

(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3月3日(03.03.2011)

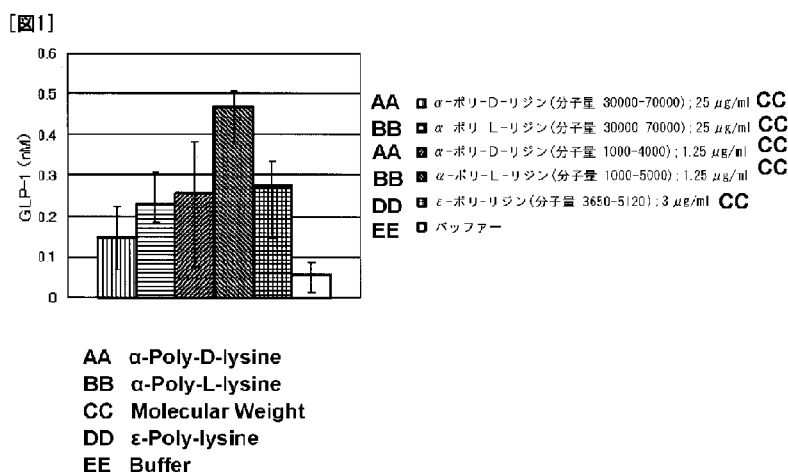
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2011/024763 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 38/00 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)  
A61P 3/04 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/064195
- (22) 国際出願日: 2010年8月23日(23.08.2010)
- (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 2009-193368 2009年8月24日(24.08.2009) JP  
61/250,998 2009年10月13日(13.10.2009) US
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 原 博(HARA, Hiroshi). 比良 徹(HIRA, Tohru). 江藤 譲(ETO, Yuzuru) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 安田 礼子(YASUDA, Reiko) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (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, 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))

(54) Title: PROPHYLAXIS, THERAPEUTIC AGENT, OR ANOREXICANT FOR DIABETES

(54) 発明の名称: 糖尿病の予防もしくは治療剤、または、摂食抑制剤



(57) Abstract: A polypeptide comprising a substantially basic amino acid such as a polylysine is used as an active component in a prophylaxis, a therapeutic agent, or an anorexiant for diabetes.

(57) 要約: ポリリジン等の実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチドを糖尿病の予防若しくは治療剤、または摂食抑制剤の有効成分とする。

WO 2011/024763 A1

## 明 細 書

### 発明の名称：糖尿病の予防もしくは治療剤、または、摂食抑制剤 技術分野

[0001] 本発明は、カルシウム受容体活性化作用を有するポリペプチドを有効成分として含有する糖尿病の予防もしくは治療剤、または摂食抑制剤に関する。

### 背景技術

[0002] 近代社会においては、高脂肪食や高カロリー食の浸透により、肥満、高血圧、耐糖能異常、中性脂肪が4大疾患といわれている。その結果、心疾患や動脈硬化の発症率が高くなり、生命の危機に及ぶことから、有効な糖尿病又は肥満病の予防又は治療方法の開発が望まれている。

[0003] 体内のエネルギー代謝は、膵臓 $\beta$ 細胞で作られるインシュリンによってコントロールされている。インシュリンは末梢組織や細胞に作用し、血中から糖分の取込を促進することで血糖値のコントロールに重要な役割を果たしている。しかし、継続的に高カロリー食を摂取し、細胞のインシュリン感受性が低下すると、血糖値の上昇とインシュリンの過剰分泌が同時に進む。その結果、膵臓の $\beta$ 細胞が疲弊して機能不全となり、糖尿病、肥満症が発症する。

[0004] インシュリンの分泌は種々のホルモンにより調節されており、特に、消化管で産生、分泌されるグルカゴン様ペプチド-1（Glucagon-like peptide-1、GLP-1）が重要と考えられている。GLP-1は分子量約4000のペプチドホルモンであり、主に小腸のL細胞で産生される。GLP-1は、 $\beta$ 細胞のインシュリン分泌促進作用、胃蠕動運動と消化吸収の抑制作用、食欲、過食抑制作用、等を有し、糖尿病や肥満症の治療や予防に有効であることが明らかにされてきた（非特許文献8、9）。糖尿病や肥満症ではGLP-1分泌能が低下していることが知られており、これら病態においてGLP-1分泌を促進することができれば、糖尿病や肥満症の治療と予防につながるものと期待される。L細胞におけるGLP-1の分泌は、糖質、脂質、蛋

白質など様々な栄養分の摂取により促進されるが、特定の成分のペプチド等の化合物をGLP-1分泌促進剤として活用した例は稀である。

[0005] コレシストキニン（CCK）は、分子量約1000～4000のペプチドホルモンであり、主に十二指腸と空腸のI細胞で産生され、胆汁の分泌と膵臓消化液の分泌を促進する。CCKの生理作用で特に注目されるのは、食品の胃排出を抑制する作用、膵酵素分泌を促進する作用、満腹感により摂食を抑制する作用、である（非特許文献1、2）。更に、血糖調節ホルモンであるインスリンの分泌を促進する作用も知られている（非特許文献3、4）。CCKは、このような作用を有することから、糖尿病や肥満症や膵炎等の生活習慣病の治療または予防に有望と考えられている。

[0006] GLP-1およびCCKはペプチドであることから、治療に応用するには、GLP-1およびCCKを注射等で血中投与することになるが、毎日の投与の煩雑さと多額の費用から現実的とはいえない。一方で、食品成分のタンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂肪酸等によって、小腸粘膜にあるGLP-1又はCCK産生細胞から内因性のGLP-1又はCCKが分泌される機構を利用することが考えられる。すなわち、GLP-1又はCCK分泌促進作用を持った化合物や食品素材の開発が望まれていた。

[0007] ところで、カルシウム受容体は、カルシウムセンシング受容体（Calcium Sensing Receptor:CaSR）とも呼ばれ、7回膜貫通型受容体（G蛋白質結合型受容体）のクラスCに分類されるアミノ酸1078個からなる受容体である。このカルシウム受容体は、1993年に遺伝子のクローニングが報告され（非特許文献5）、カルシウム等で活性化されると細胞内カルシウム上昇等を介して様々な細胞応答を引き起こすことが知られている。ヒトカルシウム受容体の遺伝子配列はGenBank Accession No NM\_000388として登録されており、動物間でよく保存されている。

[0008] カルシウム受容体活性化剤としてはカルシウムの他に、ガドリニウムなどのカチオン、ポリアルギニン、ポリリジンなどの塩基性アミノ酸からなるポリペプチド、スペルミンなどのポリアミン、プロタミンなどのタンパク質、

フェニルアラニンなどのアミノ酸、などが報告されている（非特許文献6）。

[0009] 非特許文献7には、低分子ペプチドであるグルタチオン（ $\gamma$ -Glu-Cys-Gly）がカルシウム受容体活性化剤であること（すなわち、活性化作用を有すること）が報告されているが、グルタチオンが糖尿病の予防又は治療、および食欲調節に有効である可能性は示されていない。

[0010] 一方、特許文献1には、特定の配列を有するジペプチドもしくはトリペプチドがカルシウム受容体活性化剤として有効であることが示されており、種々の疾患治療薬の可能性を記述しているが、糖尿病や食欲調節に有効であることは示されていない。

また、特許文献2には、 $\epsilon$ -ポリリジンが体重増加抑制作用を有することが示されているが、糖尿病や食欲調節に有効であることは示されていない。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0011] 特許文献1：国際公開第W02007/055388号パンフレット

特許文献2：特開2007-39428号公報

### 非特許文献

[0012] 非特許文献1：Science, vol.247, p.1589-1591, 1990

非特許文献2：American Journal of Physiology, vol.276, R1701-R1709, 1999

非特許文献3：Diabetes, vol.36, p.1212-1215, 1987

非特許文献4：Journal of Clinical Endocrinological Metabolism, vol.65, p.395-401, 1987

非特許文献5：Nature, 1993, Vol.366(6455), p.575-580

非特許文献6：Cell Calcium, 2004, Vol.35(3), p.209-216

非特許文献7：J. Biol. Chem, 2006, Vol.281(13), p.8864-8870

非特許文献8：Regulatory Peptides, 2008, vol.151, p.123-129

非特許文献9：Endocrinology, 2005, vol.146, p.3748-3756

## 発明の概要

[0013] 前記のとおり、生活習慣病、特に、糖尿病および肥満症が大きな社会問題となっている。これらの生活習慣病を予防または治療するためには、生体への安全性の高い医薬品、あるいは食品や食品に準ずる有用物質の開発が必要である。本発明は、消化管組織におけるGLP-1、CCK、又はその両方の分泌を促進する、生体への安全性が高い糖尿病の予防若しくは治療剤、または、摂食抑制剤を提供することを課題とする。

[0014] 本発明者は、カルシウム受容体の活性化剤について研究を行っていたところ、カルシウム受容体活性化剤に腸管由来のSTC-1細胞からのCCK分泌、およびGLUTag細胞からのGLP-1分泌を促進する働きがあることを見出した。又、カルシウム受容体活性化剤に、盲腸由来のNCI-H716細胞のGLP-1の分泌を促進する働きがあることを見出した。本発明者らは、更に研究を重ねた結果、カルシウム受容体活性化作用を有する塩基性アミノ酸ポリペプチド、すなわち、実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチドが、盲腸由来細胞のGLP-1の分泌を促進すること、および経口糖負荷試験において血糖上昇を抑制すること、特に、ポリリジンがそれらの作用に優れることから、ポリリジンなどの実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチドが、糖尿病の予防又は治療剤、および摂食抑制剤となりうることを見出し、本発明を完成させた。

[0015] すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチド（塩基性アミノ酸ポリペプチド）を有効成分として含有する、糖尿病の予防もしくは治療剤、又は、摂食抑制剤。

(2) 前記ポリペプチドがポリリジンである、前記糖尿病の予防若しくは治療剤、又は摂食抑制剤。

(3) 前記ポリリジンが、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上である、前記糖尿病の予防若しくは治療剤、又は摂食抑

制剤。

(4) 前記ポリリジンの平均分子量が650～300000である、前記糖尿病の予防若しくは治療剤、又は、摂食抑制剤。

[0016] (5) 実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチド（塩基性アミノ酸ポリペプチド）を0.000001質量%以上含む、糖尿病の予防若しくは治療、または摂食抑制のための食品。

(6) 前記ポリペプチドがポリリジンである、前記糖尿病の予防若しくは治療、又は摂食抑制のための食品。

(7) 前記ポリリジンが、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上である、前記糖尿病の予防若しくは治療、又は摂食抑制のための食品。

(8) 前記ポリリジンの平均分子量が650～300000である、前記糖尿病の予防若しくは治療、又は摂食抑制のための食品。

[0017] (9) ポリリジンからなる糖尿病の予防又は治療活性付与剤。

(10) 前記ポリリジンが、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上である、前記糖尿病の予防又は治療活性付与剤。

(11) 前記ポリリジンの平均分子量が650～300000である、前記糖尿病の予防又は治療活性付与剤。

[0018] (12) 前記糖尿病の予防又は治療活性付与剤を、該活性付与剤の含有量が糖尿病の予防又は治療のための食品に対して1質量ppb～99.9質量%となるように、食品に添加することを特徴とする、糖尿病の予防又は治療のための食品の製造方法。

(13) 前記糖尿病の予防又は治療活性付与剤を、該活性付与剤の含有量が糖尿病の予防又は治療剤に対して1質量ppb～99.9質量%となるように、医薬用担体に添加することを特徴とする、糖尿病の予防又は治療剤の製造方法。

[0019] (14) 実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチド（塩基性アミノ酸ポリペプチド）を、糖尿病の予防又は治療が必要な対象に投与することを含む、糖尿病の予防又は治療方法。

(15) 前記ポリペプチドがポリリジンである、前記糖尿病の予防又は治療方法。

(16) 前記ポリリジンが、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上である、前記糖尿病の予防又は治療方法。

(17) 前記ポリリジンの平均分子量が650～300000である、前記糖尿病の予防又は治療方法。

[0020] (18) 糖尿病の予防又は治療のために用いられる実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチド（塩基性アミノ酸ポリペプチド）。

(19) 糖尿病の予防又は治療のために用いられるポリリジン。

(20) 糖尿病の予防又は治療のために用いられる $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上の化合物。

(21) 糖尿病の予防又は治療のために用いられる平均分子量が650～300000であるポリリジン。

[0021] (22) 摂食抑制のために用いられる実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチド（塩基性アミノ酸ポリペプチド）。

(23) 糖尿病の予防もしくは治療、または摂食抑制のために用いられるポリリジン。

(24) 糖尿病の予防もしくは治療、または摂食抑制のために用いられる $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上の化合物。

(25) 糖尿病の予防もしくは治療、または摂食抑制のために用いられる平均分子量が650～300000であるポリリジン。

## 図面の簡単な説明

[0022] [図1]ポリリジンによる、NCI-H716細胞のGLP-1分泌促進を示す図。図中、左からそれぞれ、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン（分子量30000-70000）、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン（分子量30000-70000）、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン（分子量1000-4000）、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン（分子量1000-5000）、 $\epsilon$ -ポリリジン（分子量3650-5120）、HepesバッファーによるGLP-1分泌を示す。サンプル濃度は、ウェル中の終濃度を示す。図2～4においても同様。

[図2]経口糖負荷試験におけるポリリジン経口投与後の血糖値を示す図。値は各群4個体の平均値と標準誤差を示す。\*はコントロール群に対して有意差があることを示す。（ $P < 0.05$ , Student t-test）

[図3]  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly、 $\gamma$ -Glu-Val-Gly、及びシナカルセットによる、STC-1細胞のCCK分泌促進を示す図。図中、Blk、 $\gamma$ EVG、GSH、CCTは、ブランク（対照）、 $\gamma$ -Glu-Val-Gly、及び $\gamma$ -Glu-Cys-Gly、シナカルセットを示す。

[図4]  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly、及びシナカルセットによる、GLUTag細胞のGLP-1分泌促進を示す図。

[図5]  $\gamma$ -Glu-Cys、及びプロタミンによる、GLUTag細胞のGLP-1分泌促進を示す図。図中、 $\gamma$ ECは $\gamma$ -Glu-Cysを示す。

[図6]  $\gamma$ -Glu-Cys（EC）によるラット腸管からのGLP-1分泌の変化を示す図。値は平均値と標準誤差（ $n = 8$ ）。+は0分に対して統計的に有意差あり、\*は水投与群に対して有意差有り（Tukey's test、 $P < 0.05$ ）

[図7]ラットにおける $\gamma$ -Glu-Cys（EC）による血糖上昇抑制作用を示す図。値は平均値と標準誤差（ $n = 8$ ）。\*はグルコース溶液投与群に対して有意差有り（Student t-test、 $P < 0.05$ ）

### 発明を実施するための形態

[0023] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の糖尿病の予防若しくは治療剤、または摂食抑制剤は、塩基性アミノ酸ポリペプチド、すなわち、実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチ

ドを有効成分として含む。

[0024] < 1 > 塩基性アミノ酸ポリペプチド

本発明において、塩基性アミノ酸ポリペプチド、すなわち、実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチドとは、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン、オルニチン）が少なくとも5残基連結したポリペプチドをいう（以下、「塩基性アミノ酸ポリペプチド」という。）。加えて、本発明において、塩基性アミノ酸ポリペプチドとは、塩基性アミノ酸を、モノマー数割合で95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは実質的に100%含むポリペプチドである。

塩基性アミノ酸ポリペプチドは、カルシウム受容体活性化作用を有することが知られており、又、例えば後述のオリゴペプチド等についての検出方法等と同様にして該作用を確認することができる。

[0025] 後述の参考例に示すように、本発明者らは、カルシウム受容体活性化作用を有する物質が、共通して腸管由来のSTC-1細胞からのCCK分泌およびGLUTag細胞からのGLP-1分泌を促進する働きを示すことを見出している。更に、後述する実施例1、2の結果に基づいて、本発明の塩基性アミノ酸ポリペプチドが糖尿病の予防若しくは治療に有効であり、さらに摂食抑制剤としても有用であることが理解できる。

[0026] 塩基性アミノ酸ポリペプチドの大きさは連結する塩基性アミノ酸の数により異なるが、平均分子量650～300000が好ましく、特に1000～70000が好ましい。

塩基性アミノ酸ポリペプチドとして、ポリリジン、ポリアルギニン等が好ましく挙げられる。

このうち、特にポリリジンが好ましい。ここでポリリジンとは、リジンが少なくとも5残基連結したポリマーであり、リジンをモノマー数割合で95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは100%含むポリペプチドである（このモノマー連結個数及びモノマー数割合についての定義は、ポリアルギニン及びポリオルニチンの場合にも適用される）。ポリリジンを

構成するリジンはL体であってもD体であってもよく、ポリリジンには、L-リジンが連結したポリ-L-リジン、D-リジンが連結したポリ-D-リジンが含まれる。また、ポリリジンには、リジンの $\alpha$ アミノ基とカルボキシル基がペプチド結合した $\alpha$ -ポリリジン、リジンの $\varepsilon$ アミノ基とカルボキシル基がペプチド結合した $\varepsilon$ -ポリリジンが含まれる。本発明のポリリジンには、例えば、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\varepsilon$ -ポリ-L-リジン、 $\varepsilon$ -ポリ-D-リジンなどが含まれる。特に $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\varepsilon$ -ポリ-L-リジンが好ましい。

ポリリジンの大きさは連結するリジンの数により異なるが、平均分子量650～300000が好ましく、特に1000～70000が好ましい。特に、 $\alpha$ -ポリリジンの場合は、平均分子量1000～5000が好ましく、 $\varepsilon$ -ポリリジンの場合は3500～5500が好ましい。中でも、平均分子量1000～5000の $\alpha$ -ポリ-L-リジンが好ましく挙げられる。

ポリリジンはカルシウム受容体活性化作用を有し、糖尿病の予防又は治療剤として用いるのに特に好適であり、本発明には例えば以下の態様も好ましいものとして挙げられる：

$\alpha$ -ポリリジンを有効成分として含有する糖尿病の予防又は治療剤、  
 $\varepsilon$ -ポリリジンを有効成分として含有する糖尿病の予防又は治療剤、  
 $\alpha$ -ポリリジンからなる糖尿病の予防又は治療活性付与剤、  
 $\varepsilon$ -ポリリジンからなる糖尿病の予防又は治療活性付与剤、  
ポリリジンからなる糖尿病の予防又は治療剤（該予防又は治療剤において、有効成分として含まれるのはポリリジンのみである）。

又、ポリリジンはカルシウム受容体活性化作用を有し、肥満病の予防又は治療剤として用いるのにも好適である。また、ポリリジンは後述の実施例で確認したように、GLP-1分泌促進ならびにCCK分泌促進作用を有し、胃排出を抑制することから、摂食抑制剤、満腹感増強剤として用いることも好ましい。本発明には例えば以下の態様も好ましいものとして挙げられる：

ポリリジンを対象に投与することを含む、体重管理又は減量（weight-loss

)の方法、

ポリリジンを0.000001質量%以上より好ましくは0.00001質量%以上、特に好ましくは0.1質量%以上かつ95重量%以下含む体重管理または減量のための食品、

ポリリジンからなる肥満症の予防又は治療剤（該予防又は治療剤において、有効成分として含まれるのはポリリジンのみである）。

[0027] 上記ポリペプチドは、市販品を用いることが可能である。また、上記ポリペプチドは、（１）化学的に合成する方法、又は（２）酵素的な反応により合成する方法等の公知手法を適宜用いることによって取得することができる。本発明において用いられる上記ポリペプチドは、含まれるアミノ酸の残基数が比較的短い場合は特に、化学的に合成する方法が簡便である。化学的に合成する場合は、ポリペプチドをペプチド合成機を用いて合成あるいは半合成することにより行うことができる。化学的に合成する方法としては、例えばペプチド固相合成法が挙げられる。そのようにして合成したペプチドは通常の手段、例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相高速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によって精製することができる。このようなペプチド固相合成法、およびそれに続くペプチド精製はこの技術分野においてよく知られたものである。

[0028] また、本発明において用いられるペプチドを、酵素的な反応により生産することも出来る。例えば、国際公開パンフレットW02004/011653号に記載の方法を用いることが出来る。即ち、一方のアミノ酸又はジペプチドのカルボキシル末端をエステル化又はアミド化したアミノ酸又はジペプチドと、アミノ基がフリーの状態であるアミノ酸（例えばカルボキシル基が保護されたアミノ酸）とを、ペプチド生成酵素の存在下において反応せしめ、生成したポリペプチドを精製することによっても生産することもできる。ペプチド生成酵素としては、ペプチドを生成する能力を有する微生物（例えば放線菌）の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、又は、該微生物の菌体処理物、又は、該微生物に由来するペプチド生成酵素が挙げられる。

[0029] 尚、上述した様な酵素的な方法や化学的合成法以外にも本発明において用いられるポリペプチドが、野菜や果物等の植物、菌類等に存在する場合がある。ポリペプチドが天然に存在する場合には、これらから抽出して用いてもかまわない。上記ポリペプチドは、単離して用いる必要はなく、ポリペプチドを多く含んでいる画分を用いてもかまわない。

[0030] 本発明において用いられるポリペプチドは塩の形態をも包含する。本発明のポリペプチドが塩の形態を成し得る場合、その塩は薬理学的に許容されるものであればよく、例えば、アミノ酸のカルボキシル基等の酸性基に対しては、アンモニウム塩、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属との塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、トリエチルアミン、エタノールアミン、モルホリン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、ジシクロヘキシルアミン等の有機アミンとの塩、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸との塩を挙げることができる。また、アミノ酸の塩基性基に対しては、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、臭化水素酸などの無機酸との塩、酢酸、クエン酸、安息香酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、コハク酸、タンニン酸、酪酸、ヒベンズ酸、パモ酸、エナント酸、デカン酸、テオクル酸、サリチル酸、乳酸、シュウ酸、マンデル酸、リンゴ酸等の有機カルボン酸との塩、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機スルホン酸との塩を挙げることができる。

[0031] <2>糖尿病若しくは肥満病の予防若しくは治療剤、又は、摂食抑制剤

上記塩基性アミノ酸ポリペプチドは、糖尿病又は肥満病の予防又は治療剤、または摂食抑制剤の有効成分として使用される。本発明の糖尿病若しくは肥満病の予防若しくは治療剤、または、摂食抑制剤において、塩基性アミノ酸ポリペプチドは単独で用いてもよく、また任意の2種又は3種以上を混合して用いることも可能である。本発明の糖尿病若しくは肥満病の予防若しくは治療剤、または摂食抑制剤の形態としては、医薬、医薬部外品、食品等が挙げられる。

[0032] 本発明の糖尿病若しくは肥満病の予防若しくは治療剤、又は、摂食抑制剤

の適用方法としては、特に制限されず、経口投与あるいは注射等を利用した侵襲的投与あるいは座薬投与あるいは経皮投与を採用することが出来る。有効成分を経口、注射などの投与方法に適した固体または液体の医薬用担体と混合して、慣用の医薬製剤の形態で投与することが出来る。本発明においては、特に経口投与が好ましい。このような製剤としては例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などの固形剤の形態、溶液剤、懸濁剤、乳剤などの液剤の形態、凍結乾燥剤などの形態が挙げられる。これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。

[0033] 上記医薬用担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ゼラチン、アルブミン、アミノ酸、水、生理食塩水などが挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤などの慣用の添加剤を適宜添加することもできる。

[0034] 本発明の糖尿病若しくは肥満病の予防若しくは治療剤、または、摂食抑制剤の投与又は摂取量は、糖尿病又は肥満病の治療や予防、摂食抑制に有効な量であればよく、患者の年齢、性別、体重、症状などに応じて適宜調節されるが、例えば、経口投与の場合、本発明に用いられる塩基性アミノ酸ポリペプチドの投与量として、1回の投与において1kg体重あたり、0.01g～10gが好ましく、1kg体重あたり、0.1g～1gがより好ましい。投与回数は特に制限されず、1日あたり1回～数回投与することができる。

[0035] 本発明の糖尿病又は肥満病の予防又は治療剤、摂食抑制剤中の塩基性アミノ酸ポリペプチドの含有量は、上記投与量に適したものであれば特に制限されず、好ましくは乾燥重量当り0.00001質量%～99.9質量%、より好ましくは0.00001質量%～99.9質量%、特に好ましくは0.0001質量%～99.9質量%である。又、0.00001質量%～10質量%も好ましい。

[0036] 本発明の糖尿病又は肥満病の予防又は治療剤、摂食抑制剤はまた、糖尿病

又は肥満病の治療や予防、摂食抑制、満腹感持続のための食品、例えば、容器や包装に糖尿病又は肥満病の予防効果又は治療効果、さらには摂食抑制効果や満腹感持続効果がある旨を表示した食品として用いることもできる。食品としては、塩基性アミノ酸ポリペプチドを0.000001質量%以上、より好ましくは0.000001質量%～99.9質量%、更には0.000001質量%～99.9質量%含むことが好ましい。特に好ましくは、塩基性アミノ酸ポリペプチドを0.000001質量%以上98質量%以下含むことが好ましく、又、0.000001質量%～10質量%も好ましい。食品の形態としては特に制限されず、塩基性アミノ酸ポリペプチドを配合する以外は、通常の食品と同様の材料を用いて、同様の製法で製造することができる。食品としては、例えば、調味料、飲料、健康食品、農産物加工品、水産物加工品、畜産物加工品等が挙げられる。

[0037] 本発明の糖尿病又は肥満病の予防又は治療剤、摂食抑制剤は、塩基性アミノ酸ポリペプチドに加えて、他のカルシウム受容体活性化剤を1種または2種以上含むものであってもよい。

[0038] 本明細書中において「カルシウム受容体活性化剤」とは、カルシウム受容体に結合し、カルシウム受容体を活性化し、カルシウム受容体を発現している細胞の機能を調節するものをいう。また、本明細書中において「カルシウム受容体活性化」とは、カルシウム受容体にリガンドが結合し、グアニンヌクレオチド結合タンパク質を活性化して、シグナルを伝達することを意味する。また、カルシウム受容体がこのシグナルを伝達することを「カルシウム受容体活性」という。

[0039] 上記他のカルシウム受容体活性化剤としては、カルシウム受容体活性化作用を有するオリゴペプチド及び低分子化合物が挙げられる。

カルシウム受容体活性化作用を有するオリゴペプチド及び低分子化合物は、例えば、カルシウム受容体と被検物質とを反応させ、カルシウム受容体活性を検出することにより取得することができる。このようにして得られるオリゴペプチド及び低分子化合物について、GLP-1又はCCKの分泌促進

作用、あるいは糖尿病の予防又は治療効果を有することを確認することが好ましい。

[0040] 以下に、カルシウム受容体活性化作用を有するオリゴペプチド及び低分子化合物をスクリーニングする方法を具体的に示すが、これらのステップに限定されるものではない。

1) カルシウム受容体活性を測定するためのカルシウム受容体活性測定系に被検物質を添加して、カルシウム受容体活性を測定する。

2) 被験物質を添加したときのカルシウム受容体活性と、被験物質を添加しなかったときのカルシウム受容体活性を比較する。

3) 被験物質を添加したときに高いカルシウム受容体活性を示す被験物質を選択する。

[0041] カルシウム受容体活性の測定は、例えば、カルシウム受容体を発現する細胞を用いた測定系を用いて行われる。上記細胞はカルシウム受容体を内在的に発現している細胞であっても、外来のカルシウム受容体遺伝子が導入された組み換え細胞であってもよい。上記カルシウム受容体活性測定系は上記カルシウム受容体を発現する細胞に、カルシウム受容体に特異的な細胞外リガンド（活性化剤）を加えたときに、活性化剤とカルシウム受容体との結合（反応）を検出することができるか、又は、活性化剤とカルシウム受容体との結合（反応）に応答して細胞内に検出可能なシグナルを伝達するものであれば、特に制限なく使用することができる。被検物質との反応によりカルシウム受容体活性が検出された場合、当該被検物質はカルシウム受容体刺激活性を有し、糖尿病又は肥満病の予防又は治療効果や摂食抑制効果を有する物質であることが判別される。

[0042] 一方、カルシウム受容体活性化剤の持つ、糖尿病又は肥満病の予防又は治療効果や摂食抑制効果は、例えば、実施例、参考例に記載したG L P - 1又はC C Kの分泌促進作用を調べる試験等により確認することができる。又、糖尿病の予防又は治療効果は、実施例に記載したグルコース負荷下の血糖上昇抑制効果を調べる試験等により確認することもでき得る。また、被験物質

として用いるオリゴペプチド及び低分子化合物は特に制限はないが、オリゴペプチドとしては2～10のアミノ酸残基からなるペプチド又はその誘導体が好ましく、2又は3個のアミノ酸残基からなるペプチド又はその誘導体により好ましい。また、オリゴペプチドのN末端側のアミノ酸残基は、 $\gamma$ -グルタミン酸であることが好ましい。低分子化合物としてはシナカルセット ((R)-N-(3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)propyl)-1-(1-naphthyl)ethylamine) 及びその類縁化合物が好ましい。シナカルセットの類縁化合物については後述する。

[0043] 上記カルシウム受容体は、その由来は特に制限されず、上記ヒトのカルシウム受容体のみならず、マウス、ラット、イヌなど含めた動物由来のカルシウム受容体が挙げられる。具体的には、上記カルシウム受容体としては、Gen Bank Accession No NM\_00388で登録されているヒトカルシウム受容体遺伝子によってコードされるヒトカルシウム受容体が好ましく例示できる。尚、カルシウム受容体は、上記配列の遺伝子によってコードされるタンパク質に制限されず、カルシウム受容体機能を有するタンパク質をコードする限りにおいて、上記配列と60%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有する遺伝子によってコードされるタンパク質であってもよい。GPRC6A受容体や5.24受容体もまたカルシウム受容体のサブタイプとして知られており、本発明において利用可能である。なお、カルシウム受容体機能はこれらの遺伝子を細胞に発現させ、カルシウム添加時の電流の変化や細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定することによって調べることができる。

[0044] 上述の如く、カルシウム受容体活性は、カルシウム受容体又はその断片を発現した生きた細胞、カルシウム受容体又はその断片を発現した細胞膜、カルシウム受容体又はその断片のタンパク質を含むインビトロの系などを利用して確認することが出来る。

以下に生きた細胞を用いた一例を示すが、この一例に限定されるものではない。

- [0045] カルシウム受容体は、アフリカツメガエル卵母細胞やハムスター卵巢細胞やヒト胎児腎臓細胞等の培養細胞に発現させる。これは外来遺伝子を保持するプラスミドにカルシウム受容体遺伝子をクローニングしたものを、プラスミドの状態もしくはそれを鋳型にしたcRNAを導入することで可能となる。反応の検出には電気生理学的手法や細胞内カルシウム上昇の蛍光指示試薬を用いることができる。
- [0046] カルシウム受容体の発現は、初めにカルシウムもしくは特異的活性化剤による応答で確認する。5 mM程度の濃度のカルシウムに対して、細胞内電流が見られた卵母細胞もしくは蛍光指示試薬の蛍光が見られた培養細胞を使用する。カルシウムの濃度を変えて濃度依存性を測定する。次に、ペプチド等の被験物質を1  $\mu$ M～1 mM程度に調製し、卵母細胞もしくは培養細胞に添加することで、上記ペプチド等の被験物質のカルシウム受容体活性を測定する。
- [0047] 本発明に使用するカルシウム受容体活性を有するオリゴペプチドとしては、例えば、 $\gamma$ -Glu-X-Gly (Xはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 $\gamma$ -Glu-Val-Y (Yはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 $\gamma$ -Glu-Ala、 $\gamma$ -Glu-Gly、 $\gamma$ -Glu-Cys、 $\gamma$ -Glu-Met、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Val、 $\gamma$ -Glu-Orn、Asp-Gly、Cys-Gly、Cys-Met、Glu-Cys、Gly-Cys、Leu-Asp、 $\gamma$ -Glu-Met (O)、 $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val、 $\gamma$ -Glu-Val-NH<sub>2</sub>、 $\gamma$ -Glu-Val-ol、 $\gamma$ -Glu-Ser、 $\gamma$ -Glu-Tau、 $\gamma$ -Glu-Cys (S-Me) (O)、 $\gamma$ -Glu-Leu、 $\gamma$ -Glu-Ile、 $\gamma$ -Glu-t-Leuおよび $\gamma$ -Glu-Cys (S-Me) (以下、本発明のペプチド等ともいう) が挙げられる。
- [0048] 前記化合物のうち、好ましい化合物は、前記XがCys、Cys (SNO)、Cys (S-allyl)、Gly、Cys (S-Me)、AbuまたはSerであり、前記YがGly、Val、Glu、Lys、Phe、Se

r、Pro、Arg、Asp、Met、Thr、His、Orn、Asn、CysまたはGlnである化合物である。

[0049] 尚、本明細書中において各オリゴペプチドを構成するアミノ酸は、特に断わらない限りいずれもL-体である。ここで、アミノ酸とは、Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Pro, Hypなどの中性アミノ酸、Asp, Gluなどの酸性アミノ酸、Lys, Arg, Hisなどの塩基性アミノ酸、Phe, Tyr, Trpなどの芳香族アミノ酸や、ホモセリン、シトルリン、オルニチン、 $\alpha$ -アミノ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、タウリンなども含有する。

[0050] 本明細書においてアミノ基残基の略号は以下のアミノ酸を意味する。

- (1) Gly : グリシン
- (2) Ala : アラニン
- (3) Val : バリン
- (4) Leu : ロイシン
- (5) Ile : イソロイシン
- (6) Met : メチオニン
- (7) Phe : フェニルアラニン
- (8) Tyr : チロシン
- (9) Trp : トリプトファン
- (10) His : ヒスチジン
- (11) Lys : リジン
- (12) Arg : アルギニン
- (13) Ser : セリン
- (14) Thr : トレオニン
- (15) Asp : アスパラギン酸
- (16) Glu : グルタミン酸
- (17) Asn : アスパラギン
- (18) Gln : グルタミン

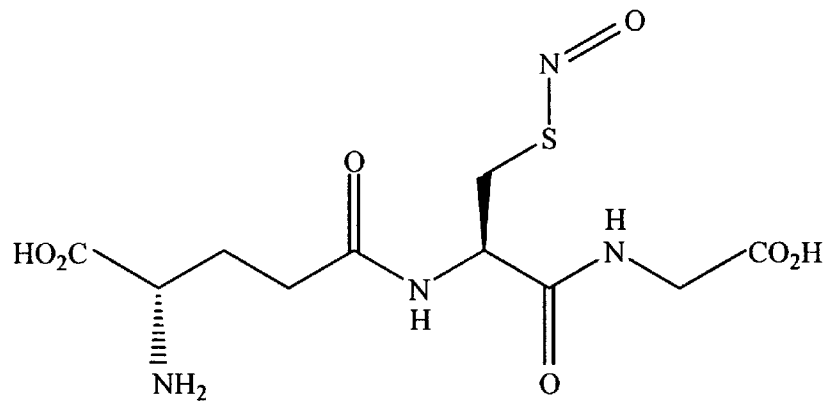
- (19) C y s : システイン
- (20) P r o : プロリン
- (21) O r n : オルニチン
- (22) S a r : サルコシン
- (23) C i t : シトルリン
- (24) N - V a l : ノルバリン
- (25) N - L e u : ノルロイシン
- (26) A b u :  $\alpha$ -アミノ酪酸
- (27) T a u : タウリン
- (28) H y p : ヒドロキシプロリン
- (29) t - L e u : t e r t - ロイシン

[0051] また、アミノ酸誘導体とは、上記アミノ酸の各種誘導体であって、例えば、特殊アミノ酸や非天然アミノ酸、アミノアルコール、或いは末端カルボニル基やアミノ基、システインのチオール基などのアミノ酸側鎖が各種置換基により置換したものが挙げられる。置換基としては、アルキル基、アシル基、水酸基、アミノ基、アルキルアミノ基、ニトロ基、スルフォニル基や各種保護基などが挙げられ、例えば、A r g (NO<sub>2</sub>) : N- $\gamma$ -ニトロアルギニン、C y s (SNO) : S-ニトロシステイン、C y s (S-Me) : S-メチルシステイン、C y s (S-a l l y l) : S-アリルシステイン、V a l -NH<sub>2</sub> : バリンアミド、V a l -o l : バリノール (2-アミノ-3-メチルー1-ブタノール) などが含まれる。

[0052] 尚、上記  $\gamma$ -G l u -C y s (SNO) -G l y (S-ニトロソグルタチオン (GNSO)) は下記の構造式を有するものであり、上記  $\gamma$ -G l u -M e t (O) および  $\gamma$ -G l u -C y s (S-Me) (O) 式中の (O) はスルフォキシド構造であることを意味する。 $\gamma$ -G l u の ( $\gamma$ ) とは、グルタミン酸の  $\gamma$  位のカルボキシ基を介して他のアミノ酸が結合していることを意味する。

[0053]

[化1]



S-ニトロソグルタチオン(GNSO)

[0054]  $\gamma$ -Glu-X-Gly (Xはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 $\gamma$ -Glu-Val-Y (Yはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 $\gamma$ -Glu-Ala、 $\gamma$ -Glu-Gly、 $\gamma$ -Glu-Cys、 $\gamma$ -Glu-Met、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-Val、 $\gamma$ -Glu-Orn、Asp-Gly、Cys-Gly、Cys-Met、Glu-Cys、Gly-Cys、Leu-Asp、 $\gamma$ -Glu-Met(O)、 $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val、 $\gamma$ -Glu-Val-NH<sub>2</sub>、 $\gamma$ -Glu-Val-ol、 $\gamma$ -Glu-Ser、 $\gamma$ -Glu-Tau、 $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)(O)、 $\gamma$ -Glu-Leu、 $\gamma$ -Glu-Ile、 $\gamma$ -Glu-t-Leuおよび $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)がカルシウム受容体を活性化することが示された(国際公開第W02007/055388号パンフレット、国際公開第W02007/055393号パンフレット、国際公開第W02008/139945号パンフレット、国際公開第W02008/139946号パンフレット、国際公開第W02008/139947号パンフレット)。そして、実施例、参考例に示すように、カルシウム受容体活性化作用を有する複数種の化合物がGLP-1又はCCKの分泌促進作用を有することが確認された。したがって、 $\gamma$ -Glu-X-Gly (Xはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 $\gamma$ -Glu-Val-Y (Yはアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 $\gamma$ -Glu-Ala、 $\gamma$ -Glu-Gly、 $\gamma$ -Glu-Cys、 $\gamma$ -Glu-Met、 $\gamma$ -Glu-Thr、 $\gamma$ -Glu-

Val、 $\gamma$ -Glu-Orn、Asp-Gly、Cys-Gly、Cys-Met、Glu-Cys、Gly-Cys、Leu-Asp、 $\gamma$ -Glu-Met(O)、 $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val、 $\gamma$ -Glu-Val-NH<sub>2</sub>、 $\gamma$ -Glu-Val-ol、 $\gamma$ -Glu-Ser、 $\gamma$ -Glu-Tau、 $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)(O)、 $\gamma$ -Glu-Leu、 $\gamma$ -Glu-Ile、 $\gamma$ -Glu-t-Leuおよび $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)は、本発明の糖尿病又は肥満病の予防又は治療剤、摂食抑制剤の他の有効成分として、上記塩基性アミノ酸ポリペプチドと組み合わせて用いることができる。本発明において、これらのオリゴペプチド又は低分子化合物は単独で用いてもよく、また任意の2種又は3種以上を混合して用いることもできる。

[0055] 上記の化合物のうち、特に好ましい化合物は、 $\gamma$ -Glu-Val-Gly、 $\gamma$ -Glu-Cys-Gly及びシナカルセットである。又、 $\gamma$ -Glu-Cysも特に好ましい。

$\gamma$ -Glu-Val-Gly、 $\gamma$ -Glu-Cys-Gly及びシナカルセットは肥満病の予防又は治療剤の成分として用いるのに特に好適であり、 $\gamma$ -Glu-Cys、 $\gamma$ -Glu-Cys-Gly及びシナカルセットは、糖尿病の予防又は治療剤の成分として用いるのに特に好適である。

上記オリゴペプチドは、市販品を用いることが可能である。また、上記オリゴペプチドは、(1)化学的に合成する方法、又は(2)酵素的な反応により合成する方法等の公知手法を適宜用いることによって取得することができる。オリゴペプチドに含まれるアミノ酸の残基数が2～3残基と特に短い場合には、化学的に合成する方法が簡便である。化学的に合成する場合は、オリゴペプチドをペプチド合成機を用いて合成あるいは半合成することにより行うことができる。化学的に合成する方法としては、例えばペプチド固相合成法が挙げられる。そのようにして合成したオリゴペプチドは通常の手段、例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相高速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によって精製することができる。こ

のようなペプチド固相合成法、およびそれに続くペプチド精製はこの技術分野においてよく知られたものである。

[0056] また、前記オリゴペプチドを、酵素的な反応により生産することも出来る。例えば、国際公開W02004/011653号パンフレットに記載の方法を用いることが出来る。即ち、一方のアミノ酸又はジペプチドのカルボキシル末端をエステル化又はアミド化したアミノ酸又はジペプチドと、アミノ基がフリーの状態であるアミノ酸（例えばカルボキシル基が保護されたアミノ酸）とを、ペプチド生成酵素の存在下において反応せしめ、生成したジペプチド又はトリペプチドを精製することによっても生産することもできる。ペプチド生成酵素としては、ペプチドを生成する能力を有する微生物（例えば放線菌）の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、又は、該微生物の菌体処理物、又は、該微生物に由来するペプチド生成酵素が挙げられる。

[0057] 尚、上述した様な酵素的な方法や化学的合成法以外にも本発明において用いられ得るオリゴペプチドが、野菜や果物等の植物、酵母等の微生物、酵母エキス等に存在する場合がある。天然に存在する場合には、これらから抽出して用いてもかまわない。

[0058] また、オリゴペプチドは、単離して用いる必要はなく、オリゴペプチドを多く含んでいる画分を用いてもかまわない。例えば、グルタチオン（ $\gamma$ -Glu-Cys-Gly）を含む酵母エキス又はその分画物が挙げられる。酵母エキス等の調製は、通常の酵母エキスの調製と同様に行えばよい。酵母エキスは、酵母菌体を熱水抽出したものを処理したものでもよいし、酵母菌体を消化したものを処理したものでもよい。酵母エキスの分画物としては、グルタチオンを含む限り、特に制限されない。又、例えば、 $\gamma$ -Glu-Cysを含む酵母エキス又はその分画物も挙げられる。酵母エキス等の調製は、通常の酵母エキスの調製と同様に行えばよい。酵母エキスは、酵母菌体を熱水抽出したものを処理したものでもよいし、酵母菌体を消化したものを処理したものでもよい。酵母エキスの分画物としては、 $\gamma$ -Glu-Cysを含む限り、特に制限されない。

[0059] 本発明において用いられ得るオリゴペプチドは塩の形態をも包含する。オリゴペプチドが塩の形態を成し得る場合、その塩は薬理学的に許容されるものであればよく、例えば、ペプチド中のカルボキシル基等の酸性基に対しては、アンモニウム塩、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属との塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、トリエチルアミン、エタノールアミン、モルホリン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、ジシクロヘキシルアミン等の有機アミンとの塩、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸との塩を挙げることができる。ペプチド中に塩基性基が存在する場合の塩基性基に対しては、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、臭化水素酸などの無機酸との塩、酢酸、クエン酸、安息香酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、コハク酸、タンニン酸、酪酸、ヒベンズ酸、パモ酸、エナント酸、デカン酸、テオクル酸、サリチル酸、乳酸、シュウ酸、マンデル酸、リンゴ酸等の有機カルボン酸との塩、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機スルホン酸との塩を挙げることができる。

[0060] 本発明に用いられ得るカルシウム受容体活性を有する低分子化合物としては、シナカルセット、及びシナカルセット類縁化合物が挙げられる。シナカルセット類縁化合物としては、米国特許第6211244号、第6213146号、第5688938号、第5763569号、第5858684号、第5962314号、第6001884号、第6011068号、第6031003号、国際公開W01995/011221号、W01996/012687号、W02002/059102号等に記載された化合物が挙げられる。なお、本発明において用いられ得る低分子化合物は、上記ペプチドの場合と同様に、塩の形態をも包含する。

[0061] また、他のカルシウム受容体活性化剤として、カルシウム及びカドリニウムなどのカチオン、プトレッシン、スペルミン、スペルミジンなどのポリアミン、プロタミンなどのタンパク質、フェニルアラニンなどのアミノ酸なども挙げられる。本発明において、これらのカルシウム受容体活性化剤は単独で用いてもよく、また任意の2種又は3種以上を混合して用いることも可能である。これらのうち、カルシウム及びカドリニウムなどのカチオンが好ま

しく、カルシウムがより好ましい。すなわち、更に加えられる他のカルシウム受容体活性化剤の少なくとも１種はカチオンであることが好ましい。

[0062] 上記他のカルシウム受容体活性化剤が、前記実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチドと共存することによって、カルシウム受容体のより強い活性化が見られる。本発明の糖尿病又は肥満病の予防又は治療剤、摂食抑制剤における実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチドの合計含有量と他のカルシウム受容体活性化剤の合計含有量の割合は、カルシウム受容体のより強い活性化が可能である限り特に制限されないが、例えば、他のカルシウム受容体活性化剤の合計と、実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチド及び低分子化合物の合計の質量比が、１：１００～１００：１であることが好ましい。

[0063] < ３ > 糖尿病又は肥満病の予防又は治療活性付与剤

本発明の糖尿病又は肥満病の予防又は治療活性付与剤は、カルシウム受容体活性化作用を有するポリリジンからなる。該活性付与剤において、その有効成分として含まれるのはポリリジンのみである。使用するポリリジンの好ましい形態については、上述したとおりである。

本発明の活性付与剤の使用方法としては、特に制限されず、食品や医薬用担体等に添加して用いることができる。

本発明の活性付与剤の、食品や医薬用担体等に対する使用量は、糖尿病又は肥満病の予防又は治療活性の付与に有効な量であればよく、用途に応じて適宜調節される。

例えば、食品の場合、食品中に１質量ｐｐｂ～９９．９質量％、好ましくは１０質量ｐｐｂ～９９．９質量％、より好ましくは１０質量ｐｐｍ～１０質量％程度のポリリジンが含有されるように使用される。従って、本発明の活性付与剤の含有量が、糖尿病又は肥満病の予防又は治療のための食品（目的製造物）に対して１質量ｐｐｂ～９９．９質量％、好ましくは１０質量ｐｐｂ～９９．９質量％、より好ましくは１０質量ｐｐｍ～１０質量％程度となるように、該活性付与剤を食品に添加することで、糖尿病又は肥満病の予防又は治療のための食品を製造することができる。

又、医薬用担体の場合、例えば、予防又は治療剤中に1質量ppb～99.9質量%、好ましくは10質量ppb～99.9質量%、より好ましくは10質量ppm～10質量%程度のポリリジンが含有されるように使用される。従って、本発明の活性付与剤の含有量が、糖尿病又は肥満病の予防又は治療剤（目的製造物）に対して1質量ppb～99.9質量%、好ましくは10質量ppb～99.9質量%、より好ましくは10質量ppm～10質量%程度となるように、該活性付与剤を医薬用担体に添加することで、糖尿病又は肥満病の予防又は治療剤を製造することができる。

### 実施例

[0064] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0065] 〔実施例1〕 GLP-1分泌促進作用

ヒト盲腸由来のGLP-1産生細胞株NCI-H716 (ATCC No CCL-251) を、10% FBSを含むDMEM/HamF-12 mediumにて、37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。NCI-H716細胞をポリ-D-リジンコート96ウェルプレートに、100000 cells/wellで播種し、2日間培養した。サンプル添加前に、Hepesバッファー (20 mM Hepes, 146 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 5.5 mM D-glucose, 0.2% BSA, pH 7.4) にてウェルを洗浄し、各種ポリリジンを同バッファーに溶解したサンプル溶液を50 μl添加し、37℃にて60分間インキュベーションした。使用したポリリジンとその濃度は、α-ポリ-D-リジン (分子量30000-70000, Sigma-Aldrich、2008-2009年 カタログ番号P7886)、25 μg/ml; α-ポリ-D-リジン (分子量1000-4000, Sigma-Aldrich、2008-2009年 カタログ番号P0296)、1.25 μg/ml; α-ポリ-L-リジン (分子量30000-70000, Sigma-Aldrich、2008-2009年 カタログ番号P2636)、25 μg/ml; α-ポリ-L-リジン (分子量1000-5000, Sigma-Aldrich、2008-2009年 カタログ番号P0879)、1.25 μg/ml; ε-ポリリジン (25～35残基、分子量約3650-5120、商品名ガードエース GA-22; チッソ株式会社 (東京) 製)、3 μg/mlである。また、対照として、Hepesバッファーを用いた。

サンプル溶液を回収して、それを遠心分離（5000 x g、1分）にかけ、細胞を沈殿させて上清を得た。この上清をAmicon Microcon（Ultracel YM-10、分子量cut off=10000；Milipore社）を用いてろ過し、ろ液を回収した。ろ液中のGLP-1濃度をEnzyme immuno assay kit（矢内原研究所）によりGLP-1抗体を用いて測定した。

[0066] 結果を図1に示す。各種ポリリジンにGLP-1分泌促進作用が確認された。したがって、各種ポリリジンが、胃排出抑制作用を示し、摂食抑制剤、満腹感持続剤として有用であることが示された（Regulatory Peptides, 2009, vol. 156, p9-12; Gastroenterology, 2007, vol. 132, p. 2141-2157; Nature, 1996, vol. 379, p. 69-72, Am J Physiol Endocrinol Metab, 1997, vol. 273, p. 981-988; Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 1997, vol. 273, p. 920-927; J. Clin. Invest., 1998, vol. 101, p. 515-520）。

[0067] 〔実施例2〕ラットにおけるグルコース負荷試験

SD系雄ラット（7週齢）を予備飼育（3～4日）後に、一夜絶食し、経口グルコース負荷試験を行った。試料投与前の尾静脈血を採取し、試料〔グルコース溶液のみ（2g/kg体重）またはポリリジン（ $\alpha$ -poly-D-lysine、分子量30000-70000, Sigma-Aldrich、2008-2009年カタログ番号P7886）0.1～50mg/kg体重を含むグルコース溶液〕を、フィーディングチューブにより経口投与した。試料投与後、15、30、60、90、120分の尾静脈血を採取し、血漿中のグルコース濃度を市販のキット（和光純薬工業製）を用いて測定した。

血中グルコース濃度は、ポリリジン10mg/kg投与により、コントロール群（グルコース溶液のみ投与）よりも、グルコース投与後15分において低下傾向が見られ、ポリリジン50mg/kg投与群では、投与後15、30分においてコントロール群に比べ有意に低い値を示した（図2）。したがって、ラットにおいてポリリジンが血糖上昇抑制作用を有することが確認された。

[0068] 以下、カルシウム受容体活性化作用を有する物質が、共通して腸管由来の

S T C-1 細胞からの C C K 分泌、および G L U T a g 細胞からの G L P-1 分泌を促進する働きを示すこと、同物質が、血糖上昇抑制作用を示すことを、参考例により示す。

[0069] 〔製造例 1〕  $\gamma$ -G l u-V a l-G l y の合成

B o c-V a l-O H (8.69g, 40.0mmol) と G l y-O B z l · H C l (8.07g, 40.0 mmol) を塩化メチレン (100ml) に溶解し、溶液を 0°C に保った。トリエチルアミン (6.13ml, 44.0mmol)、H O B t (1-Hydroxybenzotriazole, 6.74 g, 44.0 mmol) 及び W S C · H C l (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride, 8.44g, 44.0mmol) を溶液に加え、室温で一夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチル (200ml) に溶解した。溶液を水 (50ml)、5%クエン酸水溶液 (50ml × 2 回)、飽和食塩水 (50ml)、5%炭酸水素ナトリウム水溶液 (50ml × 2 回)、飽和食塩水 (50ml) で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾過して除き、濾液を減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル-n-ヘキサンから再結晶して B o c-V a l-G l y-O B z l (13.2g, 36.2mmol) を白色結晶として得た。

[0070] B o c-V a l-G l y-O B z l (5.47g, 15.0mmol) を 4 N-H C l / ジオキサン溶液 (40ml) に加え、室温で 50 分攪拌した。ジオキサンを減圧濃縮で除き、残渣に n-ヘキサン (30ml) を加え減圧濃縮した。この操作を 3 回繰り返し、H-V a l-G l y-O B z l · H C l を定量的に得た。

[0071] 上記 H-V a l-G l y-O B z l · H C l 及び Z-G l u-O B z l (5.57g, 15.0mmol) を塩化メチレン (50ml) に溶解し、溶液を 0°C に保った。トリエチルアミン (2.30ml, 16.5mmol)、H O B t (1-Hydroxybenzotriazole, 2.53g, 16.5mmol) 及び W S C · H C l (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride, 3.16g, 16.5mmol) を溶液に加え、室温で二夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を加熱した酢酸エチル (1500ml) に溶解した。溶液を水 (200ml)、5%クエン酸水溶液 (200ml × 2 回)、飽和食塩水 (150ml)、5%炭酸水素ナトリウム水溶液 (200ml × 2 回)、飽和

食塩水（150ml）で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾過して除き、濾液を減圧濃縮した。析出した結晶を濾取、減圧乾燥してZ-Glu（Val-Gly-OBzl）-OBzl（6.51g, 10.5mmol）を白色結晶として得た。

[0072] 上記Z-Glu（Val-Gly-OBzl）-OBzl（6.20g, 10.03mmol）をエタノール（200ml）に懸濁し、10%パラジウム炭素（1.50g）を加え、水素雰囲気下に55℃で5時間還元反応を行った。この間、全量で100mlの水を徐々に加えた。触媒を桐山ロートで濾過して除き、濾液を半分に減圧濃縮した。反応液を更にメンブランフィルターで濾過し、濾液を減圧濃縮した。残渣を少量の水に溶かした後にエタノールを加えて結晶を析出させ、結晶を濾過して集め減圧乾燥してγ-Glu-Val-Glyの白色粉末（2.85g, 9.40mmol）を得た。

[0073] ESI-MS: (M+H)<sup>+</sup>=304.1

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 0.87 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.88 (3H, d, J=6.8 Hz), 1.99-2.09 (3H, m), 2.38-2.51 (2H, m), 3.72 (1H, t, J=6.35 Hz), 3.86 (1H, d, J=17.8 Hz), 3.80 (1H, d, J=17.8 Hz), 4.07 (1H, d, J=6.8 Hz)

[0074] [参考例1] CCK分泌促進作用

マウス小腸由来のCCK産生細胞株STC-1を10% FBSを含むDulbecco's modified Eagle's mediumにて、37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。STC-1細胞を48ウェルプレートに、サブコンフルエントになるまで2-3日間培養した。サンプル添加前に、HepesBバッファ（140 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 20 mM Hepes, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glucose, 0.1% BSA, pH 7.4）にてウェルを洗浄し、サンプルを同バッファに溶解したサンプル溶液を100 μl添加し、37℃にて60分間インキュベーションした。サンプルとして、γ-Glu-Cys-Gly（シグマアルドリッチジャパン株式会社）、及び、γ-Glu-Val-Gly、シナカルセットを用いた。また、対照として、Hepes Bバッファを用いた。上清を回収後、遠心分離（800 x g、5分、4℃）によ

り細胞を沈殿させ、その上清80  $\mu$ lを回収し、凍結保存した。

[0075] 前記上清をOASISカートリッジ(G18)にて前処理した後、上清中のCCK濃度を、市販のEnzyme immuno assay kit (Phoenix Pharmaceuticals)にて測定した。

[0076] 結果を図3に示す。 $\gamma$ -Glu-Cys-Gly、 $\gamma$ -Glu-Val-Gly、シナカルセットにCCK分泌促進作用が確認された。

[0077] [参考例2] GLP-1分泌促進作用(1)

マウス大腸由来のGLP-1産生細胞株GLUTagを、10% FBSを含むDulbecco's modified Eagle's mediumにて、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。GLUTag細胞を48ウェルプレートに、サブコンフルエントになるまで2-3日間培養した。サンプル添加前に、HepesBバッファー(140 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 20 mM Hepes, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glucose, 0.1% BSA, pH 7.4)にてウェルを洗浄し、サンプルを同バッファーに溶解したサンプル溶液を80  $\mu$ l添加し、37°Cにて60分間インキュベーションした。サンプルとして、 $\gamma$ -Glu-Cys-Gly、及びシナカルセットを用いた。また、対照として、HepesBバッファーを用いた。上清を回収後、遠心分離(800 x g、5分、4°C)により細胞を沈殿させ、その上清70  $\mu$ lを回収、凍結保存した。上清中のGLP-1濃度を市販のEnzyme immuno assay kit (矢内原研究所)にて測定した。

[0078] 結果を図4に示す。 $\gamma$ -Glu-Cys-Gly、シナカルセットにGLP-1分泌促進作用が確認された。

[0079] [参考例3] GLP-1分泌促進作用(2)

参考例2と同様にGLP-1産生細胞株GLUTagを用いてGLP-1分泌促進作用を調べた。サンプルとして、 $\gamma$ -Glu-Cys、及びプロタミンを用いた。

結果を図5に示す。 $\gamma$ -Glu-Cys、プロタミンにGLP-1分泌促進作用が確認された。

[0080] [参考例4] ラットにおけるGLP-1分泌試験

SD系雄ラット（8週齢）を予備飼育後、一夜絶食しケタミン・キシラジン麻酔下で開腹した。GLP-1産生細胞は主に回腸部位に分布することから、回腸結紮ループ（30cm）を作成後、回腸腸管膜静脈にカテーテルを留置し、このカテーテルより0分時の採血（0 time）を行った。回腸結紮ループ内へ試料（2mL脱イオン水、 $\gamma$ -Glu-Cys 20mg/脱塩水2mL）を投与し、30、60、90、120分後にそれぞれ採血を行い、血漿中のGLP-1濃度をEnzyme immuno assay kit（矢内原研究所製）にて測定した。

結果を図6に示す。 $\gamma$ -Glu-Cysを投与したラットにおいて、水投与群よりも有意に高い血中GLP-1濃度の上昇が認められたことから、 $\gamma$ -Glu-Cysはラットに対するGLP-1分泌促進活性を有することが確認された。

[0081] 〔参考例5〕ラットにおけるグルコース負荷試験

SD系雄ラット（7週齢）を予備飼育（3～4日）後に、一夜絶食し、経口グルコース負荷試験を行った。試料投与前の尾静脈血を採取し、試料〔グルコース溶液のみ（2g/kg体重）/  $\gamma$ -Glu-Cys（160mg/kg体重）を含むグルコース溶液〕を、フィーディングチューブにより経口投与した。試料投与後、15、30、60、90、120分の尾静脈血を採取し、血漿中のグルコース濃度を市販のキット（和光純薬工業製）を用いて測定した。

結果を図7に示す。血中グルコース濃度は、 $\gamma$ -Glu-Cysを投与したラットにおいて、グルコース投与後15、30分後においてグルコース溶液のみを投与した群よりも有意に低い値を示したことから、 $\gamma$ -Glu-Cysが血糖上昇抑制作用を有することが確認された。GLP-1分泌促進活性を有するカルシウム活性化剤が血糖上昇抑制作用を有することが理解される。

### 産業上の利用可能性

[0082] 本発明により、生体への安全性が高い糖尿病の予防又は治療剤が提供され

る。又、本発明の摂食抑制剤は、例えば、肥満症の予防又は治療に有用である。

## 請求の範囲

- [請求項1] 実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチドを有効成分として含有する、糖尿病の予防若しくは治療剤、又は摂食抑制剤。
- [請求項2] 前記ポリペプチドがポリリジンである、請求項1に記載の糖尿病の予防若しくは治療剤、又は摂食抑制剤。
- [請求項3] 前記ポリリジンが、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上である、請求項2に記載の糖尿病の予防若しくは治療剤、又は摂食抑制剤。
- [請求項4] 前記ポリリジンの平均分子量が650～300000である、請求項2又は3に記載の糖尿病の予防若しくは治療剤、又は、摂食抑制剤。
- [請求項5] 実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチドを0.000001質量%以上含む、糖尿病予防若しくは治療、または摂食抑制のための食品。
- [請求項6] 前記ポリペプチドがポリリジンである、請求項5に記載の糖尿病の予防若しくは治療、又は摂食抑制のための食品。
- [請求項7] 前記ポリリジンが、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上である、請求項6に記載の糖尿病の予防若しくは治療、又は、摂食抑制のための食品。
- [請求項8] 前記ポリリジンの平均分子量が650～300000である、請求項6又は7に記載の糖尿病の予防若しくは治療、又は、摂食抑制のための食品。
- [請求項9] ポリリジンからなる糖尿病の予防又は治療活性付与剤。
- [請求項10] 前記ポリリジンが、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上である、請求項9に記載の糖尿病の予防

又は治療活性付与剤。

[請求項11] 前記ポリリジンの平均分子量が650～300000である、請求項9又は10に記載の糖尿病の予防又は治療活性付与剤。

[請求項12] 請求項9～11のいずれか一項に記載の糖尿病の予防又は治療活性付与剤を、該予防又は治療活性付与剤の含有量が糖尿病の予防又は治療のための食品に対して1質量ppb～99.9質量%となるように、食品に添加することを特徴とする、糖尿病の予防又は治療のための食品の製造方法。

[請求項13] 請求項9～11のいずれか一項に記載の糖尿病の予防又は治療活性付与剤を、該予防又は治療活性付与剤の含有量が糖尿病の予防又は治療剤に対して1質量ppb～99.9質量%となるように、医薬用担体に添加することを特徴とする、糖尿病の予防又は治療剤の製造方法。

[請求項14] 実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチドを、糖尿病の予防又は治療が必要な対象に投与することを含む、糖尿病の予防又は治療方法。

[請求項15] 前記ポリペプチドがポリリジンである、請求項14に記載の方法。

[請求項16] 前記ポリリジンが、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上である、請求項15に記載の方法。

[請求項17] 前記ポリリジンの平均分子量が650～300000である、請求項15に記載の方法。

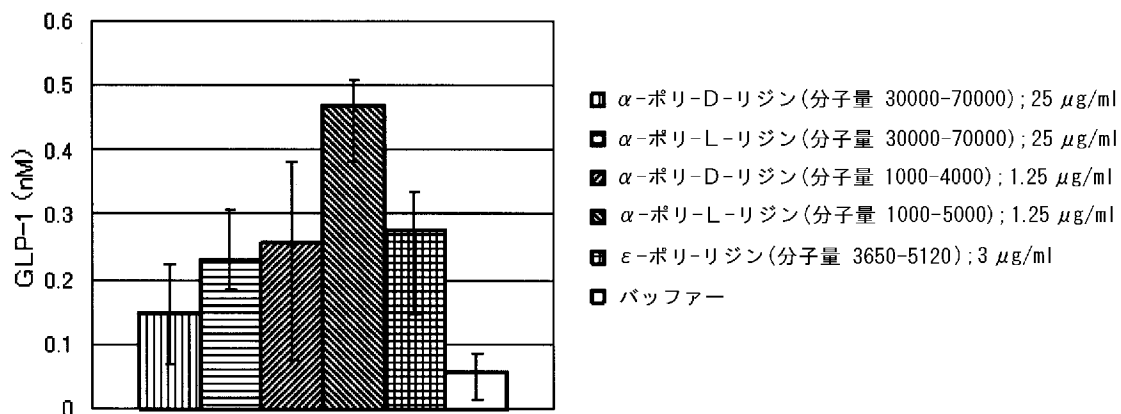
[請求項18] 糖尿病の予防又は治療のために用いられる実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチド。

[請求項19] 糖尿病の予防又は治療のために用いられるポリリジン。

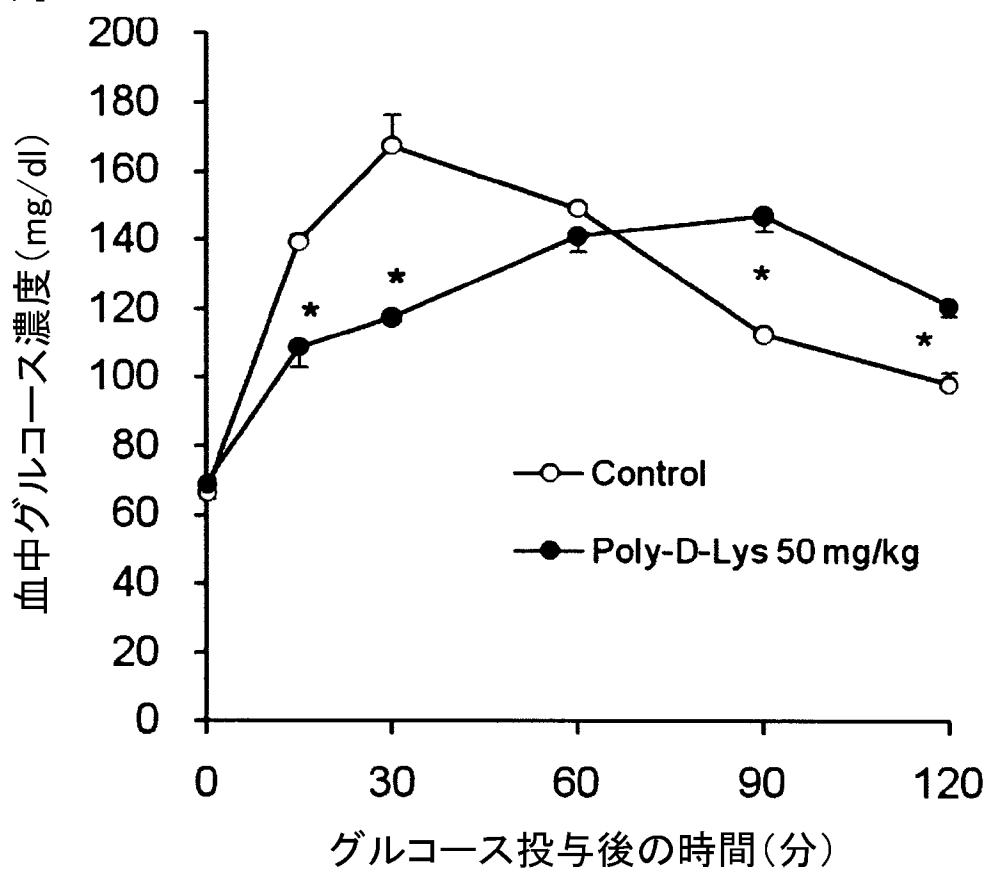
[請求項20] 糖尿病の予防又は治療のために用いられる $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上の化合物。

- [請求項21] 糖尿病の予防又は治療のために用いられる平均分子量が650～300000であるポリリジン。
- [請求項22] 摂食抑制のために用いられる実質的に塩基性アミノ酸からなるポリペプチド。
- [請求項23] 前記ポリペプチドがポリリジンである、請求項18または22記載のポリペプチド。
- [請求項24] 前記ポリペプチドが、 $\alpha$ -ポリ-L-リジン、 $\alpha$ -ポリ-D-リジン、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジン、および $\epsilon$ -ポリ-D-リジンからなる群から選択される1種または2種以上の化合物である、請求項18または22記載のポリペプチド。
- [請求項25] 前記ポリペプチドが、平均分子量が650～300000であるポリリジンである、請求項18または22記載のポリペプチド。

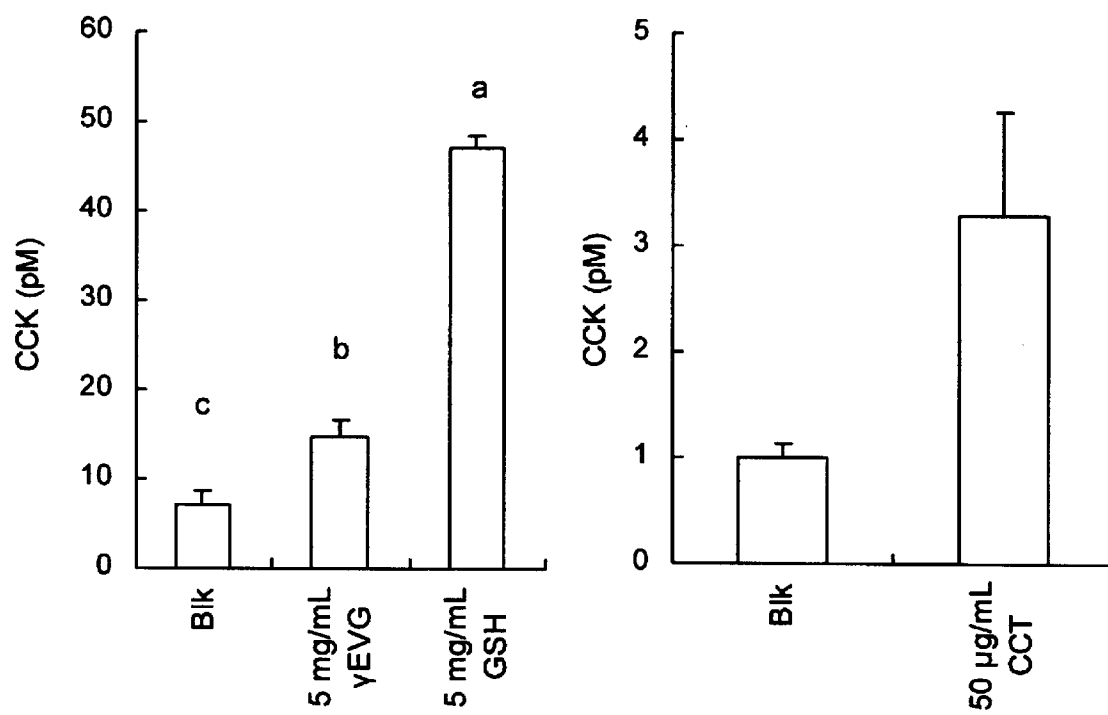
[図1]



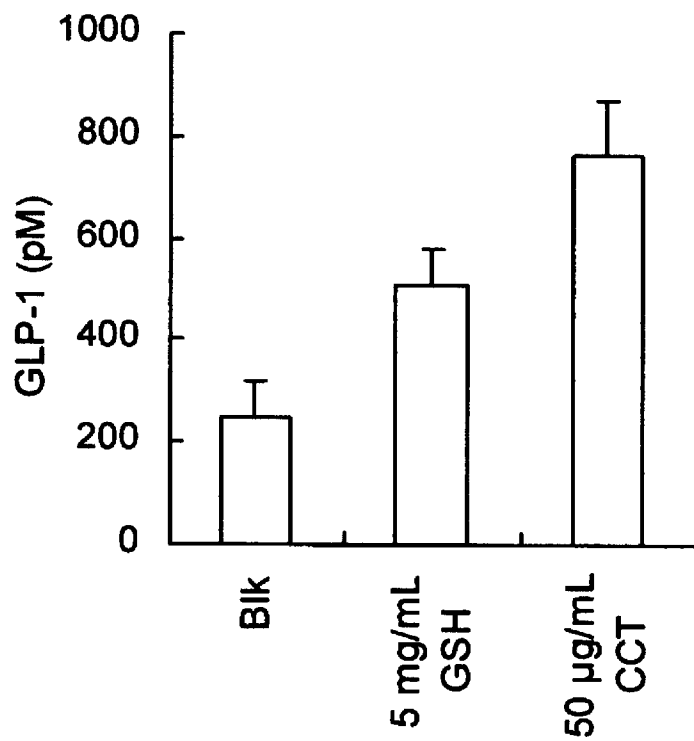
[図2]



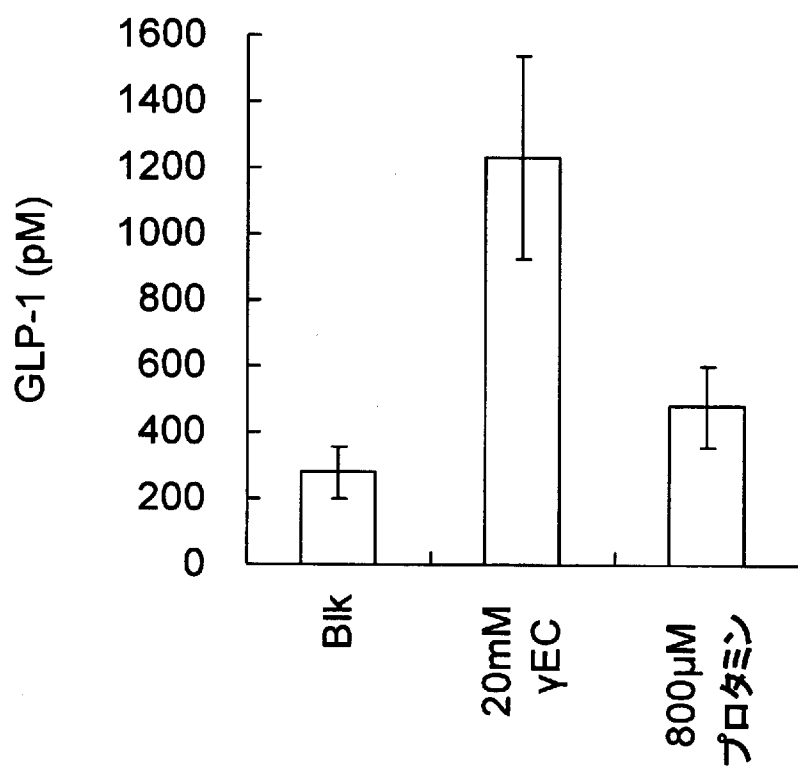
[図3]



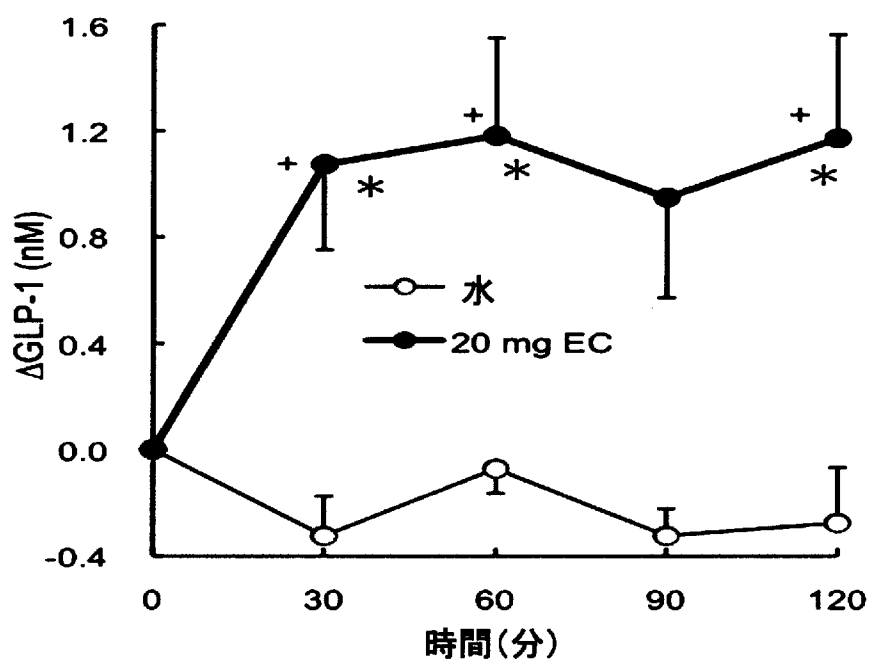
[図4]



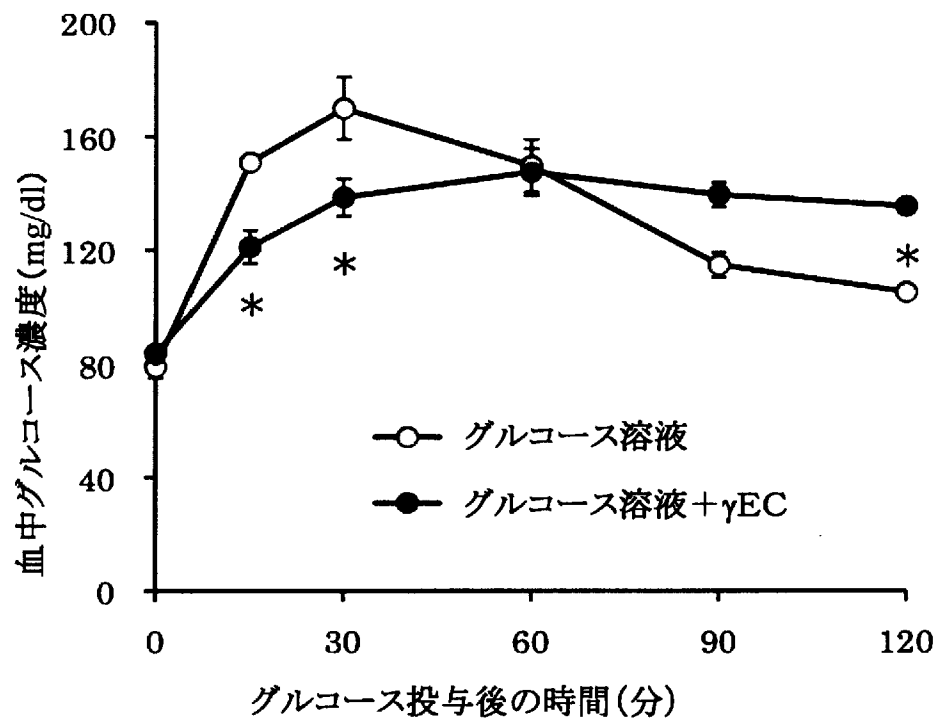
[図5]



[図6]



[図7]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/064195

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/10(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)

A61K38/00, A61P3/04, A61P3/10, A61P43/00

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/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) ,  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                         | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | JP 2007-39428 A (Ehime University),<br>15 February 2007 (15.02.2007),<br>entire text<br>& US 2007/0003491 A1 & US 2008/0220052 A1                                          | 1-13, 18-25           |
| X         | JP 2009-514791 A (Ajinomoto Co., Inc.),<br>09 April 2009 (09.04.2009),<br>claims 9, 12 to 14<br>& US 2010/0136197 A & EP 1946110 A<br>& WO 2007/055393 A1 & CN 101305281 A | 5-8, 12, 18-25        |

☐ 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  
01 November, 2010 (01.11.10)

Date of mailing of the international search report  
09 November, 2010 (09.11.10)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/064195

## 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.: 14-17  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 14 to 17 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.
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.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P43/00(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 (I P C))

Int.Cl. A61K38/00, A61P3/04, A61P3/10, A61P43/00

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   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 0 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 0 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 0 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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| X               | JP 2007-39428 A (国立大学法人愛媛大学) 2007.02.15, 全文<br>& US 2007/0003491 A1 & US 2008/0220052 A1                                              | 1-13, 18-25    |
| X               | JP 2009-514791 A (味の素株式会社) 2009.04.09,<br>請求項 9, 1 2 - 1 4 & US 2010/0136197 A & EP 1946110 A<br>& WO 2007/055393 A1 & CN 101305281 A | 5-8, 12, 18-25 |

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

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 1 . 1 1 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

0 9 . 1 1 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

川口 裕美子

4 C

9 8 2 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

## 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 1 4 - 1 7 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 1 4 - 1 7 は治療による人体の処置方法に関するものであって、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。
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ころ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ので、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ので、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。