたので、対照として未消化物（加熱および非加熱処理）投与群を設定した。

[0058] 試験例1

本発明の抗不安ペプチドと各種受容体の以下の阻害剤、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本発明ペプチド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。

COX阻害剤：インドメタシン 10 mg/kg

DP₁-Rアンタゴニスト：BWA868C 60 μg/kg

A2A-Rアンタゴニスト：SCH58261 0.1 mg/kg

[0059] 結果を図 7～図 8、図10に示す。

[0060] 以上の結果より、図 9 に示すような作用経路が考えられる。

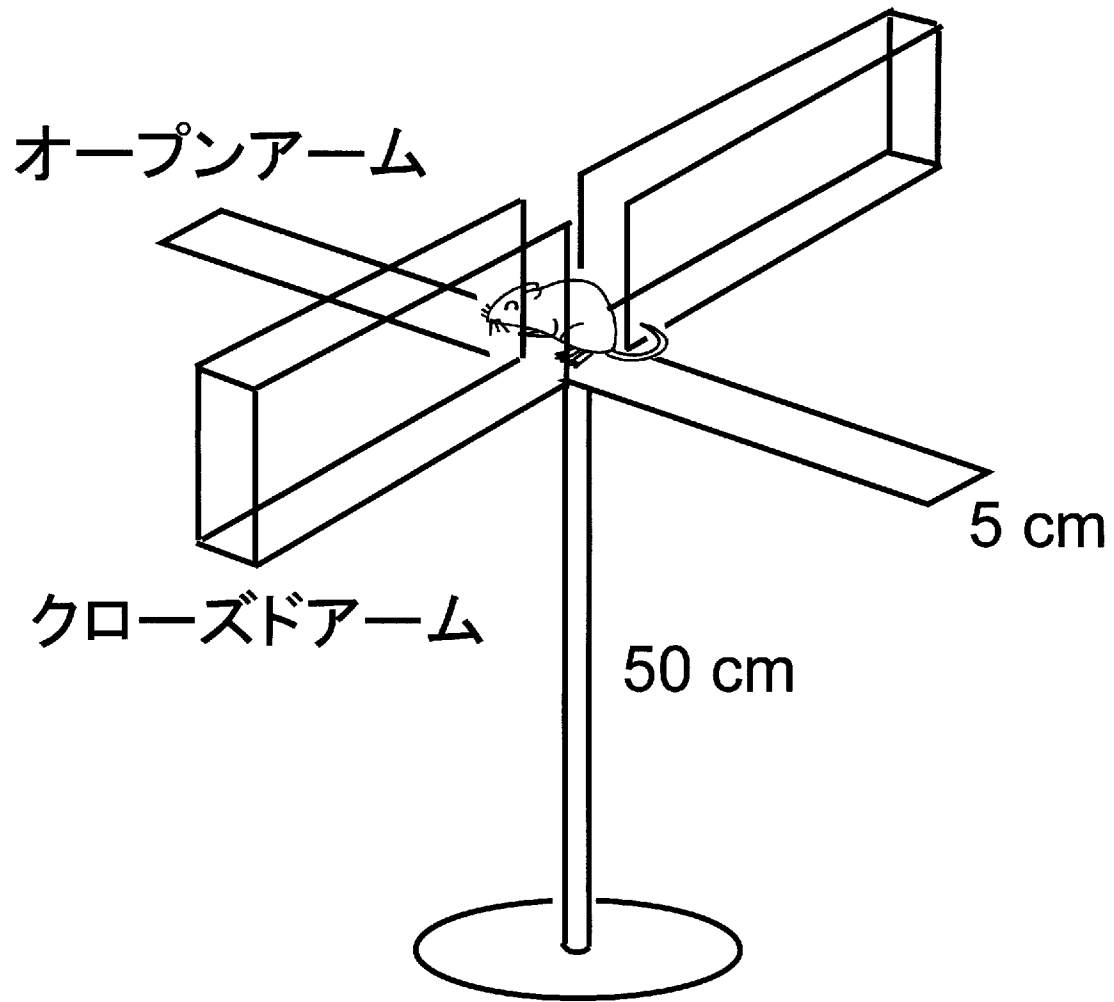
産業上の利用可能性

[0061] 本発明の抗不安ペプチドは、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、食品を提供できる。

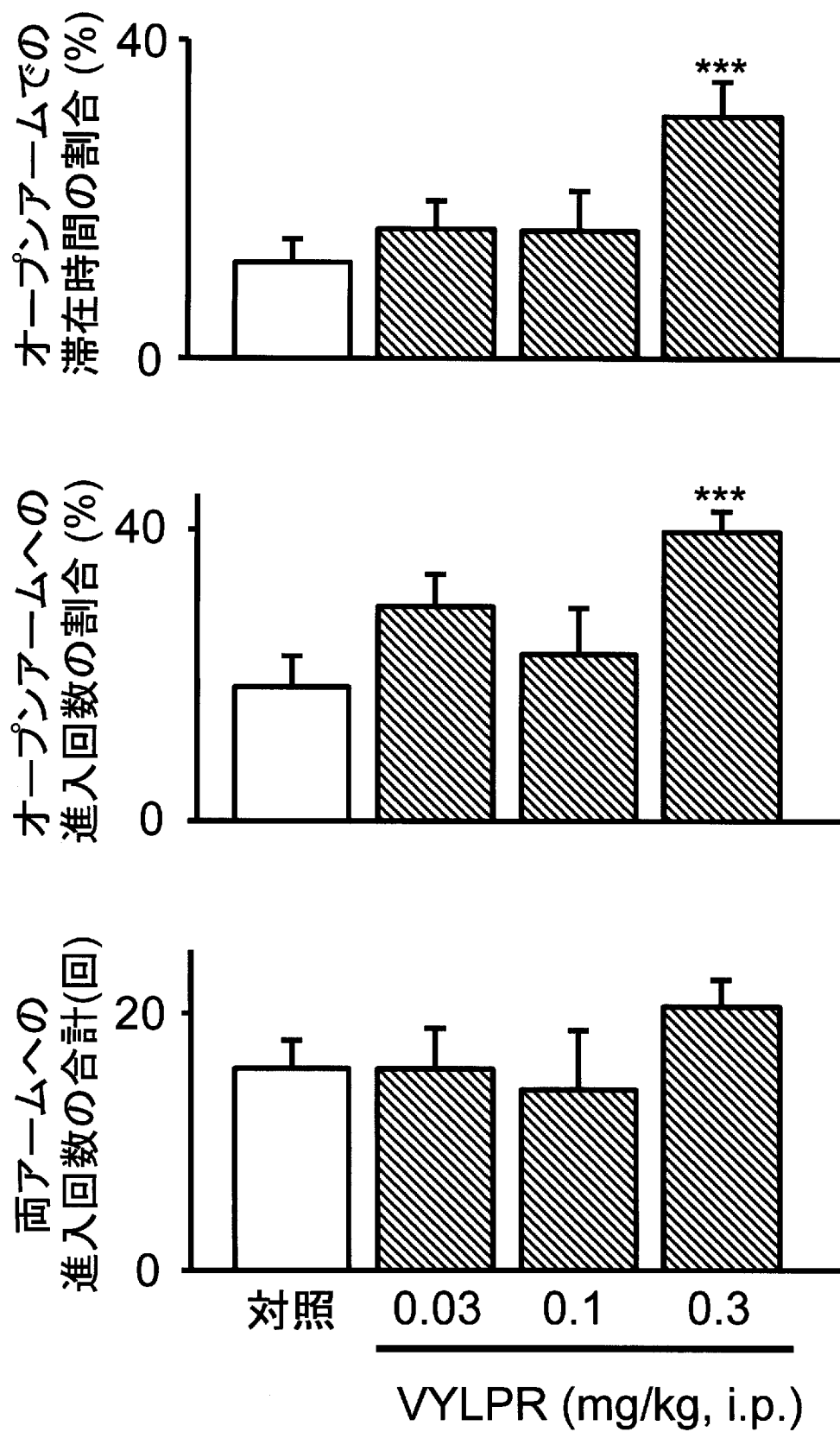
請求の範囲

- [請求項1] Val-Tyr-Leu-Pro-Arg、Tyr-Leu-Pro-ArgおよびLeu-Pro-Argからなる群から選ばれる少なくとも1種のペプチド又はその類縁体。
- [請求項2] 請求項1のペプチド又はその類縁体を含む医薬ないし医薬組成物。
- [請求項3] 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または2に記載の医薬ないし医薬組成物。
- [請求項4] 請求項1のペプチド又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5] 請求項1のペプチド又はその類縁体の有効量を、それを必要とする対象に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。

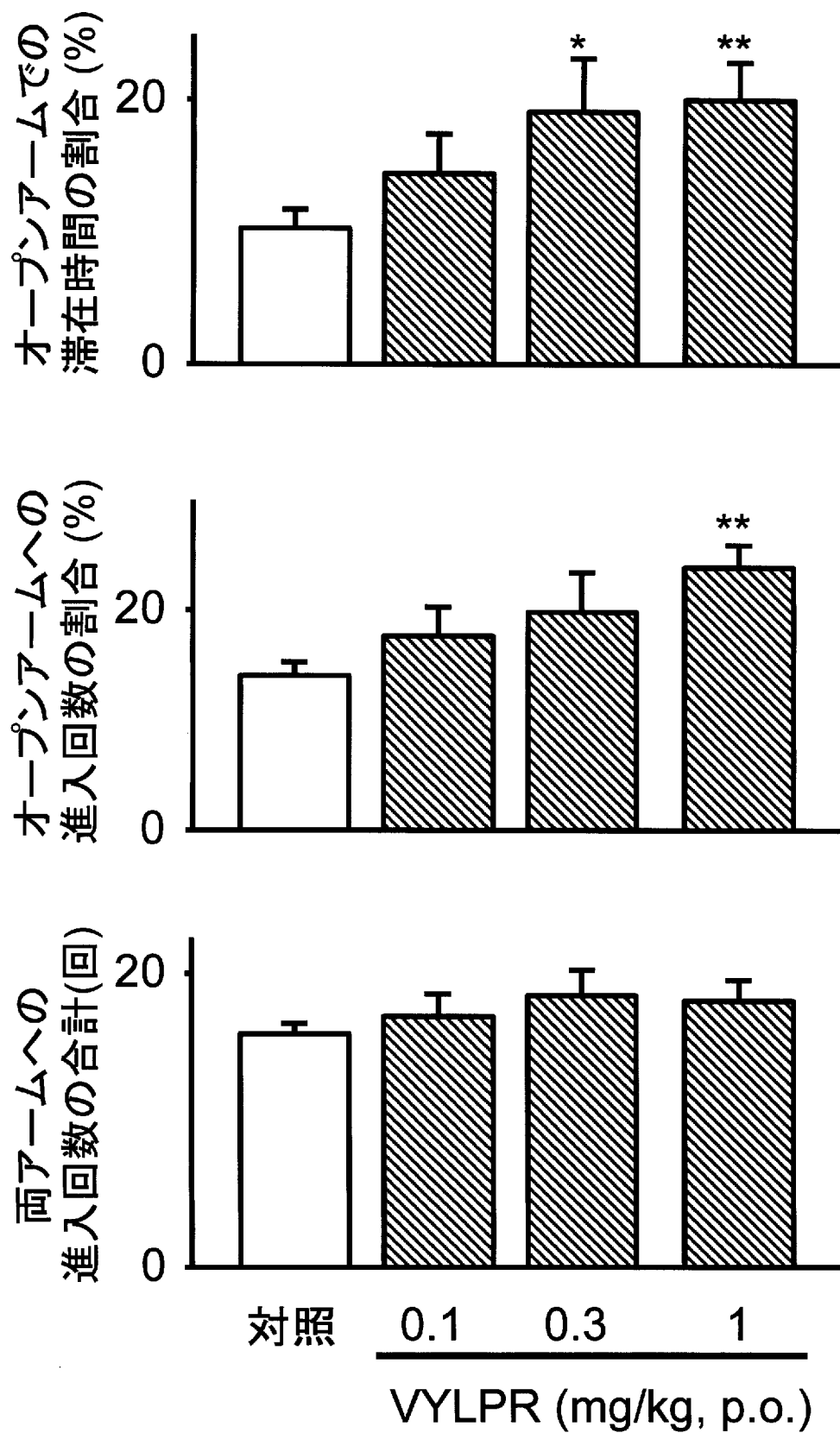
[図1]



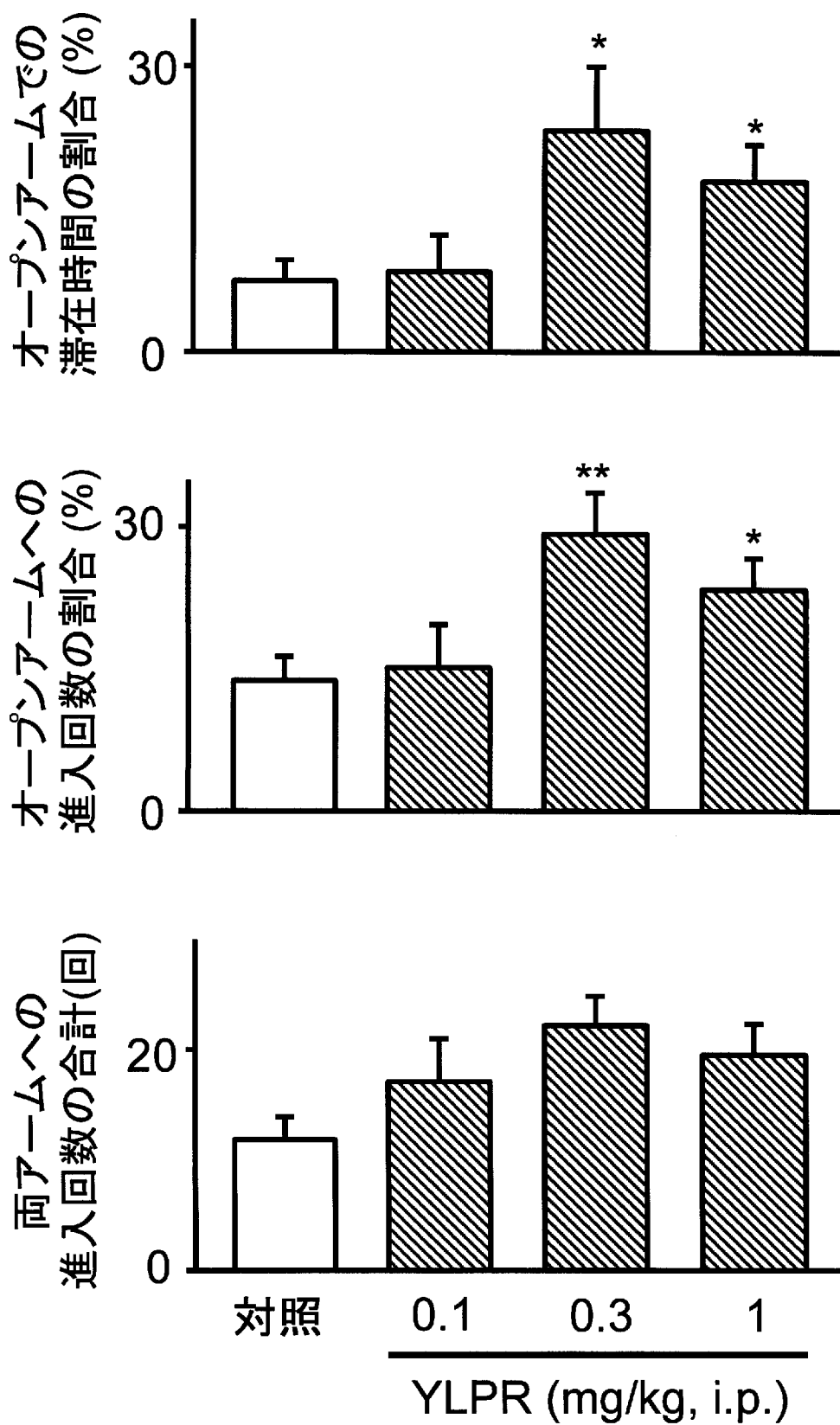
[図2]



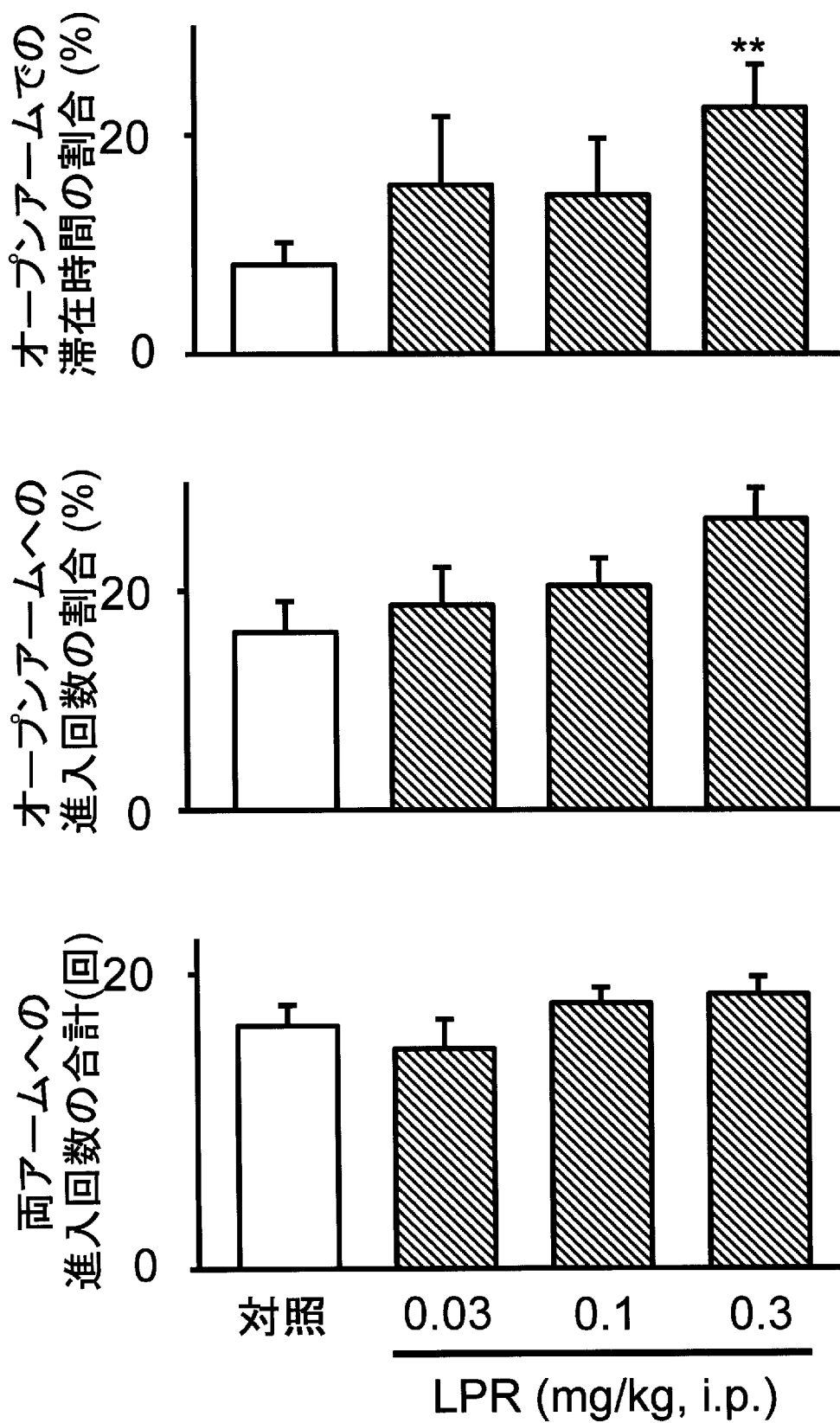
[図3]



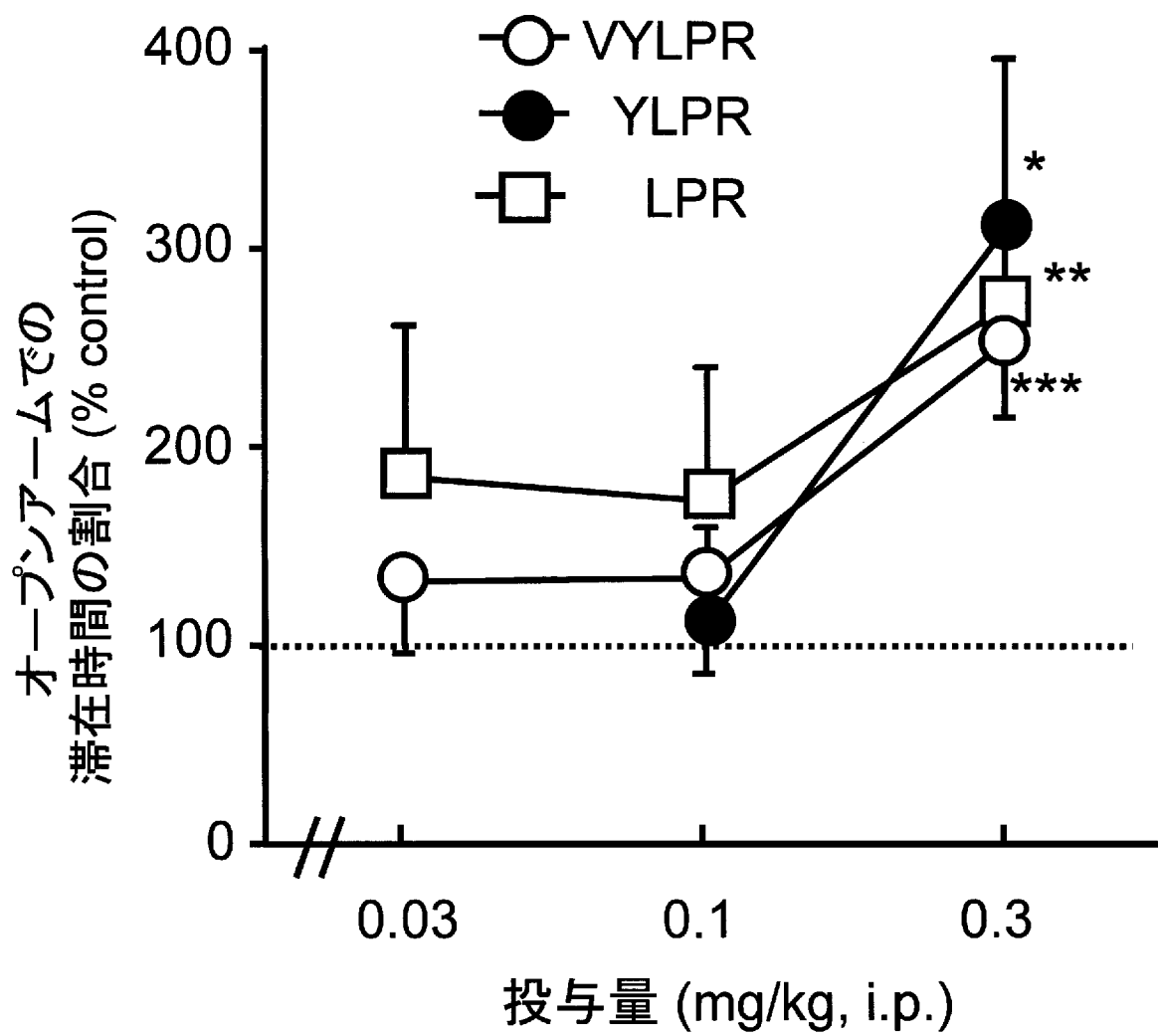
[図4]



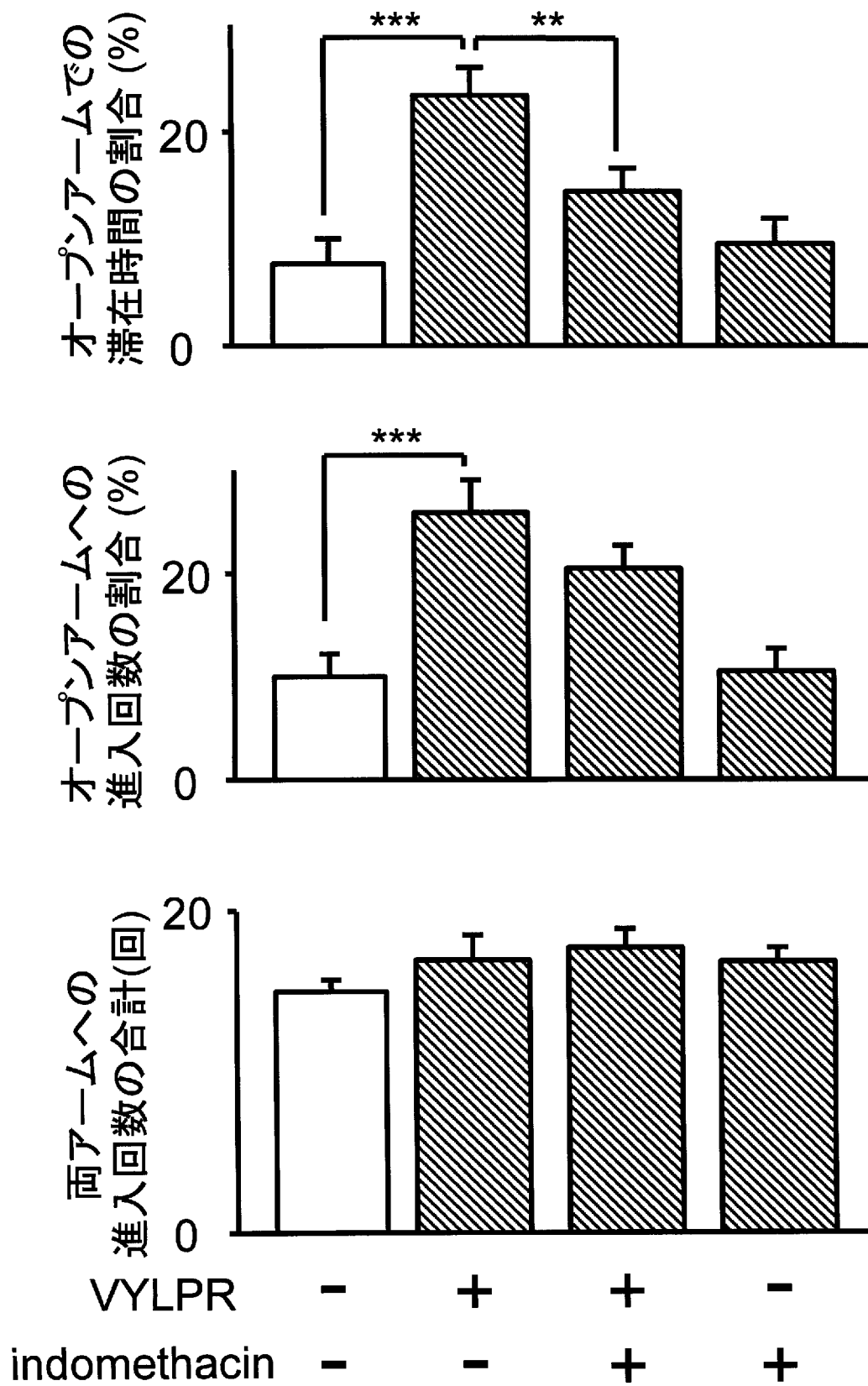
[図5]



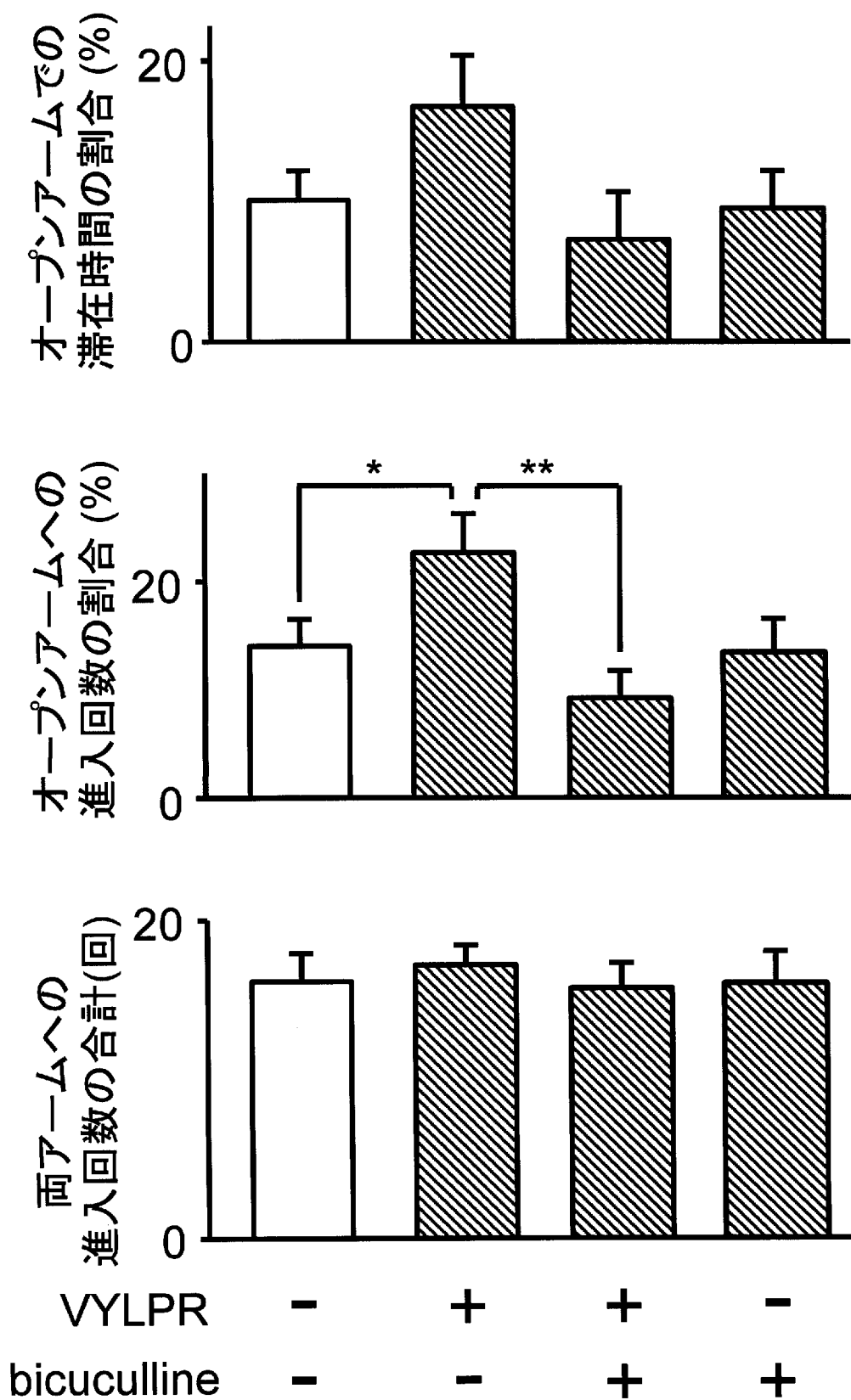
[図6]



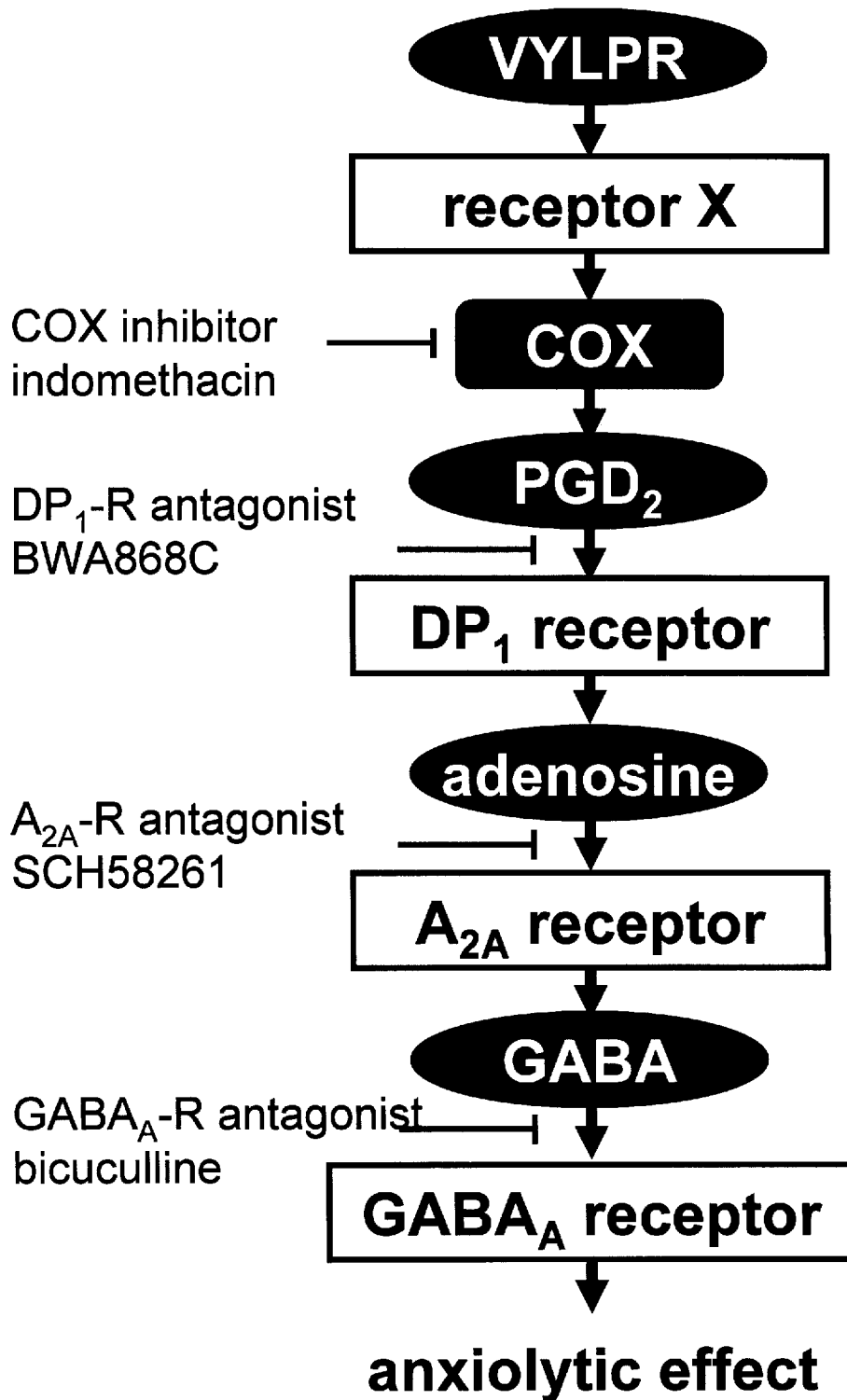
[図7]



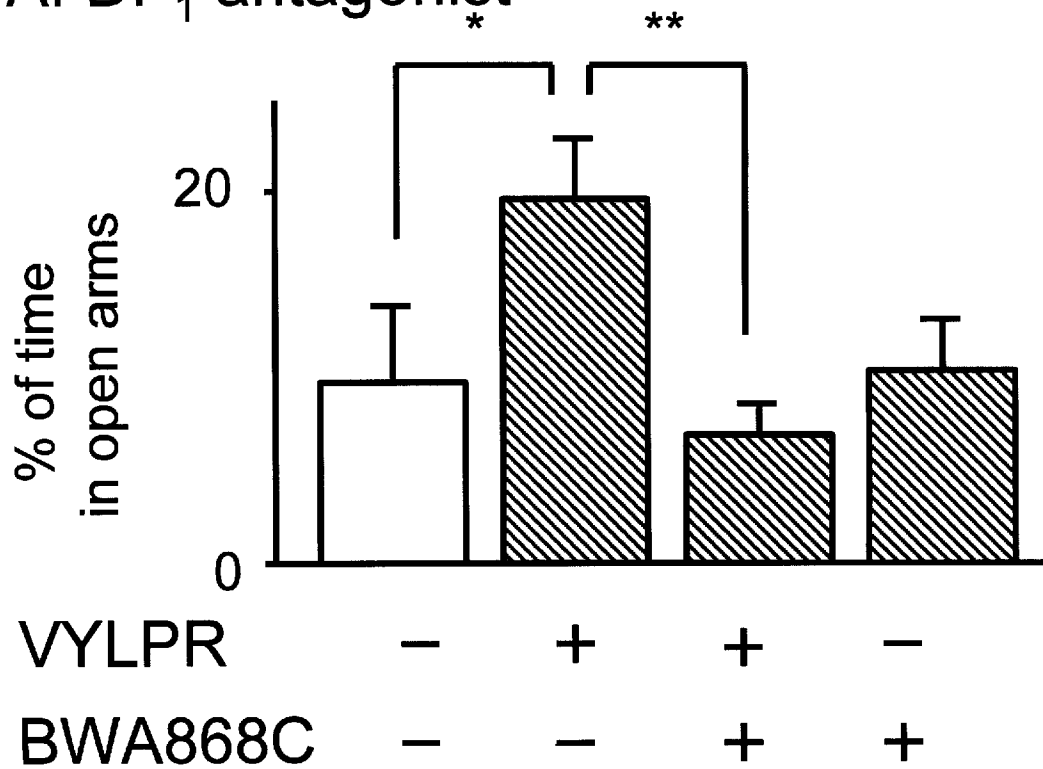
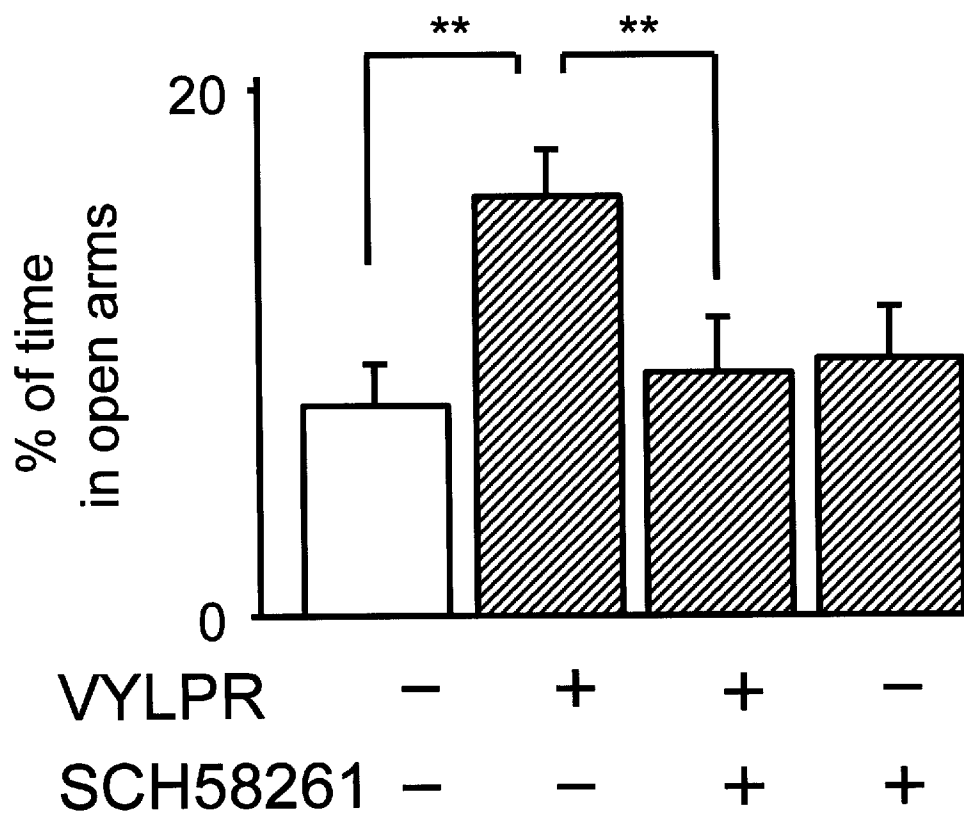
[図8]



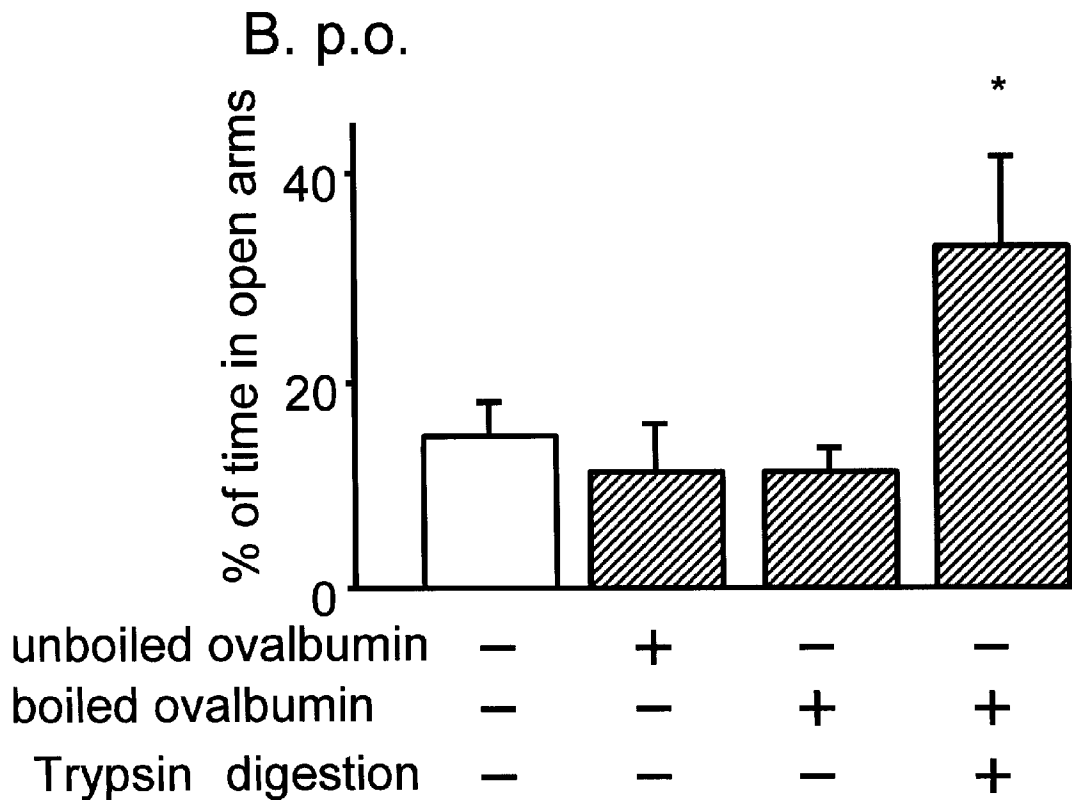
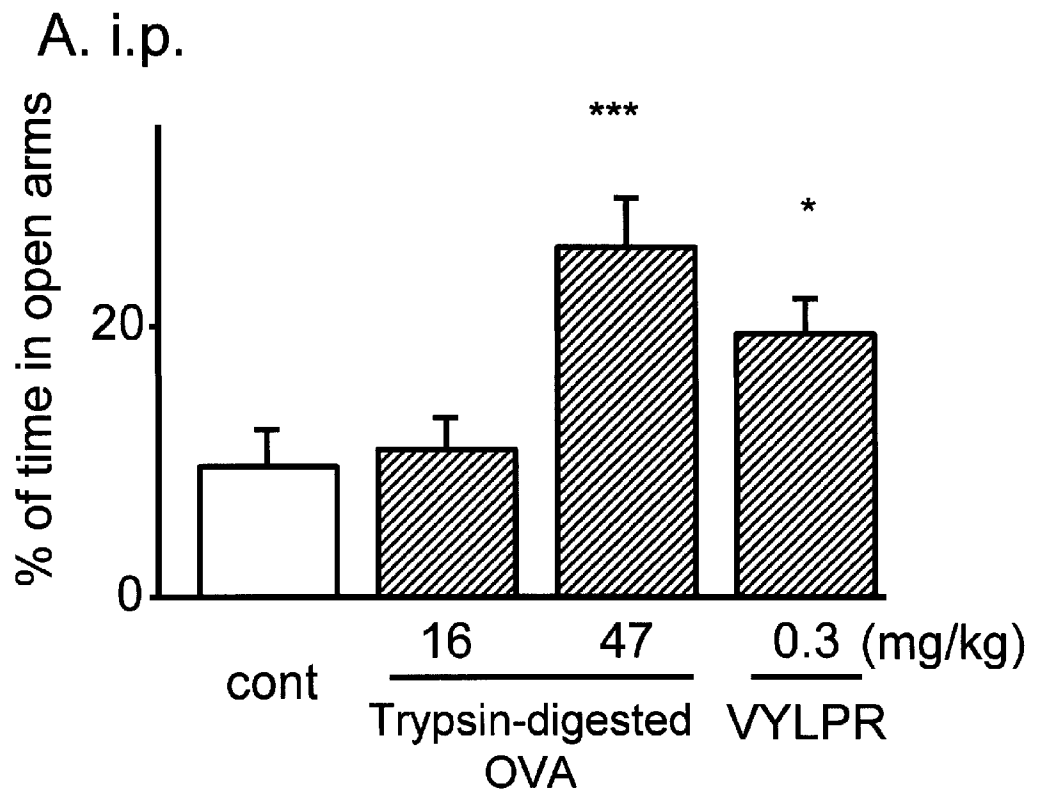
[図9]



[圖10]

A. DP₁ antagonistB. adenosine A_{2A} antagonist

[11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/06(2006.01)i, A23L1/305(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i,
A61P25/00(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,
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)

C07K7/06, A23L1/305, A61K38/00, A61P25/00, A61P25/18, A61P25/20,
A61P25/22, A61P25/24, A61P43/00, C07K5/083, C07K5/107, C07K14/465

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq,
PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	Kosaku OHINATA, "Keiran Tanpaku Yurai no Kinosei Peptide -Tokuni, Seishinteki Stress Kanwa Sayo ni Tsuite-", The 57th Proceedings of Japanese Society of Food Science and Technology, 01 September 2010 (01.09.2010), page 174	1-4
X	TOKARSKI, C. et al., "Identification of proteins in renaissance paintings by proteomics.", ANAL. CHEM., 2006.03.01, Vol.78, No.5, P.1494-1502	1
X	WU, J.-T. et al., "Protein digest analysis by pressurized capillary electrochromatography using an ion trap storage/reflectron time-of-flight mass detector.", ANAL. CHEM., 1997.08.01, Vol.69, No.15, P.2908-2913	1

 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
13 June, 2011 (13.06.11)Date of mailing of the international search report
21 June, 2011 (21.06.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058728

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2005-121380 A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 12 May 2005 (12.05.2005), entire text; particularly, paragraph [0027] (Family: none)	1
A	SUZUKI, C. et al., "[Trp5]-oryzatensin(5-9), an agonist peptide for complement C3a receptor, exhibits anxiolytic-like effect mediated by prostaglandin E2.", PEPTIDE SCIENCE 2009, 2010.04.01, P.269-272	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058728

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C07K5/083(2006.01)i, C07K5/107(2006.01)i, C07K14/465(2006.01)i

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058728

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.: 5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The method set forth in claim 5 involves a step of administration to a subject including human beings and pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus relates to a subject matter which this International
(Continued to extra sheet.)
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:

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/JP2011/058728

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K7/06(2006.01)i, A23L1/305(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P25/00(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, C07K5/083(2006.01)i, C07K5/107(2006.01)i, C07K14/465(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K7/06, A23L1/305, A61K38/00, A61P25/00, A61P25/18, A61P25/20, A61P25/22, A61P25/24, A61P43/00, C07K5/083, C07K5/107, C07K14/465

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	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq, PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X、P	大日向耕作, 「鶏卵タンパク由来の機能性ペプチドー特に精神的ストレス緩和作用についてー」, 日本食品科学工学会第57回大会講演集, 2010.09.01, P.174	1-4
X	TOKARSKI, C. et al., "Identification of proteins in renaissance paintings by proteomics.", ANAL. CHEM., 2006.03.01, Vol.78, No.5, P.1494-1502	1

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

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

13.06.2011

国際調査報告の発送日

21.06.2011

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)	4B	4155
野村 英雄		
電話番号 03-3581-1101 内線	3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WU, J.-T. et al., "Protein digest analysis by pressurized capillary electrochromatography using an ion trap storage/reflectron time-of-flight mass detector.", ANAL. CHEM., 1997.08.01, Vol.69, No.15, P.2908-2913	1
X	JP 2005-121380 A (住友製薬株式会社) 2005.05.12, 全文、特に段落27 (ファミリーなし)	1
A	SUZUKI, C. et al., "[Trp5]-oryzatensin(5-9), an agonist peptide for complement C3a receptor, exhibits anxiolytic-like effect mediated by prostaglandin E2.", PEPTIDE SCIENCE 2009, 2010.04.01, P.269-272	1 - 4

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（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。

1. 請求項 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項5に記載の方法はヒトを含む対象に投与する工程を含む方法であるから、治療による人体の処置方法に関するものに該当し、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものであると認められる。
2. 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、
3. 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。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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