



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116997561 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 03

(21) 申请号 202280019836.9

(22) 申请日 2022.03.24

(30) 优先权数据

2021-050468 2021.03.24 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/013912 2022.03.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/202985 JA 2022.09.29

(71) 申请人 森永乳业株式会社

地址 日本东京都

申请人 国立大学法人京都大学

(72) 发明人 大日向耕作 藤井晖 中田创

栗本昌树 越智浩

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

专利代理师 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.

G07K 7/06 (2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

序列表1页

(54) 发明名称

肽及含有该肽作为有效成分的组合物

(57) 摘要

提供日常生活中可轻松摄取、副作用少、具有各种作用的肽及含有该肽作为有效成分的组合物。提供一种肽,其由下述(a)或(b)的氨基酸序列构成。(a)序列号1(Asn-Leu-Pro-Pro-Leu-Thr)记载的氨基酸序列;(b)在序列号1记载的氨基酸序列中置换、缺失或添加1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列。另外,还提供含有上述肽作为有效成分的组合物。

1. 一种肽,其由下述(a)或(b)的氨基酸序列构成,
  - (a) 序列号1记载的氨基酸序列;
  - (b) 在序列号1记载的氨基酸序列中置换、缺失或添加1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的肽,其具有抗焦虑作用。
3. 根据权利要求1所述的肽,其具有睡眠改善作用。
4. 根据权利要求1所述的肽,其具有抗抑郁作用。
5. 根据权利要求1所述的肽,其具有学习障碍和/或记忆障碍改善作用。
6. 一种组合物,其含有权利要求1至5中任一项所述的肽作为有效成分。
7. 根据权利要求6所述的组合物,其中,所述组合物为饮食品。
8. 根据权利要求6所述的组合物,其中,所述组合物为药品。
9. 根据权利要求8所述的组合物,其用于治疗、预防和/或改善抑郁症、双相情感障碍、精神分裂症、焦虑性神经症或睡眠障碍。

## 肽及含有该肽作为有效成分的组合

### 技术领域

[0001] 本发明涉及肽及含有该肽作为有效成分的组合。

### 背景技术

[0002] 近年来,由于由生活环境/职场环境的多样化、人际关系的复杂化等带来的种种压力,生活在现代社会的人们普遍承受着诸多的焦虑感、精神上的压力。如果长期承受这样的焦虑感、精神上的压力,有时还会发展为身体健康失调、精神障碍、睡眠障碍、学习障碍、记忆障碍等。发生了这样的障碍的情况下,有时需要长期进行有副作用的药物治疗,因此需要适当缓解焦虑感、精神上的压力。

[0003] 但是,从副作用角度等出发,日常生活中为了解压而使用精神稳定剂、睡眠诱导剂、睡眠改善剂、抗抑郁剂等化学合成药剂的方式未必妥当。因此,需要可以在日常生活中轻松摄取、副作用少的素材。

[0004] 在此,专利文献1中公开了一种具有抗焦虑作用的肽,所述肽中酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或组氨酸与疏水性氨基酸相邻。另外,专利文献2中公开了一种改善或治疗兴趣下降、抑郁症或抑郁性情绪障碍、或者基于这些的症状的肽,所述肽由(i)氨基酸序列LSSTQAQQSY、(ii)氨基酸序列LSSTQAQQSW、或(iii)氨基酸序列LSSTQAQQSF中的任一者构成。

[0005] 但是,对于具有抗焦虑作用、睡眠改善作用、抗抑郁作用、或者学习障碍和/或记忆障碍改善作用的素材的要求多种多样,因此对新素材的需求依然存在。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:国际公开第2010/087480号小册子

[0009] 专利文献2:国际公开第2016/140277号小册子

### 发明内容

[0010] 发明要解决的问题

[0011] 因此,本技术的主要目的在于,提供日常生活中可轻松摄取、副作用少、具有各种作用的肽及含有该肽作为有效成分的组合。

[0012] 用于解决问题的方案

[0013] 本发明人们为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现了具有抗焦虑作用、睡眠改善作用、抗抑郁作用、以及学习障碍和/或记忆障碍改善作用的由Asn-Leu-Pro-Pro-Leu-Thr的氨基酸序列构成的肽(序列号1,以下也称为“肽NLPPLT”),从而完成了本技术。

[0014] 即,本技术首先提供一种肽,其由下述(a)或(b)的氨基酸序列构成。

[0015] (a)序列号1记载的氨基酸序列

[0016] (b)在序列号1记载的氨基酸序列中置换、缺失或添加1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列

[0017] 本技术所涉及的肽可具有抗焦虑作用、睡眠改善作用、抗抑郁作用、或者学习障碍和/或记忆障碍改善作用。

[0018] 另外,本技术还提供含有上述肽作为有效成分的组合物。

[0019] 本技术所涉及的组合物可以为饮食品。

[0020] 本技术所涉及的组合物可以为药品。该情况下,本技术所涉及的组合物可用于治疗、预防和/或改善抑郁症、双相情感障碍、精神分裂症、焦虑性神经症或睡眠障碍。

[0021] 发明的效果

[0022] 本技术中,肽NLPPLT具有优异的抗焦虑作用、睡眠改善作用、抗抑郁作用、以及学习障碍和/或记忆障碍改善作用,因此可以提供日常生活中可轻松摄取、副作用少、具有各种作用的肽及含有该肽作为有效成分的组合物。

[0023] 需要说明的是,并非必须限定于这里所记载的效果,可以为本说明书中记载的任意效果。

## 具体实施方式

[0024] 以下对用于实施本技术的优选实施方式进行说明。

[0025] 需要说明的是,以下所说明的实施方式示出本技术的代表性实施方式的一例,不应基于此狭义地解释本技术的范围。

[0026] 1. 肽

[0027] 本技术所涉及的肽具有Asn-Leu-Pro-Pro-Leu-Thr所示的氨基酸序列(序列号1)。本技术中,Asn(N)表示L-天冬酰胺残基,Leu(L)表示L-亮氨酸残基,Pro(P)表示L-脯氨酸残基,Thr(T)表示L-苏氨酸残基。

[0028] 另外,本技术所涉及的肽具有在序列号1记载的氨基酸序列中置换、缺失或添加1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列。该情况下,置换、缺失或添加的氨基酸的个数优选为2个以下。

[0029] 另外,本技术所涉及的肽可以为在具有选自抗焦虑作用、睡眠改善作用、抗抑郁作用、以及学习障碍和/或记忆障碍改善作用中的任意一种以上作用的范围内置换、缺失或添加1个或数个氨基酸而成的肽。进而,本技术所涉及的肽可以为肽NLPPLT的盐类。作为该盐类,可列举例如钾、钠等碱金属类;钙、镁等碱土金属类等,可以适宜地使用其中的1种或2种以上。

[0030] 关于肽NLPPLT的制造方法,可例示出例如以下方法,但是对其没有特别限定。具体而言,可列举例如:将包含Asn-Leu-Pro-Pro-Leu-Thr所示的氨基酸序列(序列号1)的蛋白质、肽通过水解等而分解,从得到的分解物中分离纯化而得到的方法;通过肽的化学合成方法合成肽NLPPLT后,从得到的合成物中分离纯化肽NLPPLT而得到的方法;从生产肽NLPPLT及包含其的肽等的植物、动物、微生物中提取,从得到的提取物中分离纯化的方法等。

[0031] 本技术所涉及的肽例如可以通过将乳清蛋白等蛋白质适当地利用酸、碱、酶等进行水解来制造。以下例示出将原料蛋白质用水解酶水解而得到肽NLPPLT的方法。

[0032] 首先,在将原料蛋白质用酶进行水解之前,将蛋白质溶解、分散或悬浮于水。

[0033] 原料蛋白质只要是结构上包含本技术所涉及的肽、并且在用水解酶适当消化时能够生成本技术所涉及的肽的蛋白质就没有特别限定。作为上述蛋白质,可列举例如动物来

源、植物来源、微生物来源的蛋白质等,本技术中,优选这些中可大量获得的乳清蛋白。

[0034] 上述乳清蛋白可以为市售品,另外也可以为从乳清蛋白中按照常规方法(例如超滤、离子交换法等)分离纯化而得的乳清蛋白浓缩物、乳清蛋白分离物、或将这些乳清蛋白与乳清等(例如乳清粉末、脱盐乳清粉末等)混合并调整了乳清蛋白纯度的混合物。

[0035] 此时,处理方法根据原料蛋白质的性状而不同,原料蛋白质为可溶性时,将原料蛋白质分散于水或温水并溶解即可,另外,为难溶性时,通过混合搅拌而使蛋白质在热水中均质化即可。

[0036] 然后,可以向含有上述蛋白质的溶液中添加碱剂或酸剂而调节pH。其pH优选调节至所使用的水解酶的最适pH或其附近。

[0037] 作为上述碱剂或酸剂,没有特别限定,使用对于药品或饮食品而言可接受的碱剂或酸剂即可。作为碱剂,可列举例如氢氧化钠、氢氧化钙等氢氧化物;碳酸钾等碳酸盐等,这些可以为碱金属盐、碱土金属盐。另外,作为酸剂,可列举例如盐酸、磷酸等无机酸;柠檬酸、乙酸、甲酸等有机酸等。本技术中,可以适当使用这些中的1种或2种以上。

[0038] 另外,从防止杂菌污染所致的腐败的角度出发,优选对含有上述蛋白质的溶液在70~90℃下进行15秒~10分钟左右的加热灭菌。

[0039] 然后,向含有上述蛋白质的溶液中加入规定量的水解酶,在温度10~85℃左右反应0.1~48小时,得到水解物。

[0040] 此时,添加上述水解酶后,将该溶液在与酶的种类相适应的温度、例如30~60℃、优选45~55℃下保持,开始进行蛋白质水解。

[0041] 另外,水解反应时间可以一边监测酶反应的分解率一边持续进行反应,直至达到优选的分解率为止。

[0042] 上述水解酶反应的停止例如可以通过使水解液中的酶失活来进行,可以通过基于常规方法的加热失活处理来实施。加热失活处理的加热温度和保持时间可以考虑所使用的酶的热稳定性而适当设为能够使其充分失活的条件,例如,可以以80~130℃的温度范围、30分钟~2秒的保持时间来进行。

[0043] 上述水解酶没有特别限定,优选能够水解上述原料蛋白质并生成本技术所涉及的肽的酶。另外,水解酶可以单独使用或将2种以上组合使用。在使用2种以上的酶时,各酶反应可以同时或分别进行。作为上述可生成的酶,具体而言,优选将内肽酶、胰蛋白酶及木瓜蛋白酶组合使用,更优选将这3种酶混合使用。

[0044] 作为上述内肽酶,包括例如微生物来源、动物来源的内肽酶,具体而言,可列举枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源的蛋白酶、动物胰腺来源的蛋白酶等。作为上述蛋白酶,可以使用市售的蛋白酶。作为市售品的蛋白酶,可列举例如PROTEASE N AMANO(天野酶公司制)、Biopraser SP-20(长濑产业公司制)、Neutraser(诺维信日本公司制)等源自芽孢杆菌属细菌的蛋白酶;PTN6.0S(诺维信日本公司制)等源自动物胰腺的蛋白酶等。

[0045] 另外,作为上述胰蛋白酶,可列举例如PTN6.0S(诺维信日本公司制)等,作为上述木瓜蛋白酶,可列举例如木瓜蛋白酶W-40(天野酶公司制)、纯化木瓜蛋白酶(三菱化学公司制)等。

[0046] 另外,关于原料蛋白质的分解率的计算方法,利用凯氏定氮法测定试样的总氮量,利用甲醛滴定法测定试样的甲醛态氮量,由这些测定值通过下述式(1)计算分解率。

[0047] 分解率(%) = (甲醛态氮量/总氮量) × 100... (1)

[0048] 本技术中,优选从上述水解液物中分离或纯化本技术所涉及的肽。

[0049] 本技术所涉及的肽的纯化可以通过将与通常用于纯化寡肽的方法同样的手法、例如离子交换色谱、吸附色谱、反相色谱、分配色谱、凝胶过滤色谱等各种色谱、溶剂沉淀、盐析、2种液相间的分配等方法适宜组合来进行。

[0050] 在分离或纯化本技术所涉及的肽时,可以以上述各种作用为指标来确定包含目标物质的级分。另外,这些级分的活性成分可以通过质谱分析法来鉴定。

[0051] 另外,本技术所涉及的肽也可以通过化学合成来制造。

[0052] 本技术所涉及的肽的化学合成可以通过通常用于合成寡肽的液相法或固相法来进行。合成的肽可以根据需要进行脱保护,除去未反应试剂、副产物等,分离本技术所涉及的肽。

[0053] 这样的肽的合成例如可以使用市售的肽合成装置等进行。可以以选自抗焦虑作用、睡眠改善作用、抗抑郁作用、以及学习障碍和/或记忆障碍改善作用中的任意一种以上作用为指标,来确认得到作为目标的肽。

[0054] 如后述试验例1所示,肽NLPPLT具有抗焦虑作用,另外如后述试验例2所示,肽NLPPLT具有5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体的活化所介导的作用,因此也具有睡眠改善作用。另外,如后述的试验例3所示,还具有抗抑郁作用。5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体在各种5-羟色胺受体中表达最为广泛,与睡眠、进食、体温调节、焦虑等行为有关。因此,通过活化该5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体而产生选自抗焦虑作用、睡眠改善作用及抗抑郁作用中的任意一种以上作用这一点是现有公知的。因此,本技术所涉及的肽可以用于抗焦虑用途、睡眠改善用途或抗抑郁用途。

[0055] 此外认为,利用本技术所涉及的肽能够预防、改善或治疗与5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体相关的各种疾病、症状。因此,本技术所涉及的肽可以作为有效成分用于使包括人在内的动物摄取或对其给予、以期预防、改善和/或治疗与5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体相关的疾病、症状等的方法。

[0056] 需要说明的是,本说明书中,“改善”是指:疾病、症状或状态的好转;疾病、症状或状态的恶化的防止、延迟;疾病或症状的进展的逆转、防止或延迟,“预防”是指:适用对象的疾病或症状的发生的防止、延迟,或者适用对象的疾病或症状的危险性的降低、健康的维持。

[0057] 作为上述与5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体相关的各种疾病、症状,可列举例如抑郁症、双相情感障碍、精神分裂症、焦虑性神经症或睡眠障碍等。

[0058] 另外,如后述试验例3所示,肽NLPPLT具有AMPA受体的活化所介导的作用,因此认为利用本技术所涉及的肽能够预防、改善或治疗与AMPA受体相关的各种疾病、症状。AMPA受体为谷氨酸受体之一,广泛分布于中枢神经系统,已知与记忆、学习密切相关。因此,活化该AMPA受体不仅产生抗抑郁作用、而且产生学习障碍和/或记忆障碍改善作用这一点是现有公知的。因此,本技术所涉及的肽除了可以用于抗焦虑用途、睡眠改善用途或抗抑郁用途以外,还可以用于学习障碍和/或记忆障碍改善用途。

[0059] 另外,本技术所涉及的肽即使长期摄取安全性也高,还能够作为非治疗目的的食品的含有成分使用。

[0060] 需要说明的是,本说明书中,“非治疗目的”是不包括医疗行为、即基于治疗的对人

体的处置行为的概念,可列举例如美容行为、健康增进等。

[0061] 2. 组合物

[0062] 本技术还提供含有上述的本技术所涉及的肽作为有效成分的组合物。本技术所涉及的组合物可以作为制剂等药品、饮食品、饲料等使用。另外,本技术所涉及的肽可以用于制造上述各种组合物等。

[0063] 本技术所涉及的组合物中,除了可以使用本技术所涉及的肽以外,还可以根据需要组合使用任意成分。作为任意成分,可以适当使用药品、饮食品或饲料等中可接受的成分。

[0064] 将本技术所涉及的组合物用于药品时,可以通过向公知的药品中添加本技术所涉及的肽而制备,也可以通过在药品的原料中混合该肽而制造新的药品。

[0065] 另外,将本技术所涉及的肽用于药品时,可以直接或浓缩后、或者加工成固体状、液体状、颗粒状或粉末状后使用。

[0066] 上述药品可以根据经口给予、非经口给予等给予方法适宜地制剂化为期望的剂形。其剂形没有特别限定,经口给予的情况下,例如可以制剂化为散剂、颗粒剂、片剂、含片剂、胶囊剂等固体制剂;溶液剂、糖浆剂、悬浮剂、乳剂等液体制剂等。非经口给予的情况下,例如可以制剂化为栓剂、喷雾剂、吸入剂、软膏剂、贴剂、注射剂等。本技术中,优选制剂化为经口给予的剂形。

[0067] 需要说明的是,制剂化可以根据剂形适宜利用公知方法实施。

[0068] 制剂化时,可以适宜地配合制剂载体等而制剂化。另外,除了上述药品以外,可以使用通常用于制剂化的赋形剂、pH调节剂、着色剂、矫味剂等成分。进而,也可以适宜组合使用具有治疗、预防和/或改善公知的或将来发现的疾病、症状的效果的成分。

[0069] 作为制剂载体,可以根据剂形使用各种有机或无机的载体。

[0070] 作为固体制剂情况下的载体,可列举例如赋形剂、结合剂、崩解剂、润滑剂、稳定剂、矫味矫臭剂等。

[0071] 作为赋形剂,可列举例如乳糖、白糖、葡萄糖、甘露糖醇、山梨糖醇等糖衍生物;玉米淀粉、马铃薯淀粉、 $\alpha$ -淀粉、糊精、羧甲基淀粉等淀粉衍生物;结晶纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙等纤维素衍生物;阿拉伯胶;葡聚糖;普鲁兰多糖;轻质无水硅酸、合成硅酸铝、偏硅酸铝酸镁等硅酸盐衍生物;磷酸钙等磷酸盐衍生物;碳酸钙等碳酸盐衍生物;硫酸钙等硫酸盐衍生物等。

[0072] 作为结合剂,例如,除了上述赋形剂之外还可列举:明胶;聚乙烯吡咯烷酮;聚乙二醇等。

[0073] 作为崩解剂,例如,除了上述赋形剂之外还可列举:交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠、交联聚乙烯吡咯烷酮等经化学修饰的淀粉或纤维素衍生物等。

[0074] 作为润滑剂,可列举例如:滑石;硬脂酸;硬脂酸钙、硬脂酸镁等硬脂酸金属盐;胶体二氧化硅;硅酸铝镁盐(Veegum)、鲸蜡等蜡类;硼酸;二元醇;富马酸、己二酸等羧酸类;苯甲酸钠等羧酸钠盐;硫酸钠等硫酸盐类;亮氨酸;月桂基硫酸钠、月桂基硫酸镁等月桂基硫酸盐;硅酸酐、硅酸水合物等硅酸类;淀粉衍生物等。

[0075] 作为稳定剂,可列举例如:对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯等对羟基苯甲酸酯类;氯丁醇、苜醇、苯乙醇等醇类;苯扎氯铵;乙酸酐;山梨酸等。

- [0076] 作为矫味矫臭剂,可列举例如:甜味剂、酸味剂、香料等。
- [0077] 需要说明的是,作为用于经口给予的液体制剂中所用的载体,可列举水等溶剂、矫味矫臭剂等。
- [0078] 将本技术所涉及的组合物用于饮食品时,可以通过向公知的饮食品中添加本技术所涉及的肽而制备,也可以通过向饮食品的原料中混合该肽而制造新的饮食品。
- [0079] 另外,在将本技术所涉及的肽用于饮食品时,可以直接或浓缩后、或者加工成固体状、液体状、颗粒状或粉末状后使用。
- [0080] 作为饮食品,无论液体、糊状、固体、粉末等形态均可,除了可列举压片糖、流食、饲料(包括宠物用)等之外,还可列举例如:小麦粉制品、速食品、农产加工品、水产加工品、畜产加工品、乳/乳制品、油脂类、基础调味料、复合调味料/食品类、冷冻食品、点心类、饮料、除此以外的市售食品等。
- [0081] 作为乳制品,可列举例如:发酵乳、乳饮料、乳酸菌饮料、加糖炼乳、脱脂奶粉、加糖奶粉、配方奶粉、奶油、乳酪、黄油、冰淇淋类等。
- [0082] 作为小麦粉制品,可列举例如:面包、通心粉、意大利细面条、面类、蛋糕混合料、油炸粉、面包粉等。
- [0083] 作为速食品类,可列举例如:方便面、杯面、蒸煮/熟制食品、熟制罐头、微波用食品、速溶汤/日式炖菜、速食味噌汤/汤、罐装浓汤、冷冻/干燥食品、其它速食品等。
- [0084] 作为农产加工品,可列举例如:农产品罐头、水果罐头、果酱/橘香酱类、腌菜、煮豆类、农产品干物类、谷物(谷物加工品)等。
- [0085] 作为水产加工品,可列举例如:水产罐头、鱼肉火腿/香肠、水产糜类制品、水产鱼贝类、佃煮类等。
- [0086] 作为畜产加工品,可列举例如:畜产罐头/糊类、畜肉火腿/香肠等。
- [0087] 作为油脂类,可列举例如:黄油、人造奶油类、植物油等。
- [0088] 作为基础调味料,可列举例如:酱油、味噌、沙司类、番茄加工调味料、味醂类、食醋类等;作为上述复合调味料/食品类,可列举:烹调混合料、咖喱料类、调味汁类、沙拉酱类、面汤类、香辛料类、其它复合调味料等。
- [0089] 作为冷冻食品,可列举例如:食材冷冻食品,半熟制冷冻食品,熟制冷冻食品等。
- [0090] 作为点心类,可列举例如:焦糖、糖果、口香糖、巧克力、曲奇,饼干、蛋糕、馅饼、小零嘴、薄脆饼、日式点心、米类点心、豆类点心、甜点、其它点心等。
- [0091] 作为饮料类,可列举例如:碳酸饮料、天然果汁、果汁饮料、带有果汁的清涼饮料、果肉饮料、带有果粒的果实饮料、蔬菜系饮料、豆奶、豆奶饮料、咖啡饮料、茶饮料、粉末饮料、浓缩饮料、运动饮料、营养饮料、酒精饮料、其它嗜好饮料等。
- [0092] 作为上述食品以外的市售食品,可列举例如:婴儿食品、米饭伴侣、茶泡饭紫菜等。
- [0093] 另外,本技术中定义的饮食品可以作为标示出保健用途(例如抗焦虑用途、睡眠改善用途、抗抑郁用途、学习障碍和/或记忆障碍改善用途等)的饮食品来提供、销售。
- [0094] 本技术中,“标示”行为包括旨在使需要者知晓上述用途的所有行为,只要是可使其想到、联想上述用途的表达方式,无论标示的目的、标示的内容、标示的对象物/媒介物等,都属于本技术的“标示”行为。
- [0095] 另外,优选以使需要者能够直接认知上述用途的表达方式来进行“标示”。具体而

言,可列举出:对饮食品涉及的商品或商品的包装上记载有上述用途的产品进行转让、交付、以转让或交付为目的展示、进口的行为;在商品相关的广告、价格表或交易文件中记载上述用途进行展示或发布、或在包含这些信息中记载上述用途并通过电磁(互联网等)方法进行提供的行为等。

[0096] 另一方面,作为标示内容,优选为政府等认可的标示(例如,基于政府规定的各种制度获得认可,以基于该认可的方式进行标示等)。另外,优选将这样的标示内容附加到包装、容器、产品目录、宣传册、POP(Point of purchase advertising)等销售现场的宣传材料、其它文件等中。

[0097] 另外,“标示”还可以列举出:作为保健食品、功能性食品、病患食品、肠内营养食品、特殊用途食品、保健功能食品、特定保健用食品、功能性标示食品、营养功能食品、药物用准药品等的标示。其中,尤其可列举出日本消费厅认可的标示,例如,基于特定保健用食品制度、功能性标示食品制度、与这些类似的制度获得认可的标示等。更具体而言,可以列举出:作为特定保健用食品的标示、作为附带条件的特定保健用食品的标示、作为功能性标示食品的标示、对身体结构或功能有影响的标示、疾病风险降低的标示等。其中,作为典型例子是健康增进法施行规则(平成15年4月30日日本国厚生劳动省令第86号)中规定的作为特定保健用食品的标示(尤其是保健用途的标示)、食品标示法(平成25年法律第70号)中规定的作为功能性标示食品的标示和与这些类似的标示等。

[0098] 需要说明的是,用于进行上述那样的标示的表述不仅限于“用于抗焦虑”、“用于改善睡眠”、“用于抗抑郁”、“用于改善学习障碍和/或记忆障碍”等表述,也包括除此以外的其它表述,只要是表达抗焦虑效果、睡眠改善效果、抗抑郁效果、学习障碍和/或记忆障碍改善效果等的表述,都涵盖在本技术的范围内,这是不言自明的。作为这种表述,例如可以是基于使需要者认识到抗焦虑效果、睡眠改善效果、抗抑郁效果、学习障碍和/或记忆障碍改善效果等之类的各种用途的标示。

[0099] 将本技术所涉及的组合物用于饲料时,可以通过向公知的饲料中添加本技术所涉及的肽来制备,也可以通过在饲料的原料中混合该肽而制造新的饲料。

[0100] 另外,将本技术所涉及的肽用于饲料时,可以直接或浓缩后、或者加工成固体状、液体状、颗粒状或粉末状后使用。

[0101] 作为上述饲料的原料,可列举例如玉米、小麦、大麦、黑麦等谷类;麸皮、麦糠、米糠、脱脂米糠等糠类;玉米蛋白粉、玉米酱等制造粕类;脱脂奶粉、乳清、鱼粉、骨粉等动物性饲料类;啤酒酵母等酵母类;磷酸钙、碳酸钙等矿物质饲料;油脂类;氨基酸类;糖类等。

[0102] 作为上述饲料的形态,可列举例如观赏动物用饲料(例如宠物食品等)、家畜饲料、鱼饲料等。

[0103] 本技术所涉及的组合物中的本技术所涉及的肽的含量或使用量没有特别限定,优选以可有效地得到抗焦虑效果或睡眠改善效果的范围且能够不勉强摄取的程度来含有。

[0104] 另外,本技术所涉及的组合物的给予或摄取间隔、给予或摄取时期也没有特别限定。

[0105] 如上所述,认为本技术所涉及的肽能够预防、改善或治疗与5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体相关的各种疾病、症状,因此以其为有效成分的本技术所涉及的组合物例如能够用于治疗、预防和/或改善抑郁症、双相情感障碍、精神分裂症、焦虑性神经症或睡眠障碍。

- [0106] 本技术还可采用以下构成。
- [0107] (1)下述(a)或(b)的肽在抗焦虑用组合物中的应用。
- [0108] (a)序列号1记载的氨基酸序列
- [0109] (b)在序列号1记载的氨基酸序列中置换、缺失或添加1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列
- [0110] (2)上述(a)或(b)的肽的、用于制造抗焦虑用组合物中的应用。
- [0111] (3)上述(a)或(b)的肽的、用于治疗、预防和/或改善抑郁症、双相情感障碍、精神分裂症、焦虑性神经症或睡眠障碍的应用。
- [0112] (4)一种治疗、预防和/或改善抑郁症、双相情感障碍、精神分裂症、焦虑性神经症或睡眠障碍的方法,以上述(a)或(b)的肽为有效成分。
- [0113] (5)上述(a)或(b)的肽在睡眠改善用组合物中的应用。
- [0114] (6)上述(a)或(b)的肽的、用于制造睡眠改善用组合物中的应用。
- [0115] (7)上述(a)或(b)的肽在抗抑郁用组合物中的应用。
- [0116] (8)上述(a)或(b)的肽的、用于制造抗抑郁用组合物中的应用。
- [0117] (9)上述(a)或(b)的肽在学习障碍和/或记忆障碍改善用组合物中的应用。
- [0118] (10)上述(a)或(b)的肽的、用于制造学习障碍和/或记忆障碍改善用组合物中的应用。
- [0119] (11)治疗、预防和/或改善选自由焦虑、睡眠障碍、抑郁、学习障碍及记忆障碍组成的组中的任意1种以上的方法,其使用下述(a)或(b)的肽。
- [0120] (a)序列号1记载的氨基酸序列
- [0121] (b)在序列号1记载的氨基酸序列中置换、缺失或添加1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列
- [0122] (12)治疗、预防和/或改善选自由抑郁症、双相情感障碍、精神分裂症及焦虑性神经症组成的组中的任意1种以上疾病的方法,其使用下述(a)或(b)的肽。
- [0123] (a)序列号1记载的氨基酸序列
- [0124] (b)在序列号1记载的氨基酸序列中置换、缺失或添加1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列
- [0125] 实施例
- [0126] 以下基于实施例更详细地说明本技术。
- [0127] 需要说明的是,以下说明的实施例示出本技术的代表性的实施例的一例,本技术的范围并不因此而缩小解释。
- [0128] 制造例1:通过乳清蛋白的酶解而制造肽NLPPLT
- [0129] 将市售的乳清蛋白浓缩物1kg溶解于9kg的纯化水,利用板式灭菌装置在75℃下灭菌15秒。然后添加氢氧化钠将溶液的pH调节为9.0后,添加蛋白水解酶进行水解,得到包含NLPPLT的溶液。然后使酶失活,通过常规方法进行浓缩、干燥,得到含有肽NLPPLT的粉末状的乳清蛋白分解物(以下记作“WPH”)约1kg。
- [0130] 制造例2:肽NLPPLT的化学合成
- [0131] 利用F-moc法化学合成了NLPPLT。脱保护后用反相HPLC(Waters 1525)进行纯化,冷冻干燥。对于得到的肽,通过LCMS确认分子量符合。

[0132] 试验例1:高架式十字迷宫试验

[0133] 将使25cm×5cm的2块平板(臂)交叉而成的十字路构成的高架式十字迷宫设置于距离地板50cm的高处。臂中的一者为具有高15cm的透明围挡的封闭臂,可供小鼠安全地行走而不会使其担心摔下。另一臂为不具有这样的围挡的开放臂,由于周围是开放的,恐高的小鼠通常不喜欢开放臂。但是,对小鼠的抗焦虑处置有使其在开放臂中的停留时间延长的倾向。因此,在抗焦虑作用确认试验中,小鼠在开放臂中的停留时间越长或进入次数越多,则抗焦虑活性越高。

[0134] <1>给予WPH的试验

[0135] 本申请的发明人们首先对制造例1中制备的WPH进行试验。

[0136] <1-1>试验方法

[0137] 对于雄性ddy小鼠,在试验前30分钟时以每1kg体重为10mg、30mg、或100mg的用量分别给予制造例1中制备的WPH,在30分钟后,将小鼠置于开放臂与封闭臂交叉处的中央平台上,进行试验(WPH给予组、n=6)。在开始后5分钟,记录小鼠在开放臂上停留的累积时间(time in open arms)、进入开放臂的次数(visit to open arms)、进入任一臂的总计次数(total visits)。

[0138] 另外,作为对照,对于未给予试验物质即上述WPH的雄性ddy小鼠也实施同样的试验(对照组、n=6)。

[0139] 根据得到的结果计算作为抗焦虑活性的指标的开放臂上的停留时间的比例(%)及进入开放臂的次数的比例(%),通过t检验来检验统计学上的差异显著性。

[0140] <1-2>试验结果

[0141] 下述表1示出试验结果。

[0142] [表1]

[0143] [表1]

[0144]

	开放臂上的停留时间的比例 (%)	进入开放臂的次数的比例 (%)
对照组	11.6	20.8
WPH (10 mg/kg) 给予组	18.9	28.4
WPH (30 mg/kg) 给予组	30.4*	32.4
WPH (100 mg/kg) 给予组	23.5	35.5*

[0145] 平均值(n=5-6), Tukey-Kramer检验, \*P<0.05相对于对照

[0146] 与对照相比,给予WPH使开放臂上的停留时间及进入开放臂的次数增加,确认WPH有抗焦虑活性。

[0147] <2>给予肽NLPPLT的试验

[0148] 本发明人们根据上述<1>的结果而着眼于上述WPH中所含的肽NLPPLT,对该肽也

进行了试验。

[0149] <2-1> 试验方法

[0150] 对于雄性ddy小鼠,在试验前30分钟以每1kg体重为3 $\mu$ g或10 $\mu$ g的用量给予制造例2中合成的肽NLPPLT,30分钟后将小鼠置于开放臂与封闭臂交叉处的中央平台上,进行试验(肽NLPPLT给予组、n=6)。在开始后5分钟,记录小鼠在开放臂上停留的累积时间(time in open arms)、进入开放臂的次数(visit to open arms)、进入任一臂的总计次数(total visits)。

[0151] 另外,作为对照,对于未给予试验物质即上述肽的雄性ddy小鼠,也实施同样的试验(对照组、n=6)。

[0152] 进而,为了研究作用机制,对于除了给予10 $\mu$ g/kg体重的制造例2中合成的肽NLPPLT以外还经口给予10mg/kg 5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体的拮抗剂WAY100135(Tocris Bioscience公司制)的雄性ddy小鼠,也实施同样的试验(肽NLPPLT+5-羟色胺拮抗剂给予组、n=5)。

[0153] 根据得到的结果计算作为抗焦虑活性的指标的开放臂上的停留时间的比例(%)、进入开放臂的次数的比例(%),通过Tukey-Kramer法检验统计学上的差异显著性。

[0154] <2-2> 试验结果

[0155] 下述表2及表3示出试验结果。

[0156] [表2]

[0157] [表2]

[0158]

	开放臂上的停留时间的比例 (%)	进入开放臂的次数的比例 (%)
对照组	20.9	26.7
肽 NLPPLT 给予组	33.1	35.1
肽 NLPPLT + 5-羟色胺拮抗剂给予组	25.9	28.6

[0159] 平均值(n=6)

[0160] [表3]

[0161] [表3]

[0162]

	开放臂上的停留时间的比例 (%)	进入开放臂的次数的比例 (%)
对照组	15.4	22.7
肽 NLPPLT (3 $\mu$ g/kg) 给予组	19.9	23.4
肽 NLPPLT (10 $\mu$ g/kg) 给予组	24.4	31.7

[0163] 平均值(n=8)

[0164] 与对照相比,给予肽NLPPLT使得开放臂上的停留时间增加,因此确认肽NLPPLT有抗焦虑活性。

[0165] 另一方面,同时给予肽NLPPLT和5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体的拮抗剂时,开放臂上的停留时间与单独给予肽时相比下降,成为与对照同等程度的比例。由此表明,肽NLPPLT的作用基于5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体的活化所介导的作用。

[0166] 另外,肽NLPPLT具有5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体的活化所介导的作用,这表明,不仅具有抗焦虑作用,还认为具有作为基于5-羟色胺5-HT<sub>1A</sub>受体的活化的作用之一的睡眠改善作用。

[0167] 试验例2:旷场试验

[0168] 实施作为用于筛选抗焦虑药的行为试验的旷场试验。利用给予抗焦虑药会使小鼠在场地中央停留的时间(以下记作“停留时间”)的比例下降这一点。给予30分钟后,观察行为5分钟。需要说明的是,在该旷场试验中,使用由中心相同、半径不同的多个同心圆构成的圆形场地。将场地中最中心侧的圆设为场地的中央,测定被置于该场地的中央的小鼠在场地的中央停留的时间。

[0169] <1>给予肽NLPPLT的试验

[0170] 本申请的发明人们着眼于肽NLPPLT进行了试验。

[0171] <2>试验方法

[0172] 对于雄性ddy小鼠,在试验前30分钟以每1kg体重为10 $\mu$ g、30 $\mu$ g或100 $\mu$ g的用量分别给予制造例2中合成的肽NLPPLT,30分钟后将小鼠置于场地的中央进行试验(肽NLPPLT给予组、n=5)。记录开始后5分钟内的停留时间。

[0173] 另外,作为对照,对于未给予试验物质即上述肽的雄性ddy小鼠也实施同样的试验(对照组、n=5-6)。

[0174] 由得到的结果计算停留时间的比例(%)作为抗焦虑活性的指标。

[0175] <3>试验结果

[0176] 下述表4示出试验结果。

[0177] [表4]

[0178] [表4]

	中心圆的停留 时间比例 (%)	进入中心圆的 次数的比例 (%)
对照组	0.3	1.5
[0179] 肽 NLPPLT (0.01 mg/kg) 给予组	0.6	1.7
肽 NLPPLT (0.03 mg/kg) 给予组	0.7	1.6
肽 NPPLT (0.1 mg/kg) 给予组	0.8	2.1

[0180] 平均值(n=5-6)

[0181] 与对照相比,肽NLPPLT的给予使停留时间增加,因此确认肽NLPPLT具有抗焦虑活

性。

[0182] 试验例3:悬尾试验

[0183] 实施用于筛选抗抑郁药的悬尾试验。一般认为,若将小鼠的尾部固定并吊起而使其处于不可逃避的条件下,最初时会尝试逃避而动来动去,随着时间的经过而绝望、不再动。另一方面,经抗抑郁药处置的小鼠的逃避行为时间增加、不动时间减少。即,不动时间减少时,评价为有抗抑郁效果。在给予起30分钟后,观察行为6分钟。

[0184] <1>给予WPH的试验

[0185] 本申请的发明人们首先对于制造例1中制备的WPH进行试验。

[0186] <1-1>试验方法

[0187] 对于雄性ddy小鼠,在试验前30分钟以每1kg体重为1mg、10mg或100mg的用量分别给予制造例1中合成的WPH,30分钟后将小鼠的尾部固定并吊起,进行试验(WPH给予组、n=9-11)。记录开始后6分钟内表现出不动行为的时间。

[0188] 另外,作为对照,对于未给予试验物质即上述肽的雄性ddy小鼠也实施同样的试验(对照组、n=9-11)。

[0189] 由得到的结果计算表现出不动行为的时间(秒),作为抗抑郁性的指标。

[0190] <1-2>试验结果

[0191] 下述表5示出试验结果。

[0192] [表5]

[0193] [表5]

[0194]

	不动时间(秒)
对照组	77.4
WPH (10 mg/kg) 给予组	55.5
WPH (30 mg/kg) 给予组	25.7*
WPH (100 mg/kg) 给予组	13.0*

[0195] 平均值(n=9-11). Tukey-Kramer检验, \*P<0.05相对于对照

[0196] 与对照相比, WPH的给予使表现出不动行为的时间减少, 因此可确认WPH有抗抑郁性。

[0197] <2>给予肽NLPPLT的试验

[0198] 本申请的发明人们着眼于肽NLPPLT进行了试验。

[0199] <2-1>试验方法

[0200] 对于雄性ddy小鼠,在试验前30分钟以每1kg体重为10 $\mu$ g、或30 $\mu$ g的用量分别给予制造例2中合成的肽NLPPLT,30分钟后将小鼠的尾部固定并吊起,进行试验(肽NLPPLT给予

组、n=5-6)。记录开始后6分钟内表现出不动行为的时间。

[0201] 另外,作为对照,对于未给予试验物质即上述肽的雄性ddy小鼠也实施同样的试验(对照组、n=5-6)。

[0202] 进而,为了研究作用机制,对于除了10 $\mu$ g/kg体重的制造例2中合成的肽NLPPLT以外还经口给予10mg/kg的AMPA受体拮抗剂NBQX(Cayman chemical公司制)的雄性ddy小鼠也实施同样的试验(肽NLPPLT+AMPA受体拮抗剂给予组、n=10-12)。

[0203] 由得到的结果,计算表现出不动行为的时间(秒),作为抗抑郁性的指标。

[0204] <2-2> 试验结果

[0205] 下述表6示出试验结果。

[0206] [表6]

[0207] [表6]

	不动时间(秒)
对照组	88.9
肽 NLPPLT (0.01 mg/kg) 给予组	15.7*
肽 NLPPLT (0.03 mg/kg) 给予组	27.1*

[0209] 平均值(n=7-8),Tukey-Kramer检验,\*P<0.05相对于对照,

[0210] 与对照相比,肽NLPPLT的给予使表现出不动行为的时间减少,由此确认肽NLPPLT有抗抑郁性。

[0211] 另外,使用AMPA受体拮抗剂的试验的结果如下述表7所示。

[0212] [表7]

[0213] [表7]

	不动时间 (秒)
对照组	99.0*
[0214] 肽 NLPPLT 给予组	23.0
肽 NLPPLT + AMPA 拮抗剂给予组	75.3*
AMPA 拮抗剂给予组	69.8

[0215] 平均值 (n=10-12)、Tukey-Kramer 检验, \*P<0.05 相对于 NLPPLT/NLPPLT:0.01mg/kg (p.o.) .NBQX:10mg/kg (i.p.)

[0216] 同时给予肽 NLPPLT 和 AMPA 受体拮抗剂的情况下, 表现出不动行为的时间与单独给予肽时相比显著增加。由此表明, 肽 NLPPLT 的作用是基于 AMPA 受体的活化所介导的作用。AMPA 受体已知与抗抑郁效果有关, 与本肽显示出抗抑郁作用这一点一致。另外, AMPA 受体已知还与记忆障碍及学习障碍有关, 也表明本肽可显示记忆障碍改善用途及学习障碍改善作用。

[0217] 产业上的可利用性

[0218] 本技术所涉及的肽可用于抗焦虑用途、睡眠改善用途、抗抑郁用途、以及学习障碍和/或记忆障碍改善用途。另外, 含有该肽作为有效成分的组合物可用于减少焦虑症状、降低精神上的压力、用来治疗、预防和/或改善抑郁症、双相情感障碍、精神分裂症、焦虑性神经症或睡眠障碍的药品或饮食品等广泛领域。

