(19) Octrooicentrum Nederland

(11) **1026931**

(12) C **OCTROOI**[20]

(21) Aanvrage om octrooi: **1026931**

(22) Ingediend: **31.08.2004**

(51) Int.Cl.:
C07K14/47 (2006.01) ***C12P21/06*** (2006.01)

(41) Ingeschreven:
01.03.2006 I.E. 2006/05

(47) Dagtekening:
01.03.2006

(45) Uitgegeven:
01.05.2006 I.E. 2006/05

(73) Octrooihouder(s):
Friesland Brands B.V. te Meppel.

(72) Uitvinder(s):
Jaap de Slegte te Doetinchem.
Gijsbertus Klarenbeek te Ommen.

(74) Gemachtigde:
Mr.Ir. J.H.F. Winckels c.s.
te 2508 DH Den Haag.

(54) **ACE-remmende wei-hydrolysaten.**

(57) De uitvinding heeft betrekking op verbindingen met een bloeddrukverlagend effect. Meer in het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op het vrijmaken van ACE (angiotensine I converterend enzym)-remmende peptiden uit wei-eiwitten. De uitvinding verschaft een werkwijze voor het enzymatisch produceren van een eiwit hydrolysaat met angiotensine converterend enzym (ACE)-remmende activiteit, gekenmerkt door het behandelen van een beta-lactoglobuline (BLG)-bevattend substraat met een breed spectrum endoprotease in een eerste reactiestap gevolgd door het behandelen met een proline-specifiek endoprotease in een tweede reactiestap. Ook betreft de uitvinding in ACE-remmende hydrolysaten verkrijgbaar volgens een dergelijke werkwijze en toepassing van de hydrolysaten.

NL C1026931

De inhoud van dit octrooi komt overeen met de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).
Octrooicentrum Nederland is het Bureau voor de Industriële Eigendom, een agentschap van het ministerie van Economische Zaken

Titel: ACE-remmende wei-hydrolysaten.

De uitvinding heeft betrekking op verbindingen met een bloeddruk-verlagend effect. Meer in het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op het vrijmaken van ACE (angiotensine I converterend enzym)-remmende peptiden uit wei-eiwitten.

Hypertensie of hoge bloeddruk vormt een belangrijke risicofactor voor de ontwikkeling van hart- en vaatziekten, die in de Westerse wereld de voornaamste doodsoorzaak zijn. Naar schatting lijdt 1 op 5 volwassenen in de wereld aan een hoge bloeddruk. We spreken van hoge bloeddruk als de bovendruk (systolische bloeddruk) gemiddeld 140 mm Hg of hoger is, of als de onderdruk (diastolische bloeddruk) gemiddeld 90 mmHg of hoger is. Voor vrouwen in verwachting gelden in het algemeen lagere waarden. Kinderen hebben een bloeddruk die normaal onder de 120/70 mmHg ligt. Hoge bloeddruk versnelt de veroudering van de slagaders en belast het hart zwaarder. Hoe ouder een slagader, hoe meer kans er bestaat dat deze beschadigd wordt. Hoge bloeddruk beschadigt alle slagaders van het organisme, hetgeen kan leiden tot een hartaanval, een beroerte of beschadiging van de nieren. Om dit te vermijden, dient hoge bloeddruk met medicatie te worden behandeld. Traditioneel wordt hoge bloeddruk tegengegaan door antihypertensieve geneesmiddelen toe te dienen en door de voedingsgewoonten en levensstijl aan te passen. ACE speelt een belangrijke rol bij het op peil houden van de bloeddruk. In het menselijk lichaam bewerkstelligt ACE de vorming van angiotensine-II uit angiotensine-I. Toename van de hoeveelheid angiotensine-II in het bloed heeft onder meer de volgende effecten: (1) vernauwing van de bloedvaten (= vasoconstrictie) en daarmee hypertensie; (2) afgifte van aldosteron uit de bijnierschors en vasopressine (= anti-diuretisch hormoon = ADH) uit de

hypofyse-achterkwab. Deze beide hormonen zorgen er dat de nieren meer water vasthouden, waardoor het bloedvolume groter wordt en (3) toename van het dorstgevoel, waardoor meer water wordt gedronken.

Blokkering van ACE en voorkoming van een toename van de hoeveelheid angiotensine-II in het bloed resulteert in een daling van bloeddruk bij hypertensieve patiënten. ACE remmers zijn dan ook belangrijk in de bestrijding van hoge bloeddruk in de geneeskunde. Echter, een nadeel van de vele farmaceutische preparaten met synthetische ACE remmers die op de markt zijn is dat ze vaak vervelende bijwerkingen hebben, zoals droge hoest.

In de literatuur is de laatste 10 jaar geregeld geschreven over bioactieve peptiden die melkeiwitten in potentie in zich hebben. Er zijn allerlei hydrolysaten van melkeiwitten vervaardigd, hetzij met behulp van enzymen of *in situ* via fermentatie processen (kaas, yoghurt), waarin deze bioactieve peptiden zijn aangetoond. Eén van de belangrijkste eigenschappen van deze bioactieve peptiden is bloeddrukverlaging via het remmen van de ACE reactie. ACE-remmende peptiden - hetzij als eiwithydrolysaat hetzij *in situ* gevormd via fermentatie- zijn aantrekkelijke 'natuurlijke' bloeddrukverlagende verbindingen.

Bepaalde peptiden blijken zeer doeltreffend in de preventie en de behandeling van een hoge bloeddruk. Het is niet exact bekend aan welke structurele karakteristieken ACE-remmende peptiden moeten voldoen, maar er bestaat wel enigerlei overeenkomst tussen de peptiden die al een bewezen ACE-remming hebben. Het zijn over het algemeen korte peptiden (2-4 aminozuren) met een hydrofoob aminozuur aan de C-terminale kant. Ook wordt vaak het aminozuur proline genoemd dat zich dan eindstandig, meestal C-terminaal, aan het peptide bevindt.

De Japanse firma Calpis Co. Ltd heeft via fermentatie ACE-remmende peptiden verkregen. Dit zijn veelal kleine peptiden die worden gekenmerkt door de aanwezigheid van het aminozuur proline en een hoge

ACE-remmende activiteit. De door fermentatie verkregen actieve peptiden bestaan voornamelijk uit de sequenties die proline in hun structuur hebben; te weten Val-Pro-Pro of Ile-Pro-Pro (Nakamura, Y. et al. (1996). J. Dairy Sci. 78; 777-783). Andere peptiden met een bloeddrukverlagende werking zijn beschreven in onder meer Nouchikusangiyou, Snow Brand, Symbicom AB en Nisshin Flour Milling Co Ltd [ref 10-17].

Een aantal bedrijven zijn recentelijk met hydrolysaten en/ of gefermenteerde producten met een ACE-remmende activiteit op de markt verschenen, in combinatie met een andere eigenschap. Zo beschrijft WO 01/85984 (Davisco) een werkwijze voor het vrijmaken van ACE-remmende peptiden uit wei-eiwitten met behulp van verschillende typen industrieel verkrijgbare proteases; waaronder varkens trypsine. Hierbij werd overigens niet uitgegaan van een eiwit concentraat maar van een gezuiverd wei-eiwit product; wei-eiwit isolaten. Eén hydrolysaat, verkregen onder inwerking van trypsine, bleek bovendien een bloeddrukverlagend effect te hebben na orale toediening aan ratten. Dit hydrolysaat heeft een hydrolysegraad (%DH) van ongeveer 6% en is binnen de productrange BIOZATE (www.daviscofoods.com) op de markt gebracht. De hydrolysegraad geeft aan in welke mate peptidebindingen van een eiwit gehydrolyseerd zijn ten gevolge van een enzymatische hydrolyse reactie. Een %DH van 50 geeft aan dat een bepaald enzym 50% van de voor dat enzym beschikbare peptidebindingen heeft gehydrolyseerd. Daarnaast is een aanvullende eigenschap voor een dergelijk type hydrolysaat beschreven (WO 03/063778), waarbij het peptidenmengsel behalve ACE remming ook een cholesterol (low-density lipoprotein) -verlagend effect zou hebben.

WO 01/32906 van Valio beschrijft het fermenteren van caseïne met behulp van melkzuurbacteriën om peptiden vrij te maken die bloeddrukverlagend werken. Het langs deze weg geproduceerde product is als een gefermenteerd product op de markt gebracht onder de naam Evolus. Ook dit product zou een aanvullende eigenschap hebben; te weten het

verhogen c.q. het onder invloed van deze peptiden versterken van de absorptie van mineralen. Ook deze peptiden kenmerken zich, vergelijkbaar met het product van CALPIS, door hoge concentraties aan Val-Pro-Pro of Ile-Pro-Pro peptiden.

Vanzelfsprekend is het voor een meetbare bloeddrukverlaging belangrijk dat de actieve peptiden / hydrolysaten voldoende ACE-remmende activiteit hebben. De ACE-remmende activiteit van ACE-remmer, zoals een peptide of hydrolysaat, wordt gewoonlijk uitgedrukt als een IC50 waarde. Deze waarde geeft de concentratie peptide / hydrolysaat aan die nodig is om de ACE-activiteit met 50% te reduceren. Hoe lager de IC50 waarde van een ACE-remmer, hoe sterker de ACE-remmende activiteit.
Het doel van de uitvinding is het verschaffen van hydrolysaten met een sterke ACE-remmende activiteit.

Hiertoe verschaft de uitvinding een werkwijze voor het enzymatisch produceren van een eiwit hydrolysaat met angiotensine converterend enzym (ACE)-remmende activiteit, omvattende het behandelen van een beta-lactoglobuline (hierna: BLG)-verrijkt eiwit substraat met een breed spectrum endoprotease in een eerste reactiestap gevolgd door het behandelen met een proline-specifiek protease in een tweede reactiestap. Een dergelijke werkwijze levert een eiwit hydrolysaat op met een IC50 waarde die ten minste driemaal lager is in vergelijking met de bekende hydrolysaten met ACE-remmende activiteit (zie Tabel 1). In de eerste reactiestap wordt het eiwit substraat gehydrolyseerd tot een vrij hoge hydrolysatiegraad, veelal ongeveer 10 tot ongeveer 15%, teneinde proline-bevattende peptiden beschikbaar te maken als substraat voor een proline-specifiek protease, zodat in de tweede stap peptiden met een C-terminaal proline-residu worden gevormd.

Een tweestaps hydrolyseproces volgens de uitvinding met een eerste hydrolyse stap met een breedwerkend protease, een tweede hydrolysestap met een proline-specifiek protease toegepast op een BLG-rijk

eiwitsubstraat is nog niet eerder beschreven. Het gebruik van BLG of een BLG-rijk wei-eiwit concentraat als bron van ACE-remmende peptiden is wel bekend, maar niet eerder werd daarbij gebruik gemaakt van een proline-specifiek protease. Abukabar et al. bepaalden de ACE-remmende activiteit van wei-eiwit hydrolysaten bereid met 7 verschillende enzymen: trypsine, proteinase-K, actinase-E, thermolysine, papaine, pepsine en chymotrypsine. De enzymspecificiteit bleek een groot effect te hebben op de ACE-remmende activiteit van de resulterende hydrolysaten, en de biologische activiteit bleek afkomstig te zijn van de 4 dominante eiwitten in wei (BLG, alfa-lactoglobuline; AL, bloedserumalbumine, BSA; en immuunglobulinen, Ig) (Abubakar et al. 1996, Tokohu J. Agric. Res., 47(1-2):1-8). Recenter werk van Abubakar et al. beschrijft de identificatie van 9 peptide sequenties, waarvan BLG tripeptide (f78-80; Ile-Pro-Ala) de sterkste bloeddrukverlagende werking vertoonde in hypertensieve ratten (Abubakar et al. 1998. J. Dairy Sc., 12:3131-3138). Mullaly et al. isoleerden uit een hydrolysaat van runder BLG verkregen met trypsine het peptide (f142-148). Dit peptide heeft een IC50 waarde van 43 µmol/L (Mulally et al. 1997. FEBS Letters, 402:99-101). Ook zijn hydrolysaten van BLG-verrijkt wei-eiwit isolaat bereid en getest op hun ACE-remmende activiteit. WO 01/85984 (Davisco International Foods, Inc) beschrijft de vervaardiging van ACE-remmende hydrolysaten door middel van varkens trypsine of een bacterieel protease toegepast op verschillende commerciële wei-eiwit concentraten. Hierbij wordt een vergelijking gemaakt tussen de ACE-remmende werking van een hydrolysaat verkregen uit een standaard wei-eiwit isolaat (94% eiwit) verkregen door ionenwisselaar chromatografie (*Bi*PRO, Davisco Foods International, LeSueur, MN) en een BLG-verrijkt wei-eiwit isolaat. De hydrolysaten verkregen uit het gezuiverde standaard isolaat bleken een lagere IC50 waarde hebben (290-450 µg/ml) dan de hydrolysaten verkregen uit het BLG-verrijkte isolaat (530-900 µg/ml). Dit was verrassend, aangezien peptide (f142-148) uit BLG, dat in de studie als referentie werd

gebruikt, de laagste IC50 waarde had (40 µg/ml). WO01/85984 beschrijft dus, net als de uitvinding, de vervaardiging van een ACE-remmend hydrolysaat uit een BLG-verrijkt wei-eiwit concentraat. Echter, in WO01/85984 betreft de vervaardiging een enkele hydrolyse stap (hetzij met trypsine, hetzij met bacterieel protease) terwijl een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding wordt gekenmerkt door een tweestaps hydrolyseproces met een breed spectrum protease gevolgd door een proline-specifiek protease. Bovendien blijkt de ACE-remmende werking van een hydrolysaat volgens de uitvinding veel hoger te zijn dan die van bekende (hydrolysaten van) wei-eiwit concentraten (zie Tabel 3 hieronder).

De huidige vinding dat hydrolyse van BLG met een proline-specifiek endoprotease (PSE) in een werkwijze volgens de uitvinding een hydrolysaat oplevert met een relatief lage IC50 waarde is zeer verrassend. Zoals eerder vermeld bevatten bepaalde krachtige ACE-remmende tripeptiden (bv. Val-Pro-Pro of Ile-Pro-Pro) een hoge concentratie (eindstandige) proline residuen. Echter, géén van de bekende ACE-remmende peptiden afkomstig uit BLG (zie Tabel 2) bevat een C-terminaal proline residu, en slechts een paar peptiden (f(32-40); f(78-80); f(142-146) en f(142-148) bevatten een intern proline residue. Bovendien is het totale proline-gehalte in BLG relatief laag (5%) in vergelijking met bij voorbeeld caseïne (11%), een veelgebruikt melkeiwit voor de vorming van ACE-remmende peptiden door middel van (melkzuur)fermentatie. Onder inwerking van een PSE ontstaan uit BLG derhalve relatief weinig peptiden met een eindstandig proline-residu. Het ligt daarom niet voor de hand om een proline-specifiek endoprotease te gebruiken om ACE-remmende peptiden vrij te maken uit BLG. De uitvinding toont nu aan dat een hydrolysaat op basis van BLG na de tweestaps behandeling volgens de uitvinding een hogere ACE-remmende activiteit heeft dan een caseïne-hydrolysaat, ondanks het feit dat caseïne een hoger gehalte aan proline bevat (zie Tabel 1). Hieruit zou men kunnen concluderen dat bepaalde specifieke aminozuur sequenties met een

eindstandig proline bepalend zijn voor de ACE-remmende activiteit, en niet eindstandig proline bevattende peptiden in het algemeen.

Bij voorkeur wordt een werkwijze volgens de uitvinding toegepast op een substraat bestaande uit een mengsel van eiwitten waarvan ten minste 25% BLG is, zoals 30% of 35 % BLG, bij voorkeur ten minste 40% BLG, zoals 45%, 50% of 55%, bij grotere voorkeur ten minste 60% BLG, zoals 65% of 70%. Ook kan (gezuiverd) BLG als substraat worden gebruikt. Echter, het spreekt voor zich dat de productiekosten van een ACE-remmend hydrolysaat hoger zullen zijn naarmate een meer gezuiverd eiwitsubstraat als uitgangsmateriaal wordt gebruikt.

Een wei-eiwit concentraat dat is verrijkt met beta-lactoglobuline is een aantrekkelijk uitgangsmateriaal in een werkwijze volgens de uitvinding. Een BLG-verrijkt WEC kan verkregen worden door uit een WEC de overige wei-eiwitten, voornamelijk ALA, BSA en Ig, te laten precipiteren door specifieke condities aan te leggen. Een bepaalde combinatie van ontzouting, temperatuur en pH denatureert betreffende eiwitten, waarna ze aggregeren en centrifugaal of via membraanfiltratie kunnen worden afgescheiden.

Wei vormt 80 tot 90% van het totale volume van melk dat het productieproces ingaat en het bevat ongeveer 50% van de nutriënten van de originele melk als eiwitten, lactose, vitaminen en mineralen. Wei is in het verleden altijd als afval van de kaasindustrie beschouwd, echter het lozen van kaaswei veroorzaakt grote milieuproblemen. Doordat de eiwitten echter goede functionele eigenschappen hebben, is tegenwoordig de belangstelling voor het gebruik van wei voor de winning ervan groot. Slechts 0,55% van de wei bestaat uit eiwitten. Op drogestof basis is dit 10%. De wei-eiwitten vormen een heterogeen mengsel, waarvan de voornaamsten ß-lactoglobuline (50%), α-lactalbumine (ALA; 20%), bloedserumalbumine (BSA; 5%) en immuunglobulinen (Ig; 12%) zijn. Om het drogestofgehalte van wei te kunnen verhogen naar ten minste circa 50-60% wordt wei geconcentreerd of

gedroogd. Een wei-eiwitconcentraat (WEC) wordt gemaakt door wei te fractioneren en te concentreren door middel van ultrafiltratie. Naarmate verder wordt geconcentreerd ontstaan verschillende niveau's eiwit in het wei-eiwit concentraat. Industrieel geproduceerde WEC's worden verdeeld in de categorieën laag-eiwit WEC (eiwitgehalte tussen 25-40%), medium-eiwit WEC (eiwitgehalte tussen 45-60%) en hoog-eiwit WEC (eiwitgehalte tussen 60-80%). Hoe hoger het eiwitgehalte van een WEC, hoe meer BLG in het concentraat beschikbaar is voor hydrolyse tot ACE-remmende peptiden. Aangezien wei-eiwitten voor circa 50% bestaan uit BLG, bevat een hoog-eiwit WEC tussen 30-40% BLG, hetgeen voldoende is voor toepassing van een dergelijk WEC in een werkwijze volgens de uitvinding. Het BLG gehalte van laag- en medium-eiwit WEC's is echter vaak te laag. Voor WEC's met een eiwitgehalte van ongeveer 55-60% of lager is het dus noodzakelijk om te verrijken voor BLG. Geschikte commerciële WEC's zijn onder meer Domovictus 535 van BDI (35% eiwit waarvan 85% BLG); Hiprotal 880 van BDI (80% eiwit waarvan 50-55% BLG) en Hiprotal 580 (80% eiwit waarvan 80-85% BLG), allen verkrijgbaar bij Borculo Domo Ingredients (BDI), Zwolle, Nederland.

Als breed spectrum endoprotease in de eerste reactiestap in een werkwijze volgens de uitvinding kunnen verschillende typen endoproteasen gebruikt worden. Geschikte endoproteasen zijn van dierlijke, plantaardige of microbiële origine. Een microbieel breed spectrum endoprotease heeft de voorkeur, aangezien deze veelal gemakkelijk commercieel verkrijgbaar zijn tegen een relatief gunstige prijs. Ook chemisch of genetisch gemodificeerde mutant proteasen kunnen geschikt zijn. De breed spectrum endoprotease kan een serine protease of een metallo protease zijn, bij voorkeur een alkalische microbieel protease. Voorbeelden van alkalische proteasen zijn subtilisines (E.C. 3.4.21.62), in het bijzonder die afkomstig van *Bacillus* spp., b.v., subtilisine Novo, subtilisine Carlsberg, subtilisine 309, subtilisine 147 en subtilisine 168 (beschreven in WO 89/06279) en chymotrypsine (E.C.

3.4.21.1), die bij voorkeur de peptide binding hydrolyseren aan de C-terminale kant van hydrofobe aminozuren zoals Tyr, Trp, Phe en Leu. Ook kan in de eerste reactiestap een mengsel van twee of meer endoproteasen worden gebruikt. Geschikte commercieel beschikbare proteasen omvatten Alcalase™, Savinase™, Primase™, Everlase™, Esperase™ en Kannase™ (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OXP™, FN2™, en FN3™ (Genencor International Inc.), Corolase™ en Veron™ (AB Enzymes). Bij voorkeur wordt in de eerste reactiestap het enzym Alcalase™ gebruikt.In een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding wordt als breed spectrum protease een aspartaat protease gebruikt. Dit enzym heeft, net als PSE, een zuur pH optimum hetgeen als voordeel biedt dat de pH na de eerste stap niet hoeft worden aangepast. Eventueel wordt het aspartaat protease tegelijkertijd met het PSE toegepast in een éénstapshydrolyse. Echter, in dat geval moet rekening worden gehouden met het feit dat het breed-spectrum protease ook het PSE enzym kan hydrolyseren. De duur van de eerste reactiestap hangt af van verscheidene factoren, zoals het gebruikte enzym en/of het substraat. Bij voorkeur wordt gehydrolyseerd tot een hydrolysegraad van ten minste 8% is bereikt, bij grotere voorkeur ten minste 10%, zoals 12% of 15%. Voor de meeste genoemde breed-spectrum proteasen geldt dat, onder de voor dat enzym geschikte condities (pH, temperatuur, zoutconcentratie en dergelijke) een dergelijke hydrolysegraad in enkele uren bereikt kan worden.

Na de eerste incubatiestap wordt het gebruikte breed-spectrum endoprotease bij voorkeur geïnactiveerd om te voorkomen dat het PSE in de tweede reactiestap door het breed-spectrum protease gehydrolyseerd kan worden. Methoden voor enzym-inactivering zijn bij de vakman bekend, zoals een hittebehandeling of toepassing van een verbinding die de enzymactiviteit kan remmen.

De tweede reactiestap wordt uitgevoerd met een proline-specific endopeptidase (PSE; EC 3.4.21.26). Een geschikt PSE voor toepassing in de

werkwijze van de uitvinding is bij voorbeeld een proline specifiek endoprotease van *A. niger*, zoals het enzym dat op de markt bekend is onder de naam EndoPro en dat is beschreven in WO 02/45524. In een andere uitvoeringsvorm wordt in de tweede reactiestap een Proline Specifieke Endoprotease uit *Flavobacterium meningosepticum* gebruikt.

Voorts verschaft de uitvinding een eiwit hydrolysaat met angiotensine converterend enzym (ACE)-remmende activiteit, verkrijgbaar met een werkwijze zoals hierboven beschreven. Dit hydrolysaat wordt gekenmerkt door een sterke ACE-remmende activiteit (zie Tabel 3) en kan dus met voordeel worden toegepast voor het remmen van ACE activiteit in een zoogdier, zoals de mens. Ook is een hydrolysaat geschikt voor veterinaire toepassing, bij voorbeeld in een kat of hond. Aangezien remming van ACE een bloeddrukverlagend effect *in vivo* heeft, kan een ACE-remmend hydrolysaat worden gebruikt voor de behandeling van een verhoogde bloeddruk. Een hydrolysaat volgens de uitvinding kan verwerkt worden tot verschillende producten, zoals vloeibare en droge producten. Indien gewenst vindt down-stream processing plaats, bij voorbeeld in de vorm van een ultrafiltratie (UF)-behandeling. De enzymen hebben een veel groter molecuulgewicht dan de peptiden en kunnen door middel van UF van de ACE-remmende peptiden worden gescheiden. Bijkomend voordeel van een UF-stap is dat de eiwitsubstraten die niet door de enzymen zijn afgebroken ook van het biologisch actieve hydrolysaat gescheiden kunnen worden.

Aangenomen kan worden dat na orale inname de peptiden een hydrolysaat volgens de uitvinding in intacte of vrijwel intacte vorm in de maag terechtkomen, om vervolgens te worden opgenomen in de bloedbaan. Het breed-spectrum protease in de eerste reactiestap van een werkwijze volgens de uitvinding heeft een bredere substraatspecificiteit dan de brushborder proteasen in de darmwand, zodat het hydrolysaat volgens de

uitvinding niet of nauwelijks verder zal worden gehydrolyseerd na orale opname.

Eventueel kan een hydrolysaat in combinatie met andere ACE-remmers worden toegepast. In een ander aspect van de uitvinding wordt het ACE-remmende hydrolysaat preventief toegepast ter voorkoming van een hoge bloeddruk. Bij voorbeeld bij een persoon met een genetische aanleg voor een hoge bloeddruk of indien medicijnen worden gebruikt die als bijwerking een hoge bloeddruk kunnen geven.

Naast effectief bij hoge bloeddruk blijken ACE-remmers ook effectief te zijn bij hartfalen. Een ACE-remmend hydrolysaat verkrijgbaar met een werkwijze volgens de uitvinding kan derhalve ook bij hartproblemen worden toegepast, bij voorbeeld na een hartinfarct om herhaling te voorkomen.

De uitvinding voorziet hiermee in een behandelingsmethode om ACE-activiteit in een zoogdier te remmen, omvattende het toedienen, bij voorkeur oraal, van een ACE-remmend hydrolysaat verkregen volgens de werkwijze van de uitvinding in hoeveelheid en met een frequentie die voldoende is om de ACE-activiteit te remmen.

Nog een ander aspect van de onderhavige uitvinding betreft een behandelingsmethode om symptomen van een hoge bloeddruk in een zoogdier te verminderen, omvattende het toedienen, bij voorkeur oraal, van een hydrolysaat volgens de uitvinding in hoeveelheid en met een frequentie die voldoende is om de symptomen van een hoge bloeddruk te remmen.

Ook verschaft de uitvinding een samenstelling omvattende een ACE-remmend hydrolysaat volgens de uitvinding. Een dergelijke samenstelling met een ACE-remmende / bloeddrukverlagende activiteit is bij voorbeeld een farmaceutische samenstelling of een voedings- of genotsmiddel. Een ACE-remmende samenstelling kan een vaste of een vloeibare vorm hebben. Het is bij voorbeeld een poeder of een tablet. Bij voorkeur heeft de ACE-remmende samenstelling volgens de uitvinding een

vloeibare vorm, zoals een vloeibaar melkproduct, een vruchtensap of een ander type drinkbaar product dat onder meer gebruikt kan worden ter preventie of ter behandeling van een hoge bloeddruk.

EXPERIMENTEEL GEDEELTE

1. *In vitro* meting van ACE remming

De *in vitro* meting van de ACE remmende activiteit van peptiden of een ander product (b.v. hydrolysaat) werd als volgt uitgevoerd:

- Product wordt opgelost in meetbuffer bestaande uit boraat, natriumchloride op pH 8,3
- Het substraat dat voor de meting wordt gebruikt is Hippuryl-His-Leu van Sigma (H1635)
- Het ACE enzym is ook afkomstig van Sigma (A 6778)

In een microcuvet wordt het substraat bij 38°C geïncubeerd met ACE enzym en activiteit spectrofotometrisch gevolgd bij 260 nm. Bij aanwezigheid van een te testen peptide c.q. hydrolysaat wordt de remming van deze activiteit gemeten en uitgedrukt als de benodigde hoeveelheid product nodig om activiteit enzym met 50% te reduceren. Deze remming c.q. inhibitie wordt bij vier verschillende concentraties van het te meten product bepaald.

Experiment 1

Door middel van een tweestaps hydrolyse proces worden ACE-remmende peptiden uit melk en wei-eiwitten vrijgemaakt. In de eerste stap werden eiwitten gehydrolyseerd met Alcalase (Novozymes), een breed spectrum endoprotease van *Bacillus lichenformis*. Hiertoe werd 2.5 gram eiwit opgelost in 50 ml water. De pH werd met 4 M NaOH op 8.0 gesteld. Het reactiemengsel werd in een schudwaterbad geplaatst bij een

temperatuur van 60°C, waarna het alcalase (125µl zuiver enzym) werd toegevoegd. De incubatie werd gedurende 4 uren uitgevoerd.
Aan het einde van de incubatietijd werd de pH op 5.0 gebracht met 4 M HCl. Vervolgens werd het breed-spectrum endoprotease geïnactiveerd door een incubatie van 5 minuten bij 95°C. Hierna was het reactiemengsel gereed voor de tweede reactiestap met het proline-specifieke endoprotease (PSE; ook wel endoprolyl hydrolase) EndoPro (DSM), een prolylhydrolase van *Aspergillus niger*.
Om een enzym/substraat ratio van 1U per gram eiwit te verkrijgen werd 556µl EndoPro aan het reactiemengsel toegevoegd. Vervolgens werd bij 50°C in een schudwaterbad geïncubeerd. Op tijdstippen t=0, 60, 180, 360 en 1440 minuten werden 200 µl monsters genomen welke tienmaal werden verdund en vervolgens 5 min. geïnactiveerd bij 95°C. Vervolgens werd de IC50 bepaald van de verkregen hydrolysaten. De resultaten zijn getoond in Tabel 1. De eiwit substraten die in dit experiment werden getest zijn:

1. Domovictus 535 (BDI); een WEC met circa 35% eiwit waarvan circa 85% BLG
2. Hiprotal 580 (BDI); een WEC met 80% eiwit waarvan 80% BLG
3. Caseïne (Sigma)
4. Hiprotal 880 (BDI); een WEC met 80% eiwit waarvan 50% BLG
5. Beta-lactoglobuline (Sigma)
6. Alfa-lactalbumine (Sigma)

Tabel 1. Effect van behandeling met proline-specifiek protease op ACE-remmende activiteit uitgedrukt als IC50 (µg/ml) van een eiwitsubstraat dat tevoren is behandeld met een breed spectrum protease.

Nr	Eiwitsubstraat	t=0 (min)	60	180	360	1440
1	Domovictus 535	30.1	23.1	14.6	15.4	16.8
2	Hiprotal 580	20.1	13.8	7.6	11.2	14.7
3	Caseïne	64.2	35.2	27.2	23.2	19.8
4	Hiprotal 880	20.4	14.8	11.4	10.1	20.3
5	ß-lactoglobuline	23.0	14.6	13.3	10.8	18.7
6	α-lactalbumine	26.9	24.5	26.9	24.0	20.8

Na de eerste hydrolysestap met een breedwerkend protease hebben de hydrolysaten een IC50 waarde variërend van 20.1 µg/ml (Hiprotal 580) tot 64.2 µg/ml (caseïne) zoals weergegeven in kolom t=0 van Tabel 1. Een vervolgbehandeling met een proline-specifiek endoprotease (PSE) gedurende 60 minuten blijkt voor Hiprotal 580, Hiprotal 880 en BLG voldoende te zijn om een IC50 waarde lager dan 15 µg/ml te verkrijgen. Een 3-uurs incubatie met PSE heeft een verdere verlaging van de IC50 waarden tot gevolg, waarbij voor het Hiprotal 580-hydrolysaat (ook wel Hydrohiprotal 980 genoemd) een zeer lage waarde van 7.6 µg/ml wordt verkregen. Verlenging van de incubatieperiode tot 6 uren (t=360 min) met een proline-specifiek protease geeft voor een aantal eiwit substraten een verdere (kleine) verlaging van de IC50 waarde, terwijl de IC50 waarden voor de meeste substraten na een 24-uurs incubatie (t=1440 min) weer een verhoging vertonen. Er lijkt dus een zekere optimale incubatieperiode te bestaan, hetgeen verklaard zou kunnen worden door het feit dat bij verregaande hydrolyse de juist gevormde peptiden met ACE-remmende activiteit verder worden afgebroken tot peptiden met een lagere ACE-remmende activiteit.

De resultaten in Tabel 1 laten zien dat hydrolysaten bereid uit een BLG rijk eiwit substraat (Domovictus 535, Hiprotal 580, Hiprotal 880 en BLG)

volgens een tweestaps procedure een angiotensine-I-converterend enzym (ACE) remmende activiteit bezitten die ongeveer driemaal lager is dan tot nu toe is waargenomen voor wei-eiwitten. Verder blijkt uit de resultaten van Tabel 1 dat ondanks een hoger gehalte aan proline het caseïne substraat (11 % proline) na de tweestaps enzymbehandeling een lagere ACE-remmende activiteit geeft dan het hydrolysaat op basis van BLG rijke substraat (5 % proline). Blijkbaar zijn bepaalde specifieke sequenties met eindstandig proline bepalend en niet alleen eindstandig proline bevattende peptiden voor de ACE-remmende activiteit.

Tabel 2: Literatuur IC50 waarden voor ACE-remmende peptiden afkomstig van BLG.

Peptide	IC50 (µmol/L)	IC50 (µg/mL)	Referentie	Peptide	IC50 (µmol/L)	IC50 (µg/mL)	Referentie
f(142-148)	43	40	(8)	f(102-105)	172	95	(12), (8)
f(78-80)	141	42	(9)	f(104-105)	350	97	(12), (8)
f(9-14)	580	390	(10)	f(106-111)	788	515	(11)
f(15-20)	1682	1170	(10)	f(142-146)	521	296	(11)
f(22-25)	1062	430	(11)	f(146-149)	1153	620	(12), (8)
f(32-40)	635	616	(11)				
f(102-103)	122	86	(12), (8)				
f(81-83)	1029	404	(11)				
f(94-100)	946	807	(11)				

Experiment 2

In dit experiment is de *in vitro* ACE-remmende activiteit van een hydrolysaat volgens de uitvinding vergeleken (Hiprotal 580 behandeld gedurende 20 uren met Alcalase gevolgd door 3 uur hydrolyse met proline-specifiek endoprotease) met de ACE-remmende activiteit van de volgende commercieel verkrijgbare hydrolysaten, waarvan sommige een bloeddrukverlagend effect hebben.

- Hydrolysaat DMV (standaard eiwit hydrolysaat voor toepassing in kindervoeding)
- CE90 ACE (DMV product waarvan wordt beweerd dat het ACE remt; zie www.dmv-international.com)
- Hydrolysaat DI 3065 (Arla) (79.8% eiwit)
- Hydrolysaat LE 80 BM (DMV) (81.7% eiwit)
- Hydrolysaat CE 90 STL (DMV) (83.5% eiwit)
- Hydrolysaat CE90 CPP (DMV) (87.0% eiwit)

De hoeveelheid aanwezig eiwit voor de verschillende producten ligt tussen de circa 80 en 90%. Vooraf aan het meten van de ACE remmende activiteit, werd 200-250 mg product opgelost in 20 ml incubatie buffer. Nadat het product helemaal was opgelost, werd de oplossing nog eens 40x verdund met incubatie buffer. Deze verdunning werd gebruikt voor het bepalen van de ACE remmende activiteit. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3: Experimentele IC50 waarden van commerciële eiwit hydrolysaten in vergelijking met een ACE-remmend hydrolysaat volgens de uitvinding.

Product	IC50 µg/ml

Hydrolysaat van de uitvinding	7.2
Hydrolysaat DMV	47.0
CE90 ACE (DMV)	35.0
Hydrolysaat DI 3065 (Arla)	33.0
Hydrolysaat LE 80 BM (DMV)	44
Hydrolysaat CE90 STL (DMV)	>44
Hydrolysaat CE90 CPP (DMV)	>44
Evolus (VALIO)	>44
Biozate (DAVISCO)	62

Uit de verkregen resultaten blijkt dat de IC50 waarden van sommige commerciële producten (DMV, Arla, Davisco) in dezelfde range liggen als die van standaard melkeiwit hydrolysaten (30-40µg/ml). Verrassenderwijs ligt e de IC50 waarde van het BLG verrijkte hydrolysaat volgens de uitvinding ongeveer 5 maal lager (circa 7 µg/ml) en daarmede de activiteit 5 maal hoger dan andere standaard wei-eiwit hydrolysaten.

REFERENTIES

1. Process for producing fermented milk containing angiotensin converting enzyme inhibitory peptide and process for producing milk serum; CALPIS CO., LTD.; EP 1142481A1

2. Process for producing fermented milk containing angiotensin converting enzyme inhibitory peptide and process for producing milk serum; CALPIS CO., LTD.; EP 1142481A4

1026931

3. HIGH YIELD PRODUCTION OF CURDS AND WHEY CONTAINING AN ACE INHIBITOR PEPTIDE (VAL-PRO-PRO AND/OR ILE-PRO-PRO) MADE UNDER STIRRING CONDITIONS; CALPIS CO., LTD; NZ 0513305A

4. Process for producing granules containing angiotensin-converting enzyme inhibiting peptides; CALPIS CO., LTD.; US 6428812

5. GRANULES FOR ORAL ADMINISTRATION, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND TABLETS PRODUCED FROM THE GRANULES; CALPIS CO., LTD.; WO 0041677A1

6. GRANULATED MATERIAL, ITS PRODUCTION AND TABLET USING THE SAME; CALPIS CO., LTD.; JP 200020405A2

7. Method of purifying whey of lactic acid fermentation by electrodialysis; CALPIS CO. LTD; US 6204362

8. Mullally et al.; Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine ß-lactoglobulin; FEBS Lett. 402(1997), 99-101.

9. Abubakar et al.; Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion; J. of Dairy Sci. 81(1998), 3131-3139.

10. Pihlanto-Leppala et al.; Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins; Int. Dairy J. 8(1998), 325-331.

11. Pihlanto-Leppala et al.; Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides; J. of Dairy Res. 67(2000), 53-64.

12. NEW PEPTIDE AND ITS UTILIZATION; SNOW BRAND CO. LTD.; JP 0829088A2

13. Human ß-casein, process for producing it and use thereof; SYMBICOM AKTIEBOLAG; US 5739407

14. GENE ENCODING A HUMAN BETA-CASEIN PROCESS FOR OBTAINING THE PROTEIN AND USE THEREOF IN AN INFANT FORMULA; SYMBICOM EP 0599978A1

15. GENE ENCODING A HUMAN BETA-CASEIN PROCESS FOR OBTAINING THE PROTEIN AND USE THEREOF IN AN INFANT FORMULA; SYMBICOM AKTIEBOLAG; WO 9304172A3

16. GENE ENCODING A HUMAN BETA-CASEIN PROCESS FOR OBTAINING THE PROTEIN AND USE THEREOF IN AN INFANT FORMULA; SYMBICOM AKTIEBOLAG; WO 9304172A2

17. New peptide and angiotensin transferase inhibitor; NISSHIN FLOUR MILLING CO. LTD; JP 04082898A2

18. Enzymatic treatment of whey proteins for the production of antihypertensive peptides, the resulting products and treatment of hypertension in mammals; DAVISCO; WO 0185984

19. Reducing cholesterol with hydrolyzed whey protein; DAVISCO; WO 03/063778 A2.

20. Process for producing a product containing antihypertensive tripeptides; VALIO; WO 01/32906.

CONCLUSIES

1. Een werkwijze voor het enzymatisch produceren van een eiwit hydrolysaat met angiotensine converterend enzym (ACE)-remmende activiteit, gekenmerkt door het behandelen van een beta-lactoglobuline (BLG)-bevattend substraat met een breed spectrum endoprotease in een eerste reactiestap gevolgd door het behandelen met een proline-specifiek endoprotease in een tweede reactiestap.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk dat het substraat een wei-eiwit concentraat (WEC) is, bij voorkeur een WEC dat is verrijkt met beta-lactoglobuline (BLG).
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk dat het substraat ten minste 25%, bij voorkeur ten minste 35%, bij grotere voorkeur ten minste 60% BLG bevat.
4. Werkwijze volgens één der conclusies 1-3, met het kenmerk dat het breed spectrum endoprotease een serine protease, een metalloprotease of een aspartaat protease is.
5. Werkwijze volgens één der conclusies 1-4, met het kenmerk dat het breed spectrum endoprotease een microbieel protease is, bij voorkeur een protease geïsoleerd uit *Bacillus lichenformis* of *Bacillus subtilis*.
6. Werkwijze volgens één der conclusies 1-5, met het kenmerk dat het proline-specifieke endoprotease een proline-specifiek endoprotease is (PSE; EC 3.4.21.26)
7. Werkwijze volgens één der conclusies 1-6, waarbij de eerste reactiestap wordt uitgevoerd tot een hydrolysegraad van ongeveer 10 tot ongeveer 15% is bereikt.

8. Werkwijze volgens één der conclusies 1-7, waarbij de tweede reactiestap gedurende ten minste 0.5 uur, bij voorkeur ten minste 1 uur, bij grotere voorkeur ten minste 2 uren, bij grootste voorkeur ten minste 3 uren wordt uitgevoerd.

9. Werkwijze volgens één der conclusies 1-8, waarbij de tweede reactiestap gedurende ten hoogste 24 uren, bij voorkeur ten hoogste 16 uren, bij grotere voorkeur ten hoogste 10 uren wordt uitgevoerd.

10. Een eiwit hydrolysaat met angiotensine converterend enzym (ACE)-remmende activiteit, verkrijgbaar met een werkwijze volgens één der conclusies 1-9.

11. Samenstelling omvattende een hydrolysaat volgens conclusie 10, bij voorkeur een farmaceutische samenstelling of een voedings- of genotsmiddel.

12. Samenstelling volgens conclusie 11, waarbij de samenstelling een vloeibaar product is, zoals een melkproduct of een vruchtensap, of een vast product is, zoals een poeder.

13. Toepassing van een samenstelling volgens conclusie 11 of 12 voor het remmen van ACE activiteit in een zoogdier, bij voorkeur een mens, bij grotere voorkeur een mens met een verhoogde bloeddruk of een verhoogd risico op een verhoogde bloeddruk.

14. Een behandelingsmethode om ACE-activiteit in een zoogdier te remmen, omvattende het toedienen, bij voorkeur oraal, van een samenstelling volgens conclusie 11 of 12 in een hoeveelheid en met een frequentie die voldoende is om de ACE-activiteit te remmen.

15. Een behandelingsmethode om symptomen van een hoge bloeddruk in een zoogdier te verminderen, omvattende het toedienen, bij voorkeur oraal, van een samenstelling volgens conclusie 11 of 12 in een

hoeveelheid en met een frequentie die voldoende is om de symptomen van een hoge bloeddruk te remmen.

1026931

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)

RAPPORT BETREFFENDE NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	KENMERK VAN DE AANVRAGER OF VAN DE GEMACHTIGDE P69551NL00
Nederlands aanvraag nr. 1026931	Indieningsdatum 31 augustus 2004
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) Friesland Brands B.V.	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 43877 NL

I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)

Volgens de internationale classificatie (IPC)

Int.Cl.7: C07K14/47 C12P21/06

II. ONDERZOCHTE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie

Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
Int.Cl.7:	C07K C12P

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

III. ☐ **GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES** (opmerkingen op aanvullingsblad)

IV. ☐ **GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING** (opmerkingen op aanvullingsblad)

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1026931

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 7 C07K14/47 C12P21/06

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHTE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte miminum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
IPC 7 C07K C12P

Onderzochte andere documentatie dan de mimimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het internationaal nieuwheidsonderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)
EPO-Internal

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
	ONVOLLEDIG ONDERZOEK zie aanvullingsblad C -----	
A	NAKAMURA Y ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME INHIBITORS FROM SOUR MILK" JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION. CHAMPAIGN, ILLINOIS, US, deel 78, nr. 4, 1995, bladzijden 777-783, XP002912924 ISSN: 0022-0302 in de aanvraag genoemd het gehele document ----- -/--	

[X] Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

[X] Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

"A" document dat de algemene stand van de techniek weergeeft, maar niet beschouwd wordt als zijnde van bijzonder belang

"E" eerder document, maar gepubliceerd op de datum van indiening of daarna

"L" document dat het beroep op een recht van voorrang aan twijfel onderhevig maakt of dat aangehaald wordt om de publikatiedatum van een andere aanhaling vast te stellen of om een andere reden zoals aangegeven

"O" document dat betrekking heeft op een mondelinge uiteenzetting, een gebruik, een tentoonstelling of een ander middel

"P" document gepubliceerd voor de datum van indiening maar na de ingeroepen datum van voorrang

"T" later document, gepubliceerd na de datum van indiening of datum van voorrang en niet in strijd met de aanvrage, maar aangehaald ter verduidelijking van het principe of de theorie die aan de uitvinding ten grondslag ligt

"X" document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet als nieuw worden beschouwd of kan niet worden beschouwd op inventiviteit te berusten

"Y" document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet worden beschouwd als inventief wanneer het document beschouwd wordt in combinatie met één of meerdere soortgelijke documenten, en deze combinatie voor een deskundige voor de hand ligt

"&" document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid	Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van internationaal type
15 April 2005	
Naam en adres van de instantie European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	De bevoegde ambtenaar Smalt, R

1

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1026931

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	ABUBAKAR A ET AL: "STRUCTURAL ANALYSIS OF NEW ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDES DERIVED FROM CHEESE WHEY PROTEIN BY PROTEINASE K DIGESTION" JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION. CHAMPAIGN, ILLINOIS, US, deel 81, nr. 12, 1998, bladzijden 3131-3138, XP002937027 ISSN: 0022-0302 in de aanvraag genoemd het gehele document	
A	MULLALLY M M ET AL: "IDENTIFICATION OF A NOVEL ANGIOTENSIN-I-CONVERTING ENZYME INHIBITORY PEPTIDE CORRESPONDING TO A TRYPTIC FRAGMENT OF BOVINE BETA-LACTOGLOBULIN" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, deel 402, nr. 2/3, 3 februari 1997 (1997-02-03), bladzijden 99-101, XP001076810 ISSN: 0014-5793 in de aanvraag genoemd het gehele document	
A	WO 01/85984 A (DAVISCO INTERNATIONAL FOODS, INC; DAVIS, MARTIN, E; RAO, ANAND; GAUTHI) 15 november 2001 (2001-11-15) in de aanvraag genoemd het gehele document	
A	WO 03/063788 A (THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION; YI, TAOLIN) 7 augustus 2003 (2003-08-07) in de aanvraag genoemd het gehele document	

ONVOLLEDIG ONDERZOEK
AANVULLINGSBLAD C

Octrooiaanvrage Nr.:

SN 43877
NL 1026931

Ofschoon de conclusies 12-15 gericht zijn op een methode voor het therapeutisch behandelen van het menselijk of dierlijk lichaam, is het vooronderzoek uitgevoerd op basis van de veronderstelde werking van de verbinding/samenstelling.

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1026931

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)		Datum van publicatie
WO 0185984	A 15-11-2001	US	6630320 B1	07-10-2003
		AU	5962501 A	20-11-2001
		CA	2415688 A1	15-11-2001
		EP	1287159 A1	05-03-2003
		JP	2004519204 T	02-07-2004
		NZ	523036 A	30-04-2004
		WO	0185984 A1	15-11-2001
		US	2003171256 A1	11-09-2003
WO 03063788	A 07-08-2003	US	2003072738 A1	17-04-2003
		WO	03063788 A2	07-08-2003
		US	2003161893 A1	28-08-2003
		US	2004010045 A1	15-01-2004
		AU	2003241346 A1	17-11-2003
		WO	03092616 A2	13-11-2003