明　細　書

発明の名称 ： 尿酸値低下剤

技術分野

[0001] 本発明は、尿酸値低下剤に関する。さらに詳しくは、環状ジペプチドを有効成分とする尿酸値低下剤、該環状ジペプチドを含有する組成物を有効成分とする尿酸値低下剤、該環状ジペプチドを含有する尿酸値低下用組成物、該環状ジペプチドを有効成分とするキサンチンオキシダーゼ阻害剤、該環状ジペプチドを含有する組成物を有効成分とするキサンチンオキシダーゼ阻害剤、ならびに該環状ジペプチドを含有するキサンチンオキシダーゼ阻害用組成物に関する。

背景技術

[0002] アミノ酸が二つ結合した「ジペプチド」が機能性物質として注目されている。ジペプチドは単体アミノ酸にない物理的性質や新たな機能を付加することが可能であり、アミノ酸以上の応用範囲を有するものとして期待されている。なかでも、環状のジペプチドであるジケトピペラジンは、様々な生理活性を有することが知られており、医療・薬理分野において需要が拡大することが予想されている。

[0003] 例えば、特許文献１では、２，５－ジケトピペラジン構造を有する環状ジペプチドが、抗うつ作用や学習意欲改善作用等を有することを報告している。また、非特許文献１には、環状ジペプチドCyclo(His-Pro)が、体温を低下させたり、食欲を抑制させるなどの中枢神経系作用や、プロラクチン分泌を抑制したり、成長ホルモン分泌を促進するなどのホルモン様作用など多くの生理活性を示すことが記載され、環状ジペプチドCyclo(Leu-Gly)が記憶機能改善作用を示し、環状ジペプチドCyclo(Asp-Pro)が脂肪嗜好性抑制作用を示すとの報告もある。非特許文献２には、抗菌作用や抗酸化作用を有する環状ジペプチドが報告されている。

[0004] また、非特許文献３には、環状ジペプチドCyclo(Trp-Pro)に抗ガン作用、

環状ジペプチドCyclo(His-Pro)、Cyclo(Gly-Pro)に抗菌作用、環状ジペプチドCyclo(His-Pro)に神経保護作用、環状ジペプチドCyclo(Gly-Pro)に記憶機能改善作用、環状ジペプチドCyclo(Tyr-Pro)、Cyclo(Phe-Pro)に生物性除草剤としての作用があることが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表２０１２－５１７９９８号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Peptides、16(1)、151-164(1995)

非特許文献2：バイオサイエンスとインダストリー，60(7)，454-457 (2002)

非特許文献3：Chemical Reviews、112、3641-3716(2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、環状ジペプチドについては不明な機能も多い。

[0008] 本発明の課題は、優れた尿酸値低下作用を有する環状ジペプチドを有効成分とする尿酸値低下剤、該環状ジペプチドを含有する組成物を有効成分とする尿酸値低下剤、ならびに、該環状ジペプチドを有効成分とするキサンチンオキシダーゼ阻害剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、下記〔１〕～〔９〕に関する。

〔１〕 シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、

シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれるチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を有効成分とする尿酸値低下剤。

〔２〕　シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれるチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を含有する組成物を有効成分とする尿酸値低下剤。

〔３〕　シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上のチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を含有する尿酸値低下用組成物。

〔４〕　シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シ

クロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれるチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を有効成分とするキサンチンオキシダーゼ阻害剤。

〔５〕　シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれるチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を含有する組成物を有効成分とするキサンチンオキシダーゼ阻害剤。

〔６〕　シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上のチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を含有するキサンチンオキシダーゼ阻害用組成物。

〔７〕　尿酸値を低下させる使用のための、シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロ

ロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上のチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩。

〔８〕　尿酸値を低下させるための、シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上のチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩の使用。

〔９〕　シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上のチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩の有効量を尿酸値の低下を必要とする個体に投与する工程を含む、尿酸値の低下方法。

発明の効果

[0010] 本発明の尿酸値低下剤は、優れた尿酸値低下作用を有するという優れた効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、Cyclo(Tyr-Gly)と直鎖ジペプチドのTyr-Gly、Gly-Tyr、アミノ酸のTyrのキサンチンオキシダーゼ阻害率(%)を示す図である。

[図2]図２は、高尿酸血症マウスに対するチロシン含有環状ジペプチドの血清尿酸値低下作用の検討結果を示す図である。

[図3]図３は、高尿酸血症マウスに対するチロシン含有環状ジペプチドのキサンチンオキシダーゼ(XO)活性抑制作用の検討結果を示す図である。上図が肝臓中のXO活性、下図が血清中のXO活性を示す図である。

[図4]図４は、高尿酸血症マウスに対する大豆ペプチド熱処理物、及び大豆ペプチド熱処理物に含有される８種のTyr含有環状ジペプチド混合物の血清尿酸値低下作用の検討結果を示す図である。

[図5]図５は、高尿酸血症マウスに対する大豆ペプチド熱処理物の用量による血清尿酸値低下作用の検討結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の尿酸値低下剤は、シクロトリプトファニルチロシン〔Cyclo(Trp-Tyr)〕、シクロセリルチロシン〔Cyclo(Ser-Tyr)〕、シクロプロリルチロシン〔Cyclo(Pro-Tyr)〕、シクロチロシルグリシン〔Cyclo(Tyr-Gly)〕、シクロチロシルチロシン〔Cyclo(Tyr-Tyr)〕、シクロフェニルアラニルチロシン〔Cyclo(Phe-Tyr)〕、シクロロイシルチロシン〔Cyclo(Leu-Tyr)〕、シクロリシルチロシン〔Cyclo(Lys-Tyr)〕、シクロヒスチジルチロシン〔Cyclo(His-Tyr)〕、シクロアラニルチロシン〔Cyclo(Ala-Tyr)〕、シクログルタミルチロシン〔Cyclo(Glu-Tyr)〕、シクロバリルチロシン〔Cyclo(Val-Tyr)〕、シクロイソロイシルチロシン〔Cyclo(Ile-Tyr)〕、シクロトレオニルチロシン〔Cyclo(Thr-Tyr)〕、シクロアスパルチルチロシン〔Cyclo(Asp-Tyr)〕、シクロアスパラギニルチロシン〔Cyclo(Asn-Tyr)〕、シクログルタミニルチロシン〔C

yclo(Gln-Tyr)〕、シクロアルギニルチロシン〔Cyclo(Arg-Tyr)〕、シクロメチオニルチロシン〔Cyclo(Met-Tyr)〕、及びシクロチロシルシステイン〔Cyclo(Tyr-Cys)〕からなる群より選ばれる環状ジペプチドあるいはその塩を有効成分とするものであって、該環状ジペプチドがチロシンを含有するものであることを特徴とする。以降、前記チロシン含有環状ジペプチドのことを、本発明の環状ジペプチド又は本発明のジケトピペラジンと記載することもある。なお、本明細書において、環状ジペプチドにおけるアミノ酸の構成が同じであれば、それらの記載順序はいずれが先でも構わなく、例えば、Cyclo(Trp-Tyr)とCyclo(Tyr-Trp)は同じ環状ジペプチドのことである。

[0013] 本発明の環状ジペプチドは、構成アミノ酸の少なくとも１つがチロシンであればよく、例えば、構成する２つのアミノ酸をアミノ酸Ａ、アミノ酸Ｂとする場合、アミノ酸Ａのカルボキシ基とアミノ酸Ｂのアミノ基が脱水縮合し、かつ、アミノ酸Ａのアミノ基とアミノ酸Ｂのカルボキシ基が脱水縮合した構造を有する。このように本発明の環状ジペプチドはチロシンをその構成要素として含有するが、詳細なる理由は不明であるものの、例えば、後述の表１及び表３の対比より、同じ芳香環を有するフェニルアラニン含有環状ジペプチドはキサンチンオキシダーゼ阻害作用が確認されないことを考えると、チロシンのフェノール性水酸基により、キサンチンオキシダーゼの活性を阻害すると推定される。ただし、これらの推測は、本発明を限定するものではない。

[0014] 本発明の尿酸値低下剤は、前記した２０個の環状ジペプチドのうち、１つ又は２つ以上の環状ジペプチドあるいはその塩を有効成分として含有するものであればよい。従って、本発明の一態様として、前記した２０個の環状ジペプチドから選ばれる環状ジペプチドあるいはその塩を含有する組成物を有効成分とする尿酸値低下剤が挙げられる。なかでも、キサンチンオキシダーゼ阻害効果の観点から、有効成分である環状ジペプチドとしては、シクロセリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロバリルチロシ

ン、シクロイソロイシルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上の環状ジペプチドあるいはその塩を少なくとも含有することが好ましく、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上の環状ジペプチドあるいはその塩を少なくとも含有することがより好ましく、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、及びシクロロイシルチロシンからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上の環状ジペプチドあるいはその塩を少なくとも含有することがさらに好ましく、シクロチロシルチロシンあるいはそれらの塩を少なくとも含有することがさらに好ましい。

[0015] 本発明の尿酸値低下剤を構成する環状ジペプチドのうち、キサンチンオキシダーゼ阻害作用の高いシクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、及びそれらの塩が占める合計量の割合は、キサンチンオキシダーゼ阻害効果の観点から、5重量％以上が好ましく、10重量％以上がより好ましく、15重量％以上がさらに好ましい。また、上限は特に限定されないが、可溶化性能の観点から、90重量％以下が好ましく、60重量％以下がより好ましい。

[0016] また、シクロフェニルアラニルチロシンとシクロチロシルチロシンの重量比〔Cyclo(Tyr-Phe)／Cyclo(Tyr-Tyr)〕は、キサンチンオキシダーゼ阻害効果の観点から、95／5～35／65が好ましく、90／10～40／60がより好ましく、90／10～50／50がさらに好ましい。

[0017] また、シクロフェニルアラニルチロシンとシクロチロシルグリシンとの重量比〔Cyclo(Phe-Tyr)／Cyclo(Tyr-Gly)〕は、キサンチンオキシダーゼ阻害効果の観点から、90／10～30／70が好ましく、90／10～40／60がより好ましく、90／10～50／50がさらに好ましい。

[0018] 本明細書において、環状ジペプチドの塩とは、前記環状ジペプチドの薬理学的に許容される任意の塩(無機塩及び有機塩を含む)をいい、例えば、前記環状ジペプチドのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、燐酸塩、有機酸塩(酢酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、プロピオン酸塩、蟻酸塩、安息香酸塩、ピクリン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩等)等が挙げられる。

[0019] 本発明の環状ジペプチドは、当該分野で公知の方法に従って調製することができる。例えば、化学合成方法や酵素法、微生物発酵法により製造されてもよく、直鎖ペプチドを脱水・環化反応させることにより合成されてもよく、特開２００３－２５２８９６号公報やJ.Peptide Sci.、10、737-737(2004)に記載の方法に従って調製することもできる。本発明では、大豆ペプチドを含有する溶液を熱処理して得られた処理物を好適に用いることができる。よって、例えば、本発明の環状ジペプチドあるいはその塩を含有する組成物として、大豆ペプチドを含有する溶液を熱処理して得られた処理物を有効成分とする尿酸値低下剤を提供することができる。

[0020] 大豆ペプチドを含有する溶液を熱処理して得られた処理物とは、具体的には、例えば、大豆ペプチドを水に２０～５００ｍｇ／ｍＬの濃度で溶解させ、４０～１５０℃の条件で、５分～１２０時間加熱して調製することができる。得られた処理物に対して、所望により、ろ過、遠心分離、濃縮、限外ろ過、凍結乾燥、粉末化等の処理を行ってもよい。

[0021] 環状ジペプチドの塩は、当該分野で公知の任意の方法により、当業者によって容易に調製され得る。

[0022] 以上のようにして得られた本発明の環状ジペプチド又はその塩は、キサンチンオキシダーゼの活性を阻害して尿酸の生成を抑制するために使用することができる。よって、本発明はまた、本発明の環状ジペプチド又はその塩を有効成分とするキサンチンオキシダーゼ阻害剤、本発明の環状ジペプチド又はその塩を含有する組成物を有効成分とするキサンチンオキシダーゼ阻害剤

を提供する。

[0023] またさらに、本発明は、本発明の環状ジペプチド又はその塩を含有することを特徴とする組成物を提供する。かかる特徴を有することにより、該組成物はキサンチンオキシダーゼの活性を阻害して尿酸の生成を抑制することができることから、尿酸値低下用組成物あるいはキサンチンオキシダーゼ阻害用組成物として好適に使用され得る。従って、本発明の組成物は本発明の尿酸値低下剤の一態様であり、環状ジペプチド又はそれらの塩を配合する組成物は本発明に含まれる。

[0024] 本発明の尿酸値低下剤は、本発明の環状ジペプチド又はその塩が循環血中に移行するのであれば、その投与形態は限定されない。なお、本明細書において、投与とは、投与、摂取、服用、飲用の全態様を含むものとして用いられる。

[0025] 本発明の尿酸値低下剤の投与を要する疾患としては、血中尿酸値を低下することにより治療効果がみられる疾患であれば特に限定はない。例えば、高尿酸血症、痛風、痛風結節、急性痛風性関節炎、慢性痛風性関節炎、痛風腎、尿路結石、腎機能障害、関節機能障害、血管障害等が例示される。

[0026] 本発明の尿酸値低下剤は、例えば、本発明の環状ジペプチド又はその塩に、所望により溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、公知の方法に従って、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤や、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤等に製剤化することもできる。また、これらを経口により摂取する方法、注射剤により投与する方法、経皮剤により吸収させる方法により投与してもよい。

[0027] また、前記形態における本発明の環状ジペプチド又はその塩の含有量は、その投与形態、投与方法などを考慮し、本発明の所望の効果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。本発明の尿酸値低下剤中の本発明の環状ジペプチド又はその塩の含有量としては通常1～100重量%程度である。なお、ここで、本発明の環状ジペプチド又はその塩の含有量とは、尿酸値低下剤中に含まれる環状ジペプチド又はその塩の総量のこ

とである。

[0028] 本発明の尿酸値低下剤は、その形態に応じた適当な投与方法で投与される。投与方法も本発明の環状ジペプチド又はその塩が循環血中に移行できるのであれば特に限定はなく、例えば内用、外用及び注射により投与することができる。注射の場合は、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、皮内などに投与し得、外用の場合は、例えば、座剤等の外用剤として、その適する投与方法により投与すればよい。

[0029] 本発明の尿酸値低下剤の投与量は、その形態、投与方法、使用目的及び当該尿酸値低下剤の投与対象である患者又は患獣の年齢、体重、症状によって適宜設定され一定ではない。例えば、本発明における本発明の環状ジペプチド又はその塩の有効ヒト摂取量としては、体重50kgのヒトで１日当たり、好ましくは0.2mg以上、より好ましくは2mg以上、さらに好ましくは20mg以上であり、好ましくは10g以下、より好ましくは5g以下、さらに好ましくは2g以下である。また、投与は、所望の投与量範囲内において、１日内において単回で、又は数回に分けて行ってもよい。投与期間も任意である。なお、ここで、本発明の環状ジペプチド又はその塩の有効ヒト摂取量とは、ヒトにおいて有効な効果を示す環状ジペプチド又はその塩の合計摂取量のことであり、環状ジペプチドの種類は特に限定されない。

[0030] 本明細書中において本発明の尿酸値低下剤の投与対象とは、好ましくは血中尿酸値の低下を必要とするヒトであるが、ウシ、ウマ、ヤギ等の家畜動物、イヌ、ネコ、ウサギ等のペット動物、又は、マウス、ラット、モルモット、サル等の実験動物であってもよい。また、投与対象として、血中尿酸値が高い個体だけでなく、血中尿酸値は高くはないが、血中尿酸値の上昇が気になる個体、高尿酸血症を予防したい個体、痛風を予防したい個体、血中尿酸値を高める飲食品(例えば、レバー類、白子、エビ、イワシ、カツオ等の魚介類などプリン体の含まれる飲食品)の摂取量の多い個体など、血中尿酸値の上昇を予防することを望む個体、チロシン含有環状ジペプチド又は大豆ペプチド熱処理物が配合されている旨の表示を観て、健康に良いので服用したいと

考える潜在的な個体も含まれる。

[0031] 本発明はまた、尿酸値の低下を必要とする個体に、本発明の環状ジペプチド又はその塩を、あるいは本発明の環状ジペプチド又はその塩を含有する組成物の治療有効量を投与することを含む、尿酸値の低下方法を提供する。なお、尿酸値の低下を必要とする個体とは、前記した本発明の尿酸値低下剤の投与対象と同様である。

[0032] また、本明細書中において治療有効量とは、本発明の環状ジペプチド又はその塩を上記個体に投与した場合に、投与していない個体と比較して、尿酸値が低下する量のことである。具体的な有効量としては、投与形態、投与方法、使用目的及び個体の年齢、体重、症状等によって適宜設定され一定ではない。

[0033] 本発明の治療方法においては、前記治療有効量となるよう、本発明の環状ジペプチド又はその塩をそのまま、また、本発明の環状ジペプチド又はその塩を含有する組成物として投与してもよい。また、投与方法にも限定はなく、例えば、経口投与により投与することができる。

[0034] 本発明の治療方法によれば、副作用を生じることなく血中尿酸値を低下することが可能となる。

実施例

[0035] 以下、実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に制限されるものではない。

[0036] ＜試薬＞

環状ジペプチドは神戸天然物化学社で合成したものを用いた。キサンチン、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩(CMC-Na)、チロシン(Tyr)、ギ酸(カラムクロマトグラフ用特製試薬)、メタノール(高速液体クロマトグラフ用)はナカライテスク社製；アロプリノール、オキソン酸カリウム塩は和光純薬社製；キサンチンオキシダーゼは東洋紡社製；キサンチンオキシダーゼアッセイキットはCayman Chemical Company社製；L-TyrosylglycineはSanta Cruz Biotechnology社製；Glycyl-L-tyrosineはSigma-Aldrich社製；組織タンパ

ク抽出試薬(T-PER)、プロテアーゼ阻害剤カクテルキット、Pierce BCAタンパク定量キット、ポリスチレン製ブラック96ウェルプレートはThermo Scientific社製；ヘパリンナトリウム塩は持田製薬社製；プラバスタチンナトリウム塩はSIGMA社製；大豆ペプチド(ハイニュート AM)は不二製油社製をそれぞれ用いた。

[0037] ＜統計解析＞

以降の試験例において、データは平均値±標準誤差で表示した。統計学的検定は、試験例１ではStudent’s t-testを用い、他の試験例ではone-way ANOVAで分散分析を行った後、Dunnet’s testを用いて多重比較検定を実施した。結果における「＊」はp＜0.05、「＃」はp＜0.1の有意差ありとした。なお、これらの解析は全てSPSS for Windows(登録商標) release 17.0(SPSS社製)を用いて実施した。

[0038] 試験例１ (in vitro XO阻害作用の検討)

210種の環状ジペプチド、直鎖のジペプチドであるTyr-Gly、Gly-Tyr、及びアミノ酸Tyrについて、in vitroにおけるキサンチンオキシダーゼ(XO)阻害作用を検討した。

[0039] 具体的には、96ウェルプレートの各ウェルに、pH7.5のリン酸緩衝液(PBS)に溶解させた4U/Lのキサンチンオキシダーゼ(XO)を75μL入れ、XO最終濃度に対してペプチド又はアミノ酸が所定濃度となるようサンプル溶液を5μL添加し、5分間混合した(ペプチド又はアミノ酸の最終濃度は50～500μM)。その後、PBSに溶解させた250μMのキサンチン溶液を20μL添加し、30分後における吸光度を分光光度計(Synegy HT、Bio Tek社製)を用いて測定した。各濃度におけるXO阻害率(%)は下記の計算式により算出し、XO阻害活性(IC_{50}値)を求めた。表１に１２種類のTyr含有環状ジペプチドのキサンチンオキシダーゼ阻害活性(IC_{50}値)を、表２に８種類のTyr含有環状ジペプチドの100μMにおけるキサンチンオキシダーゼ阻害率(%)を、表３に２０種類のPhe含有環状ジペプチドのキサンチンオキシダーゼ阻害活性(IC_{50}値)を示した。尚、ポジティブコントロールとして、公知の尿酸値低下剤であるアロプリノール(IC_{50}値：12.5μM

)を利用した。

[0040] [数1]

$$\%Inhibition = \left\{ \frac{(A-B)-(C-D)}{A-B} \right\} \times 100$$

A：酵素添加かつサンプル非添加群の295nmにおける吸光度

B：酵素非添加かつサンプル非添加群の295nmにおける吸光度

C：酵素添加かつサンプル添加群の295nmにおける吸光度

D：酵素非添加かつサンプル添加群の295nmにおける吸光度

[0041] [表1]

表1

Tyr(チロシン)含有環状ジペプチドのXO(キサンチンオキシダーゼ)阻害活性	
化合物	IC_{50}(μM)
Cyclo(Ser-Tyr)	188.9±52.5
Cyclo(Tyr-Gly)	49.0±3.0
Cyclo(Tyr-Tyr)	29.5±2.9
Cyclo(Phe-Tyr)	22.2±0.8
Cyclo(Leu-Tyr)	23.8±5.3
Cyclo(Val-Tyr)	79.4±16.1
Cyclo(Ile-Tyr)	86.7±2.8
Cyclo(Asp-Tyr)	172±13.5
Cyclo(Asn-Tyr)	113±11.4
Cyclo(Arg-Tyr)	211±36.2
Cyclo(Met-Tyr)	56.4±2.9
Cyclo(Tyr-Cys)	77.2±4.7

[0042] [表2]

表２

Tyr(チロシン)含有環状ジペプチドの XO(キサンチンオキシダーゼ)阻害活性	
化合物	100μMにおける 阻害率(%)
Cyclo(Trp-Tyr)	19.1
Cyclo(Pro-Tyr)	2.3
Cyclo(Lys-Tyr)	25.7
Cyclo(His-Tyr)	3.2
Cyclo(Ala-Tyr)	8.3
Cyclo(Glu-Tyr)	0.4
Cyclo(Thr-Tyr)	2.6
Cyclo(Gln-Tyr)	42.6

[0043]

[表3]

表３

Phe(フェニルアラニン)含有環状ジペプチドのXO(キサンチンオキシダーゼ)阻害活性	
化合物	IC_{50}(μM)
Cyclo(Trp-Phe)	>100
Cyclo(Ser-Phe)	>300
Cyclo(Pro-Phe)	>100
Cyclo(Phe-Gly)	>100
Cyclo(Phe-Tyr)	22.2±0.8
Cyclo(Phe-Phe)	>100
Cyclo(Leu-Phe)	>100
Cyclo(Lys-Phe)	>300
Cyclo(His-Phe)	>100
Cyclo(Ala-Phe)	>100
Cyclo(Glu-Phe)	>100
Cyclo(Val-Phe)	60.5±2.4
Cyclo(Ile-Phe)	>100
Cyclo(Thr-Phe)	>300
Cyclo(Asp-Phe)	>300
Cyclo(Asn-Phe)	>300
Cyclo(Gln-Phe)	>300
Cyclo(Arg-Phe)	>300
Cyclo(Met-Phe)	>100
Cyclo(Phe-Cys)	132.8±25.2

[0044] 表１、表２より、Tyr含有環状ジペプチドにXO阻害活性があること、表３よ

りTyrがPheに置き換わるとXO阻害活性が減弱することが分かる。

[0045] また、Cyclo(Tyr-Gly)、直鎖ジペプチドのTyr-Gly、Gly-Tyr、アミノ酸Tyrについても、同様にXO阻害率(%)を測定した。結果を図１に示す。

[0046] 図１より、環状化することでXO阻害活性が発現されることが分かり、環状ジペプチドであることが重要であることが示唆される。

[0047] 試験例２（高尿酸血症マウスに対する血清尿酸値低下作用の検討）

高尿酸血症モデル動物における、環状ジペプチドによる血清尿酸値の低下作用を検討した。

[0048] 使用動物は、雄性7週齢BALBcマウスを日本クレア社から購入し、1週間の馴化期間の後、実験に供した。動物は、空調設備のある飼育室(温度23.5±1.0℃、湿度55±10RH%、換気回数12～15回／時間、照明7：00～19：00/日)で飼育した。馴化期間中は、市販飼料(CE-2、日本クレア社製)及び蒸留水を自由に摂取させた。

[0049] オキソン酸は尿酸の代謝酵素であるウリカーゼを阻害することによって、血中尿酸値を上昇させる物質である。そこで、オキソン酸カリウム塩(PO)を投与することによって、高尿酸血症モデル動物を作製した(Planta Med 2009; 75:302-306参照)。以下の６群にて検討を行った。１）正常群(Normal群、オキソン酸負荷なし)、２）PO投与群(PO群、オキソン酸負荷あり)、３）PO＋アロプリノール1mg/kg投与群(PO＋AL群)、４）PO＋Cyclo(Tyr-Gly)10mg/kg投与群(PO＋CTG 10群)、５）PO＋Cyclo(Tyr-Gly)30mg/kg投与群(PO＋CTG 30群)、６）PO＋Cyclo(Tyr-Gly)100mg/kg投与群(PO＋CTG 100群)（各群ｎ＝6～8)。PO投与がある全ての群には0.5% CMC-Na水溶液に懸濁させたPOを250mg/kgで、Normal群には0.5% CMC-Na水溶液をそれぞれ腹腔内投与した。次いで１時間後に、PO＋アロプリノール投与群には1mg/kgのアロプリノールを、PO＋Cyclo(Tyr-Gly)投与群にはそれぞれ10、30、100mg/kgのCyclo(Tyr-Gly)を、Normal群には蒸留水を、それぞれ経口投与させた。PO投与から２時間後に麻酔下において腹部大静脈より採血を行い、脱血後に肝臓を採取した。採血した血液は室温で45分間静置した後に8000rpmで10分間遠心を行い、血清を回収した。

なお、血清及び肝臓は測定を実施するまで-80℃で保存した。

[0050] 血清中尿酸値は7180臨床分析装置(日立テクノロジーズ社製)を用いて測定を行った。結果を図２に示す。

[0051] 次に、マウスの肝臓を、氷冷したプロテアーゼ阻害剤カクテルと、EDTAを含む組織タンパク抽出試薬(T-PER)の混合物に加えてホモジナイズした後、15000rpm、4℃で15分間遠心し、回収した上清をキサンチンオキシダーゼ(XO)活性の測定に供した。肝臓及び血清中のXO活性はキサンチンオキシダーゼアッセイキット、ポリスチレン製ブラック96ウェルプレートを用いて測定した。具体的には、XO標準サンプル、肝臓サンプル、あるいは血清サンプルを50μL添加後に、アッセイ用バッファーとDetectorとHRPを98/1/1(質量比)で混合した分析用カクテルを50μL添加した。遮光下で37℃、45分間反応させた後に分光光度計(Synegy HT、Bio Tek社製)を用いて励起波長520-550nm、発光波長585-595nmにおける蛍光を測定した。血清中XO活性はmU/mL、肝臓中XO活性はPierce BCAタンパク定量キットを用いて測定したタンパク濃度の定量結果を用いてmU/mgと表示した。結果を図３に示す。

[0052] 図２より、Cyclo(Tyr-Gly)は用量依存的に尿酸値低下作用を有するものであり、Cyclo(Tyr-Gly)30、100mg/kg投与群はアロプリノール投与群と同様にPO群に対して有意差のある効果を示すことが分かる。また、図３より、Cyclo(Tyr-Gly)100mg/kg投与群ではアロプリノール1mg/kg投与群と同様に肝臓及び血清中のキサンチンオキシダーゼ活性を抑制することが分かる。

[0053] 試験例３（高尿酸血症マウスに対する大豆ペプチド熱処理物の血清尿酸値低下作用の検討）

試験例２と同様に、高尿酸血症モデル動物を用いて大豆ペプチド熱処理物の血清尿酸値の低下作用を検討した。具体的には、使用動物は、試験例２と同様にして準備し、以下の５群にて検討を行った。１）正常群(Normal群、オキソン酸負荷なし)、２）PO投与群(PO群、オキソン酸負荷あり)、３）PO＋アロプリノール1mg/kg投与群(PO＋AL群)、４）PO＋大豆ペプチド熱処理物2g/kg投与群、５）PO＋8種のTyr含有環状ジペプチド混合物11mg/kg投与群（各群ｎ

＝6～7)。前記各群に対して、試験例２と同様にして、投与及び採血を行って血清中の尿酸値を測定した。結果を図４に示す。なお、環状ジペプチド８種混合物は、Cyclo(Ser-Tyr)、Cyclo(Tyr-Gly)、Cyclo(Tyr-Tyr)、Cyclo(Phe-Tyr)、Cyclo(Leu-Tyr)、Cyclo(Val-Tyr)、Cyclo(Ile-Tyr)、及びCyclo(Asn-Tyr)の合成品を用いて大豆ペプチド熱処理物に含有される量となるよう調製したものを用いた。

[0054] なお、大豆ペプチドの熱処理物は、大豆ペプチド(ハイニュート AM、不二製油社製)を蒸留水に200mg/mLの濃度で溶解し、132℃で3時間加熱後に凍結乾燥して得られたものを用いた。大豆ペプチド熱処理物の環状ジペプチド含有量をLC-MS/MSに供して下記の条件に従って測定した。ただし、Cyclo(Tyr-Cys)は標準品が水溶液中で不安定なため測定することが出来なかった。結果を表４に示す。

〔LC-MS/MS分析条件〕

LC装置　SHIMADZU UFLC XR

カラム　Agilent technologies Zorbax SB－AQ 1.8μm　2.1×150mm

カラム温度　40℃

移動相　A:0.1%　ギ酸、B：メタノール　のグラジエント分析

流速　0.2mL/min

注入量　2μL

検出器　AB Sciex 4000 Q TRAP-Turbo Spray(ESI)-Scheduled MRM(multiple reaction monitoring)

[0055]

[表4]

表４

環状ジペプチド	含有量(×10^3ppm)
Cyclo(Trp-Tyr)	0.10
Cyclo(Ser-Tyr)	1.06
Cyclo(Pro-Tyr)	0.53
Cyclo(Tyr-Gly)	0.47
Cyclo(Tyr-Tyr)	0.18
Cyclo(Phe-Tyr)	0.74
Cyclo(Leu-Tyr)	0.92
Cyclo(Lys-Tyr)	1.25
Cyclo(His-Tyr)	0.32
Cyclo(Ala-Tyr)	0.52
Cyclo(Glu-Tyr)	0.22
Cyclo(Val-Tyr)	0.23
Cyclo(Ile-Tyr)	1.02
Cyclo(Thr-Tyr)	0.73
Cyclo(Asp-Tyr)	0.23
Cyclo(Asn-Tyr)	0.73
Cyclo(Gln-Tyr)	0.39
Cyclo(Arg-Tyr)	1.34
Cyclo(Met-Tyr)	0.17
Cyclo(Tyr-Cys)	測定不可

[0056] 表４及び図４より、大豆ペプチド熱処理物は本発明の環状ジペプチドを含有するものであり、血中尿酸値低下作用に優れるものであることが分かる。

[0057] 試験例４（高尿酸血症マウスに対する大豆ペプチド熱処理物の有効量の検討

)

試験例３と同様に、高尿酸血症モデル動物を用いて大豆ペプチド熱処理物の用量による血清尿酸値の低下作用を検討した。具体的には、使用動物は、試験例２と同様にして準備し、以下の６群にて検討を行った。１）正常群(Normal群、オキソン酸負荷なし)、２）PO投与群(PO群、オキソン酸負荷あり)、３）PO＋アロプリノール1mg/kg投与群(PO＋AL群)、４）PO＋大豆ペプチド熱処理物200mg/kg投与群、５）PO＋大豆ペプチド熱処理物400mg/kg投与群、６）PO＋大豆ペプチド熱処理物800mg/kg投与群(各群ｎ＝5～6)。前記各群に対して、試験例２と同様にして、投与及び採血を行って血清中の尿酸値を測定した。結果を図５に示す。

[0058] 図５より、大豆ペプチド熱処理物は800mg/kgで投与することにより、高尿酸血症モデルマウスの尿酸値に対して有意差が認められ、有効であることが分かる。

[0059] 本発明の環状ジペプチドは、食品由来の材料からでも調製可能なものであり、気楽に服用できる安心感の持てる物質である点で、副作用の心配のあるアロプリノールとは異なる利点がある。本発明の環状ジペプチドは、使用量によって作用の程度は異なるが、量によってはアロプリノールと同等もしくは、緩和な尿酸値低下作用が認められる。尿酸値の低下は、長期にわたって、食事療法と共に対処する必要があるため、日常的に服用する観点から、緩和な作用の方がむしろ好ましいともいえる。

産業上の利用可能性

[0060] 本発明の尿酸値低下剤は、優れた尿酸値低下作用を有するものであり、例えば、高尿酸血症や痛風等の予防又は治療に有用である。

請求の範囲

[請求項1] シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれるチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を有効成分とする尿酸値低下剤。

[請求項2] シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれるチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を含有する組成物を有効成分とする尿酸値低下剤。

[請求項3] 組成物が大豆ペプチドを含有する溶液を熱処理して得られた処理物である、請求項２記載の尿酸値低下剤。

[請求項4] シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチ

ロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上のチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を含有する尿酸値低下用組成物。

[請求項5] 組成物が大豆ペプチドを含有する溶液を熱処理して得られた処理物である、請求項４記載の尿酸値低下用組成物。

[請求項6] シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれるチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を有効成分とするキサンチンオキシダーゼ阻害剤。

[請求項7] シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、

及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれるチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を含有する組成物を有効成分とするキサンチンオキシダーゼ阻害剤。

[請求項8] 組成物が大豆ペプチドを含有する溶液を熱処理して得られた処理物である、請求項７記載のキサンチンオキシダーゼ阻害剤。

[請求項9] シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上のチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩を含有するキサンチンオキシダーゼ阻害用組成物。

[請求項10] 組成物が大豆ペプチドを含有する溶液を熱処理して得られた処理物である、請求項９記載のキサンチンオキシダーゼ阻害用組成物。

[請求項11] 尿酸値を低下させる使用のための、シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上のチロシン含有環状ジペプチ

ドあるいはその塩。

[請求項12] 尿酸値を低下させるための、シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上のチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩の使用。

[請求項13] シクロトリプトファニルチロシン、シクロセリルチロシン、シクロプロリルチロシン、シクロチロシルグリシン、シクロチロシルチロシン、シクロフェニルアラニルチロシン、シクロロイシルチロシン、シクロリシルチロシン、シクロヒスチジルチロシン、シクロアラニルチロシン、シクログルタミルチロシン、シクロバリルチロシン、シクロイソロイシルチロシン、シクロトレオニルチロシン、シクロアスパルチルチロシン、シクロアスパラギニルチロシン、シクログルタミニルチロシン、シクロアルギニルチロシン、シクロメチオニルチロシン、及びシクロチロシルシステインからなる群より選ばれる１つ又は２つ以上のチロシン含有環状ジペプチドあるいはその塩の有効量を尿酸値の低下を必要とする個体に投与する工程を含む、尿酸値の低下方法。