

(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
2020年9月10日(10.09.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/179570 A1

(51) 国際特許分類:

A61P 1/14 (2006.01) A61K 38/03 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) A61K 38/05 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/007659

(22) 国際出願日: 2020年2月26日(26.02.2020)

(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 2019-037252 2019年3月1日(01.03.2019) JP

(71) 出願人: 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 6 番地 1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 大日向 耕作 (OHINATA, Kousaku); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 中戸 絢也 (NAKATO, Junya); 〒6068501 京都

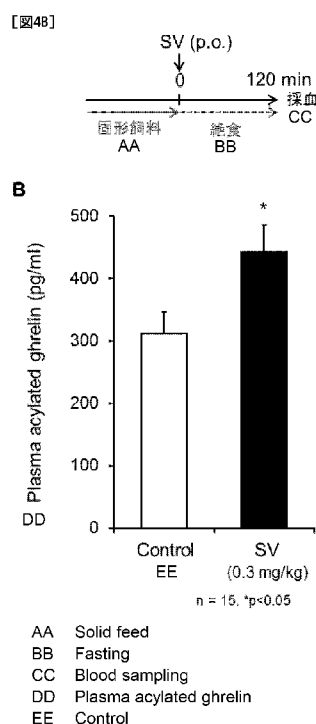
府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(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 北浜コニシビル 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, 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, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: PEPTIDE

(54) 発明の名称: ペプチド



(57) Abstract: Provided are a novel ghrelin secretion promoter, a pharmaceutical composition for promoting appetite, a pharmaceutical composition for promoting growth hormone secretion, and a method for promoting appetite and/or promoting growth hormone secretion. Specifically, provided are a ghrelin secretion promoter having as an active ingredient a 2-20 amino acid-long peptide having the amino acid sequence SX (X represents an amino acid residue selected from V, L, I, M, F, W, Y, S, T, N, K, R, and H), a pharmaceutical composition for promoting appetite, a pharmaceutical composition for promoting growth hormone secretion, and a method for promoting appetite and/or promoting growth hormone secretion.

(57) 要約: 新規なグレリン分泌促進剤、食欲を促進するための医薬組成物、成長ホルモンの分泌促進のための医薬組成物、並びに食欲を促進及び/または成長ホルモンの分泌を促進する方法が提供される。具体的には、アミノ酸配列SX (Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。)を有する2~20アミノ酸長のペプチドを有効成分とするグレリン分泌促進剤、食欲を促進するための医薬組成物、成長ホルモンの分泌促進のための医薬組成物、並びに食欲を促進及び/または成長ホルモンの分泌を促進する方法が提供される。

(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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、グレリン分泌促進剤、食欲を促進するための医薬組成物、成長ホルモンの分泌促進のための医薬組成物、並びに食欲を促進及び／または成長ホルモンの分泌を促進する方法に関する。

背景技術

[0002] グレリンは、食欲促進作用と成長ホルモン分泌促進作用を有する消化管ホルモンである。超高齢化社会を迎える我が国では、加齢に伴う食欲不振や成長ホルモン分泌減少の改善に寄与する、グレリン分泌促進物質の開発が望まれている。

[0003] 特許文献1には、グレリン受容体を活性化する低分子ペプチドが記載されている。特許文献2には、大豆タンパク質由来の成長ホルモン分泌促進組成物が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：日本国特開2005-082489号

特許文献2：国際公開W02017/150548号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、新規なグレリン分泌促進剤、食欲を促進するための医薬組成物、成長ホルモンの分泌促進のための医薬組成物、並びに食欲を促進及び／または成長ホルモンの分泌を促進する方法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

[0006] 本発明者は、上記課題を解決すべく、鋭意研究を重ねてきた。その結果、アミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドがグ

レリンの分泌促進作用を有することを見出した。本発明はかかる知見に基づいて、さらに検討を重ねて完成されたものである。

[0007] すなわち、本発明は以下の態様を包含する。

[0008] 項1、アミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドを有効成分とするグレリン分泌促進剤。

[0009] 項2、アミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドを有効成分とする、食欲を促進するための医薬組成物。

[0010] 項3、アミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドを有効成分とする、成長ホルモンの分泌促進のための医薬組成物。

[0011] 項4、有効量のアミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドを必要とする患者または予備群に投与する工程を含む、食欲を促進及び／または成長ホルモンの分泌を促進する方法。

[0012] 項5、食欲を促進及び／または成長ホルモンの分泌を促進するための、アミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドの使用。

発明の効果

[0013] 本発明のグレリン分泌促進剤及び医薬組成物は、グレリンの分泌促進作用に基づき、食欲促進や成長ホルモンの分泌促進の作用を発揮する。これらの作用に基づき、食欲不振、筋肉量低下、ロコモティブシンドロームの予防や治療に好適に使用することができる。本発明のグレリン分泌促進剤及び医薬組成物は、副作用が低く長期の服用に適したものである。また、本発明のグレリン分泌促進剤及び医薬組成物は、経口投与で有効である。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]グレリン分泌活性の評価方法を模式的に示す。

[図2]グレリン分泌活性の評価結果を示す。(A) ジペプチドSV、SF及びSWの評価結果、(B) ジペプチドSVの用量依存性についての評価結果、(C) ジペプチドSVの構成アミノ酸の評価結果をそれぞれ示す。

[図3]左図は既知のグレリン分泌促進経路を模式的に示す。(A) ジペプチドSVによるグレリン分泌促進時における細胞内のcAMP濃度の測定結果を示す。

(B) ジペプチドSVによるグレリン分泌促進時における細胞内カルシウムイオン濃度の測定結果を示す。

[図4A]ジペプチドSV投与による摂食促進作用を示す。

[図4B]ジペプチドSV投与による血中グレリン濃度の増加作用を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明における有効成分であるペプチドは、アミノ酸配列SX (Xは、V (バリン)、L (ロイシン)、I (イソロイシン)、M (メチオニン)、F (フェニルアラニン)、W (トリプトファン)、Y (チロシン)、S (セリン)、T (スレオニン)、N (アスパラギン)、K (リジン)、R (アルギニン) 及びH (ヒスチジン) から選択されるアミノ酸残基を示す。) を有する2～20アミノ酸残基長のペプチドである。

[0016] 上記ペプチドは、好ましくは2～20アミノ酸残基、より好ましくは2～10アミノ酸残基、さらに好ましくは2～5アミノ酸残基、特に好ましくは2、3、4又は5アミノ酸残基を有する。

[0017] 上記ペプチドは、アミノ酸残基長が3以上である場合、アミノ酸配列NXのN末端側及び／又はC末端側に、任意のアミノ酸残基を有する。アミノ酸残基は、天然アミノ酸であっても非天然のアミノ酸であってもよい。天然アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシンロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンのタンパク質を構成するアミノ酸残基、並びに、セレノシステイン、N-ホルミルメチオニン、ピロリシン、ピ

ログルタミン等のその他のアミノ酸残基が含まれる。

[0018] 本発明の好ましい態様の一つにおいて、上記ペプチドはジペプチドSVである。

[0019] 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）のいずれを使用することができる。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好ましい。

[0020] 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もあり得る。エナンチオマーまたはジアステレオマーの分離は、通常のカラムで行う方法、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方法などの公知のいずれの方法を用いることができる。

[0021] ペプチドは、修飾を有することができる。ペプチドのアミノ末端（N末端）は、遊離のアミノ基（ NH_2 ）であっても、アセチル基（ CH_3CO ）などの修飾を有するものであってもよい。ペプチドのカルボキシ末端（C末端）は、遊離のカルボキシル基（ COOH ）であっても、アミド基などの修飾を有するものであってもよい。ペプチドのアミノ酸残基は、無修飾ものであっても、リン酸基、糖鎖などの修飾を有するものであってもよい。

[0022] 本発明のペプチドは、塩（酸付加塩又は塩基塩）であってもよい。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。

[0023] 本発明のペプチドは、溶媒和物であってもよい。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。

[0024] また本発明のペプチドは、例えば、ペプチド合成法で取得することができる。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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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）。

[0028] 本発明のペプチドは、グレリンの分泌を促進する作用を有する。グレリンは、下記の構造を有する生体由来のペプチドである。具体的には、アミノ酸残基28基からなり、3番目のセリン残基がn-オクタン酸で修飾されている。グレリンは、食欲促進作用と成長ホルモン分泌促進作用を示す。

[0029] [化1]



[0030] 従って、グレリンの分泌を促進する本発明のペプチドは、食欲促進作用（摂食促進作用）、成長ホルモンの分泌促進作用等のグレリンの分泌促進に基づく作用をも有する。食欲促進作用（摂食促進作用）に基づいて、本発明のペプチドは、高齢者における食欲不振の治療のためなどに使用することができる。成長ホルモンの分泌促進作用に基づいて、筋肉量低下の予防、ロコモティブシンドローム（ロコモ）の予防若しくは治療のためなどに使用することができる。

[0031] 本発明のペプチドがグレリンの分泌量を促進することは、当業者に公知の手法で評価をすることができる。例えば、文献：Iwakura H et.al, Endocrinology, 2010 Jun;151(6):2940-5に記載のグレリン分泌細胞MGN3-1に試験物質を添加して、所定時間培養後に回収した培地中のグレリンを定量することで、グレリンの分泌量を測定することができる。グレリンの定量は、ELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）などの免疫化学的手法により行うことができる。

[0032] 本発明のペプチドは、医薬組成物または食品（食品組成物）として提供されうる。

[0033] 本発明のペプチドまたはこれを含有する製品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。中でも、効果が高いとの観点から、経口投与が好ましい。

[0034] 本ペプチドの投与量は、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 $0.01\text{ mg/kg} \sim 500\text{ mg/kg}$ 、好ましくは $0.05\text{ mg/kg} \sim 100\text{ mg/kg}$ 、より好ましくは $0.1 \sim 30\text{ mg/kg}$ である。本発明のペプチド(有効成分)は、製剤用担体と混合して調製した医薬組成物の形で投与することができる。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。

[0035] 本発明のペプチドはそれ自体医薬または食品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、 $0.01 \sim 100$ 重量%の範囲である。

[0036] 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。

[0037] 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、液体製剤にあっては、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。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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、その他ノンアルコール飲料、アルコール飲料など）、菓子類（ハードキャンディー、ガム、グミ、ゼリー、プディング、ムース、ケーキ、キャンデー、クッキー、クラッカー、ビスケット、チョコレート、氷菓（アイスクリーム、アイスキャンディ、シャーベット、かき氷など）など）、ふりかけ、ドレッシング、調味料、大豆加工食品（豆腐、味噌、醤油、湯葉、きな粉、納豆など）、食肉加工食品（ハンバーグ、ミートローフ、ミートボール、つくねなど）、魚肉加工食品（かまぼこ、ちくわなど）、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、機能性表示食品、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及び／又は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。

[0042] 本発明に係るペプチドは、食欲を促進及び／または成長ホルモンの分泌を促進するための医薬の有効成分のリード化合物として用いることができる。本発明に係るペプチドに必要な化学修飾を加えて、安定性、安全性などを満たす最終的な食欲を促進及び／または成長ホルモンの分泌を促進するための医薬の有効成分を得ることができる。

[0043] 本発明に係るペプチドはまた、食欲を促進及び／または成長ホルモンの分泌を促進するための医薬の有効成分のスクリーニングにおける、対照として用いることができる。具体的には、スクリーニング対象の被験物質のグレリンの分泌を促進する活性を評価し、本発明に係るペプチドよりもグレリンの分泌を促進する活性が高い場合は、当該被験物質を食欲を促進及び／または成長ホルモンの分泌を促進するための医薬の有効成分として選択することができる。

実施例

[0044] 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。

[0045] <方法>

(グレリン分泌活性の評価)

グレリン分泌細胞MGN3-1を96ウェルプレートに 1×10^5 cells/well播種し、培地中で24時間培養した。培養後、細胞をDPBSで洗浄し、試験物質100 μ L (Buffer : 50 μ M sodium octanoate/DMEM) を添加した。なお、試験物質を添加しないBufferのみを対照 (control) とした。さらに4時間培養をした後に、培地を回収し遠心分離処理により上清 (supernatant) を得た。上清に1N HCl を10 μ L添加し、-80℃で保存をした。

[0046] 試料中のグレリン (アシル化グレリン) の濃度をELISA法 (Bertin Pharma 社製、Ghrelin (Acylated) EIA Kit A05117) により定量評価した。

[0047] 評価方法を図1に模式的に示す。

[0048] (試験物質 (ペプチド))

定法により合成したジペプチドSV、SL、SI、SM、SF、SW、SY、SS、ST、SN

、SK、SR及びSHを試験物質とした。

[0049] (統計解析)

試験により得られたデータを、試行数 n の平均 (Mean) と標準誤差 (Standard error of the mean、SEM) との和で表した。2群間の比較には t 検定を用いた。3群間以上の比較には、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Tukey-Kramer試験を行った。 $p < 0.05$ の場合 (図中、“*”) に、有意差ありと判定した。

[0050] <試験例>

試験例 1 : グレリン分泌活性の評価 (1)

試料ジペプチドについて、グレリン分泌細胞MGN3-1を用いて、グレリン分泌に与える影響を評価した。

[0051] 結果を表 1 に示す ($n=1$)。数値は、対照のグレリン濃度に対する比である。

[0052] [表1]

SV	1.69
SL	1.40
SI	1.45
SM	1.22
SF	1.60
SW	1.62
SY	1.29
SS	1.39
ST	1.37
SN	1.26
SK	1.33
SR	1.22
SH	1.03
Control	1.00

[0053] 試験したジペプチドは、グレリン分泌量を増加させる、グレリン分泌を促

進する活性を有することが明らかとなった。

[0054] 試験例 2：グレリン分泌活性の評価（2）

（A）ジペプチドSV、SF及びSWについて、試行回数n=8として、グレリン分泌に与える影響を評価した。試験例 1 と同様の手順で試験を行った。

[0055] 結果を図 2 A に示す。図中、横軸「Ghrelin (% of control)」は、対照（試験物質を添加しないBufferのみ）をMGN3-1に添加した場合のグレリン分泌量の測定値に対する割合（百分率）を示す。試験例 1 で得られた結果と同様に、ジペプチドSV、SF及びSWはグレリン分泌を促進する活性を有することが明らかとなった。

[0056] （B）試料中のジペプチドSVの濃度を100 μ M、300 μ M及び1000 μ Mとして、試験例 1 と同様の手順で試験を行った（n=4）。

[0057] 結果を図 2 B に示す。ジペプチドSVは、用量（濃度）に依存してグレリン分泌を促進する活性を有することが明らかとなった。

[0058] （C）アミノ酸S、V及びSとVとの混合物（S+V）について、試験例 1 と同様の手順で試験を行った（n=4）。

[0059] 結果を図 2 C に示す。ジペプチドSVはグレリン分泌を促進する活性を有するが、構成アミノ酸であるS及びV単独、並びに、SとVとの混合物はグレリン分泌を促進する活性を有さなかった。

[0060] 試験例 3：作用機構

グレリンの分泌促進に至る作用機構を検証した。ペプチドSVが、細胞内のcAMP濃度及び細胞内カルシウムイオン濃度（ $[Ca^{2+}]$ ）に与える影響を評価した。

[0061] 細胞内cAMP濃度の測定については、グレリン分泌細胞MGN3-1を96ウェルプレートに1 x 10⁵ cells/well播種し、培地中で24時間培養した。培養後、細胞をDPBSで洗浄し、試験物質45 μ L（Buffer：0.5 mM IBMXを含むKrebs-Ringer-HEPES buffer）を添加した。さらに30分間培養をした後に、細胞内のcAMPをHitHunter cAMP Assay for small molecules（DiscoverX社製）を用いて定量した。

[0062] 細胞内カルシウムイオン濃度については、文献：Kagebayashi T et.al, Mol. Nutr. Food Res. 2012 Sep;56(9):1456-63に記載の方法に従って測定した。

[0063] 結果を図3に示す。ノルアドレナリン（NA）は、細胞内のcAMP濃度及び細胞内カルシウムイオン濃度の増加を介して、グレリンの分泌を促進することが知られている。Gs型の三量体Gタンパク質の関与が知られている。これに対して、ジペプチドSVは、細胞内のcAMP濃度及び細胞内カルシウムイオン濃度の変化を介さずにグレリンの分泌を促進するため、既知の経路とは異なる経路を介していると考えられる。

[0064] 試験例4：In vivoでの摂食促進作用とグレリン分泌作用

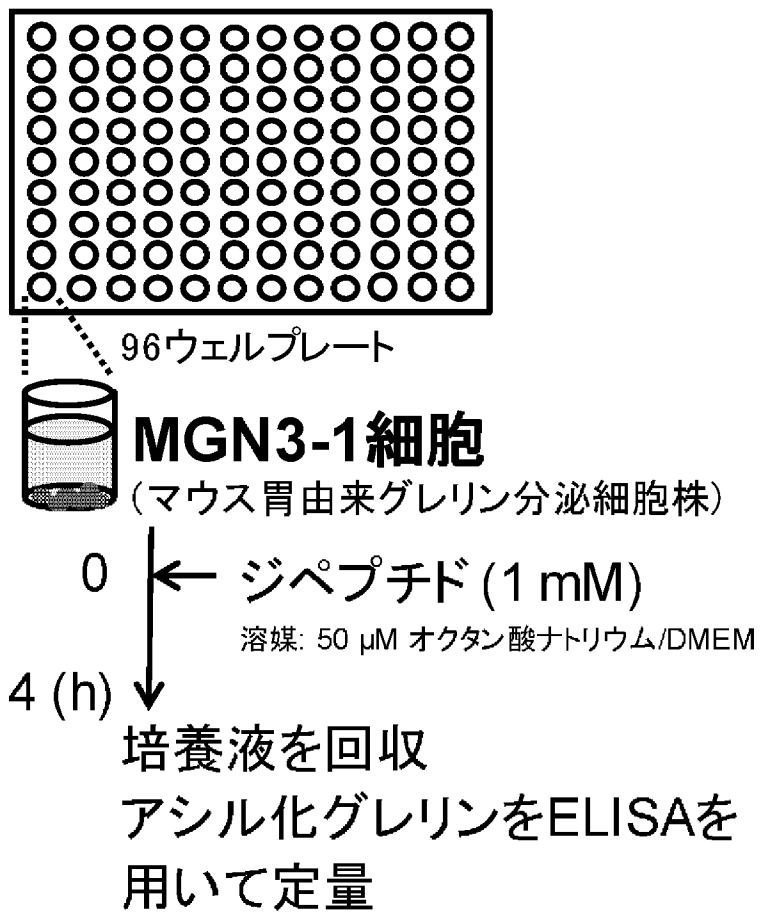
マウス（ddYマウス、雄、34～42g）にジペプチドSVを投与して、摂食量および血中グレリン濃度への影響を評価した。具体的には、生理食塩水に溶解したジペプチドSVをマウスに0.3 mg/kg又は1.0 mg/kgの投与量で経口投与（p.o.）した。生理食塩水のみを投与したマウスを対照とした。摂食量（Food intake）については、SV投与後に予め秤量した固形飼料（CE-2，日本クレア製）を与え、経時的（投与後0分後、20分後、60分後、120分後及び240分後）に飼料重量を測定することにより摂食量を算出した。血中グレリン濃度（Plasma acetylated ghrelin）については、SV投与後に飼料を除去し、2時間（120分）後に血清中のグレリン濃度を測定した。

[0065] 結果を図4 A及び4 Bに示す。ジペプチドSVは、経口投与によりマウスの摂食および血中グレリン濃度を増加させることが明らかとなった。

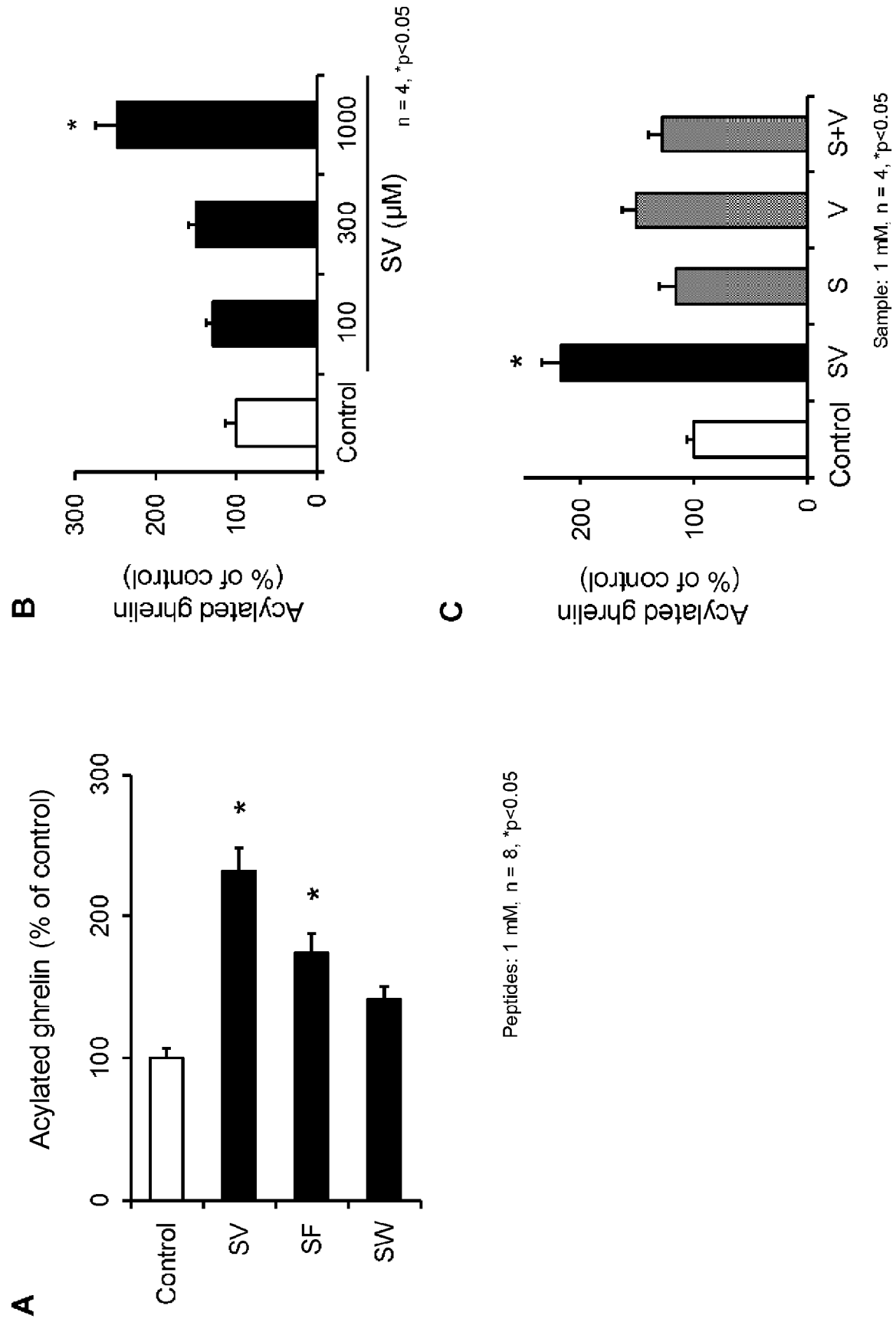
請求の範囲

- [請求項1] アミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドを有効成分とするグレリン分泌促進剤。
- [請求項2] アミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドを有効成分とする、食欲を促進するための医薬組成物。
- [請求項3] アミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドを有効成分とする、成長ホルモンの分泌促進のための医薬組成物。
- [請求項4] 有効量のアミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドを必要とする患者または予備群に投与する工程を含む、食欲を促進及び／または成長ホルモンの分泌を促進する方法。
- [請求項5] 食欲を促進及び／または成長ホルモンの分泌を促進するための、アミノ酸配列SX（Xは、V、L、I、M、F、W、Y、S、T、N、K、R及びHから選択されるアミノ酸残基を示す。）を有する2～20アミノ酸長のペプチドの使用。

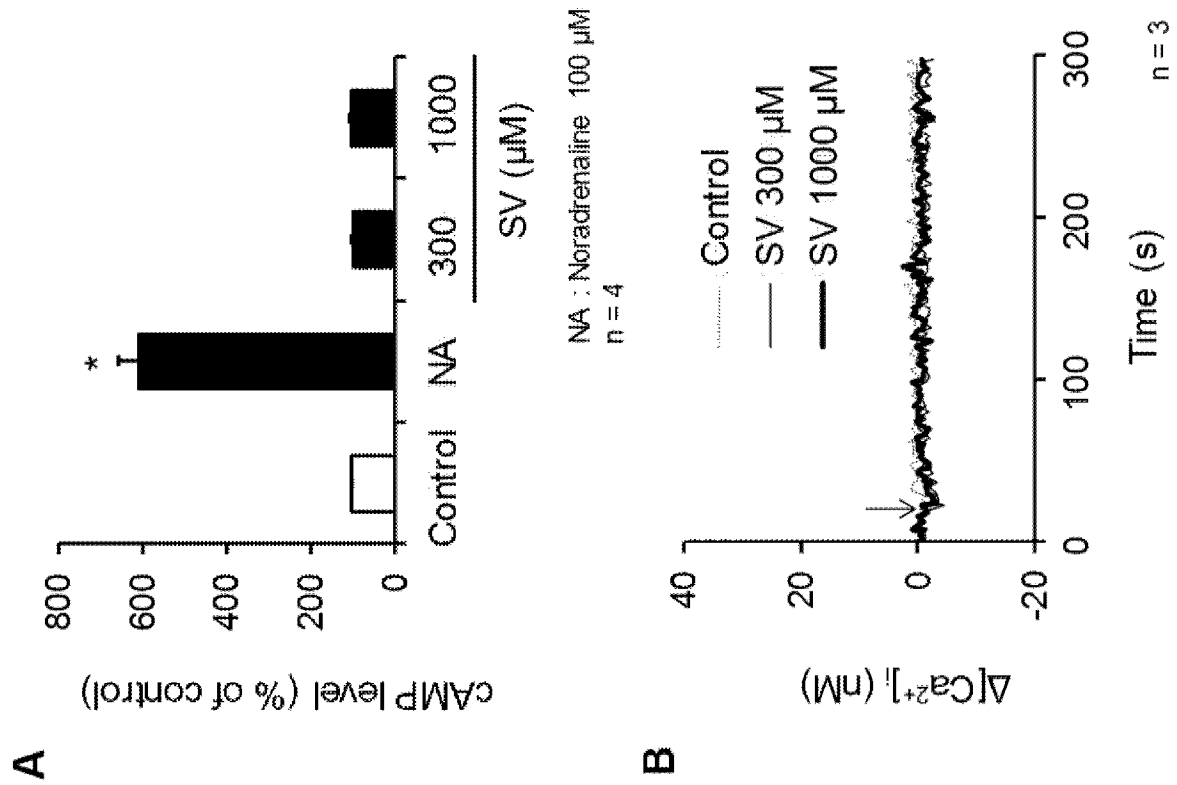
[図1]



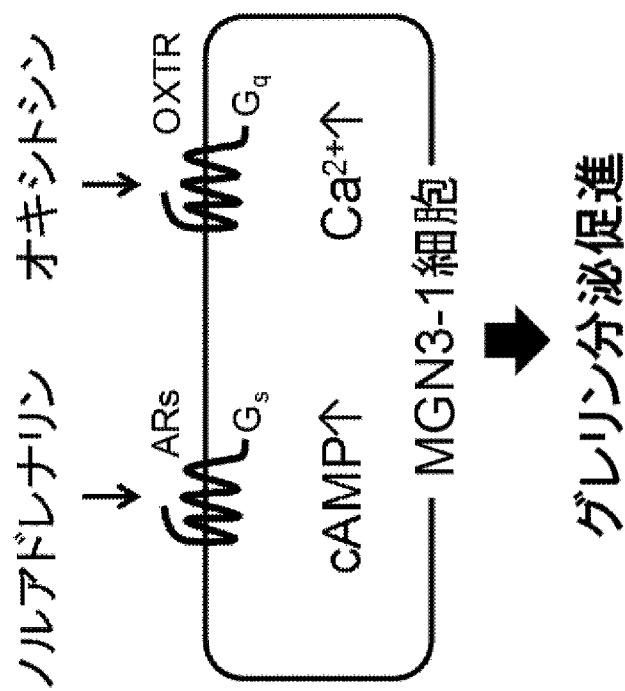
[図2]



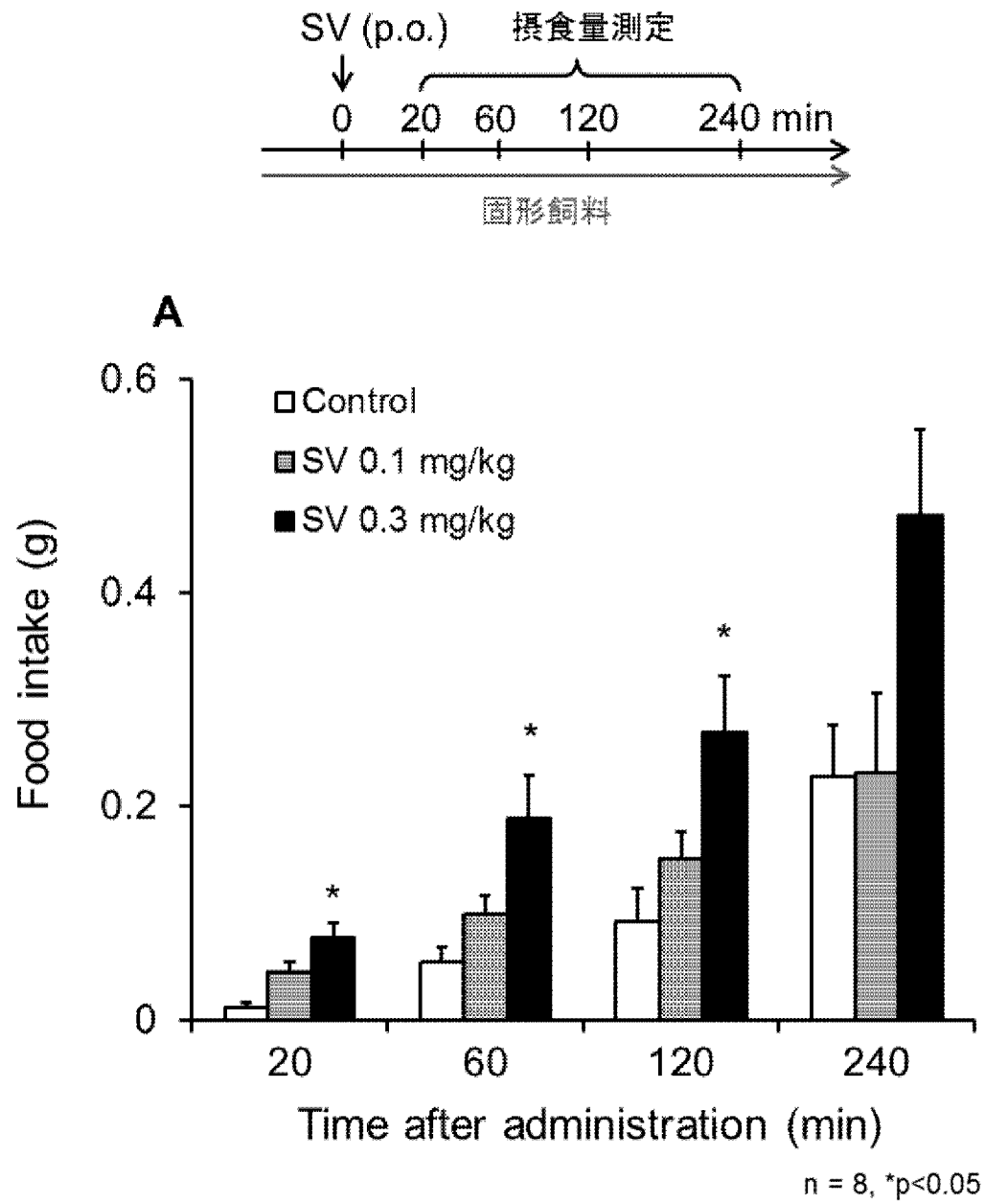
[図3]



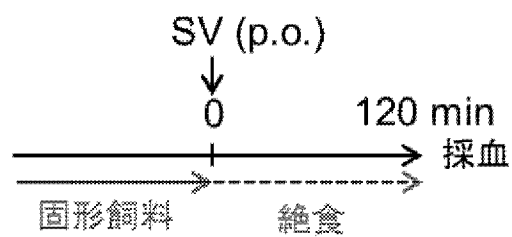
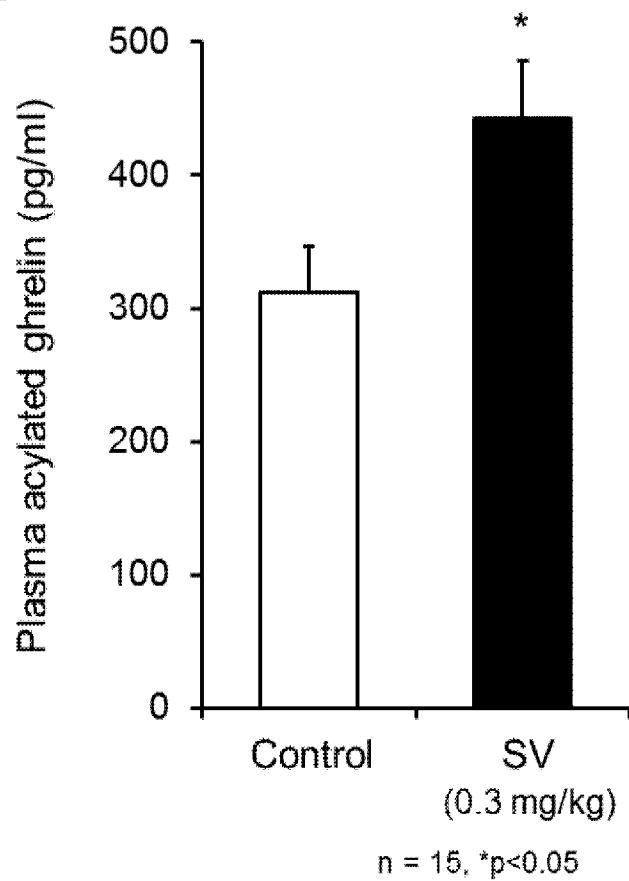
既知のグレリン分泌促進経路



[図4A]



[図4B]

**B**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/007659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61P 1/14 (2006.01)i; A61P 43/00 (2006.01)i; A61K 38/03 (2006.01)i; A61K 38/05 (2006.01)i

FI: A61K38/05 ZNA; A61P43/00 111; A61P1/14; A61K38/03

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)

A61P1/14; A61P43/00; A61K38/03; A61K38/05

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020

Registered utility model specifications of Japan 1996-2020

Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY (STN);

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed; 医中誌 WEB (Ichushi WEB)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/150548 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 08.09.2017 (2017-09-08) claims 1, 4-10, test examples 2-6, fig. 2-6	1-5
X	NAKATO, J. et al., "Soy-ghretropin, a novel ghrelin-releasing peptide derived from soy protein", FEBS Letters, 2016, vol. 590, no. 16, pp. 2681-2689, doi:10.1002/1873-3468.12306, ISSN 0014-5793, p. 2681, abstract, fig. 4-6	1-5
X	JP 2005-82489 A (KYOTO UNIVERSITY) 31.03.2005 (2005-03-31) claims 1-3, 6-12, paragraphs [0007]-[0008], [0036]-[0042], fig. 4, 5	1-5



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

18 May 2020 (18.05.2020)

Date of mailing of the international search report

26 May 2020 (26.05.2020)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/007659

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OHINATA, K. et al., "[Trp3, Arg5]-ghrelin(1-5) stimulates growth hormone secretion and food intake via growth hormone secretagogue (GHS) receptor", Peptides, 2006, vol. 27, no. 7, pp. 1632-1637, ISSN 0196-9781, p. 1632, abstract, fig. 2-5	1-5
X	BEDNAREK, MA et al., "Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a", Journal of Medicinal Chemistry, 2000, vol. 43, no. 23, pp. 4370-4376, ISSN 0022-2623, p. 4370, abstract, table 4	3-5
P,X	NAKATO, J. et al., "Comprehensive analysis of a dipeptide library to identify ghrelin release-modulating peptides", FEES Letters, September 2019, vol. 593, no. 18, pp. 2637-2645, doi:10.1002/1873-3468.13522, ISSN 0014-5793, p. 2637, abstract, fig. 1, 4, 5	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/007659

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017/150548 A1	08 Sep. 2017	(Family: none)	
JP 2005-82489 A	31 Mar. 2005	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61P 1/14(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61K 38/03(2006.01)i; A61K 38/05(2006.01)i FI: A61K38/05 ZNA; A61P43/00 111; A61P1/14; A61K38/03														
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）） A61P1/14; A61P43/00; A61K38/03; A61K38/05														
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2020年	日本国実用新案登録公報	1996-2020年	日本国登録実用新案公報	1994-2020年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2020年													
日本国実用新案登録公報	1996-2020年													
日本国登録実用新案公報	1994-2020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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY (STN); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN); PubMed; 医中誌WEB (Ichushi WEB)														
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	WO 2017/150548 A1 (国立大学法人京都大学) 08.09.2017 (2017-09-08) 請求項1,4-10, 試験例2-6, 図2-6	1-5												
X	NAKATO J et al., Soy-ghrelin, a novel ghrelin-releasing peptide derived from soy protein, FEBS Letters, 2016, Vol. 590, No. 16, p. 2681-2689, doi: 10.1002/1873-3468.12306, ISSN 0014-5793 p. 2681 要約, Fig. 4-6	1-5												
X	JP 2005-82489 A (国立大学法人京都大学) 31.03.2005 (2005-03-31) 請求項1-3,6-12, 段落 [0007]-[0008], [0036]-[0042], 図4,5	1-5												
X	OHINATA K et al., [Trp3, Arg5]-ghrelin(1-5) stimulates growth hormone secretion and food intake via growth hormone secretagogue (GHS) receptor, Peptides, 2006, Vol. 27, No. 7, p. 1632-1637, ISSN 0196-9781 p. 1632 ABSTRACT, Fig. 2-5	1-5												
☒ 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。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"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	"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	"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	"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）	"&" 同一パテントファミリー文献	"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	
* 引用文献のカテゴリー	"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"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													
"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	"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													
"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）	"&" 同一パテントファミリー文献													
"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														
国際調査を完了した日 18.05.2020	国際調査報告の発送日 26.05.2020													
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 春田 由香 4U 4147 電話番号 03-3581-1101 内線 3439													

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	BEDNAREK MA et al., Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a, Journal of Medicinal Chemistry, 2000, Vol. 43, No. 23, p. 4370-4376, ISSN 0022-2623 p. 4370 要約, Table 4	3-5
P, X	NAKATO J et al., Comprehensive analysis of a dipeptide library to identify ghrelin release-modulating peptides, FEBS Letters, 2019.09, Vol. 593, No.18, p. 2637-2645, doi: 10.1002/1873-3468.13522, ISSN 0014-5793 p. 2637 要約, Fig. 1,4,5	1-5

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/007659

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2017/150548	A1	08.09.2017	(ファミリーなし)	
JP	2005-82489	A	31.03.2005	(ファミリーなし)	