

(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
2013年9月12日(12.09.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/133031 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 5/083 (2006.01) A61P 9/14 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01) C12N 9/99 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/054291
- (22) 国際出願日: 2013年2月21日(21.02.2013)
- (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 2012-053855 2012年3月9日(09.03.2012) JP
- (71) 出願人: 森永乳業株式会社(MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1088384 東京都港区芝五丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 山田 明男(YAMADA Akio); 〒2528583 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社食品基盤研究所内 Kanagawa (JP). 桜井 琢磨(SAKURAI Takuma); 〒2528583 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社食品基盤研究所内 Kanagawa (JP). 越智 大介(OCHI Daisuke); 〒2528583 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社食品基盤研究所内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 渡邊 薫, 外(WATANABE Kaoru et al.); 〒1080074 東京都港区高輪2丁目20番29号
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: DIPEPTIDYL PEPTIDASE-IV INHIBITOR

(54) 発明の名称: ジペプチジルペプチダーゼ-IV阻害剤

(57) Abstract: Provided are a superior dipeptidyl peptidase-IV inhibitor and the like. Specifically provided is a peptide comprising the sequence Val-Pro-X (therein, X represents an amino acid residue other than an L-proline residue). Preferably, the group represented by X is selected from among residues of basic amino acids, neutral aliphatic amino acids, neutral amino acids having an amide group, and neutral aromatic amino acids. More preferably, the group represented by X is selected from among the residues of alanine, glutamine, methionine, asparagine, glycine, valine, tyrosine, serine and lysine. Also provided are a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, a hypoglycemic agent, a vascular endothelial dysfunction inhibitor, and an angiotensin-converting enzyme inhibitor, each comprising said peptide as an active ingredient.

(57) 要約: 優れたペプチジルペプチダーゼ-IV阻害剤等を提供すること。Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基(L-プロリン残基を除く)を示す〕; 前記Xは、塩基性アミノ酸残基、脂肪族中性アミノ酸残基、アミド基を有する中性アミノ酸残基又は芳香族を有する中性アミノ酸残基から選ばれるものであるのが好適である; 前記Xが、アラニン残基、グルタミン残基、メチオニン残基、アスパラギン残基、グリシン残基、バリン残基、チロシン残基、セリン残基及びピロリジン残基から選ばれるものが好適である; 前記ペプチドを有効成分として含有するジペプチジルペプチダーゼ-IV阻害剤、血糖値上昇抑制剤、血管内皮障害抑制剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤。

WO 2013/133031 A1

明 細 書

発明の名称：ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は、ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害剤等に関する。

背景技術

[0002] ジペプチジルペプチダーゼーIV (di-peptidyl peptidase-IV：以下、「DPP-4」ともいう)は、N末端ジペプチダーゼ活性を有する多機能性の貫通膜型糖タンパク質である。これは、大部分の哺乳類の細胞上に存在し、肝臓、腎臓、小腸、唾液腺、血液細胞及び血漿等の種々の組織に存在していることから、生体内での幅広い役割が想定され、創薬のターゲットとして近年注目されている酵素である。

[0003] ジペプチジルペプチダーゼーIVは、インクレチンのグルカゴン様ペプチド1 (以下、「GLP-1」という)及びグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (以下、「GIP」という)の分解酵素であることが知られている。このGLP-1は、食後に放出されるものであり、インスリンの生合成及び分泌に対するグルコース誘導性の刺激、グルカゴン分泌抑制、遺伝子発現の調整、B細胞に対する栄養性の効果、食物摂取の抑制、及び胃内容排出の緩徐化をはじめとする、多面的な作用を有する。そして、ジペプチジルペプチダーゼーIVを阻害することで、インクレチンのGLP-1及びGIPの分解が抑制され、血中のこれらの濃度が上昇する。その結果、インスリン分泌が促進され、血糖値を低下させることが知られている。このインクレチンによるインスリンの分泌促進は、血糖値が高値であることが作動条件である。このため、2型糖尿病の中でもインスリン分泌低下による糖尿病において、ジペプチジルペプチダーゼーIVを阻害することは、これまでのインスリン分泌促進剤で生じる低血糖症という副作用の危険性が少ないものと言える。

[0004] このように、ジペプチジルペプチダーゼーIV活性を阻害する作用を有す

るジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害剤に関して、抗糖尿病剤としての利用が期待されている。しかしながら、ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害剤は、インスリン分泌抑制剤及びブドウ糖吸収阻害剤等と比べて未だ新しいジャンルの治療薬と言え、新たなジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害作用を有する物質を数多く見出すことが望まれている。さらに、糖尿病の治療の第一歩は食事療法と運動療法であり、それでも血糖値のコントロールが出来ない場合に、糖尿病治療用医薬品が用いられているのが現状である。このようなことから、ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害活性を有する物質をサプリメントや食品添加物として提供することが可能であれば、広く血糖値の改善に資することができると考えられる。

[0005] 例えば、特許文献1には、二環系ピリミジンが、糖尿病治療用又は予防用のジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害剤として使用されることが開示されている。

また、例えば、特許文献2には、カゼインを、pH及び温度を調整してアルカリ分解した後、さらにプロテアーゼ等の各種酵素を調整して酵素加水分解した加水分解物から、種々のペプチドを分離精製し、さらにその中からジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害作用のあるものを見出したことが開示されている。その他にも食品由来のジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害物質についての開示がある（例えば、特許文献3～5参照）。

また、例えば、特許文献6の表2には、カゼイン又はホエイ加水分解物から1つのペプチドだけを単離した単離ペプチドである、IPI、LPL、KVLP、LPVPQK、VPLGTQ、VPYPQ、PLLQ、GPFQ、LPVPQ、LPQYL、MPLW、YVPEPF、PQSVLS、PFP、LPVP、EMPFQK、LPLP、GPFPIIV、APFPE、HPIK及びAPFPEVFが記載され、これら単離ペプチドのジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害試験結果が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特表2008-527011号公報

特許文献2：米国特許出願公開第2008/0075904号明細書

特許文献3：特開2011-144167号公報

特許文献4：特開2007-039424号公報

特許文献5：特開2008-280291号公報

特許文献6：国際公開2006/068480号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] このように、従来よりジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害剤が開示されているものの、例えば特許文献1においては、有機合成化合物は複雑な合成過程を必要とし、安全性に関しては今後の検証が必要である。いずれのジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害剤も検討すべき点があり、ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害物質についての探究は十分ではないのが現状であった。

また、ペプチドは有益な生理活性作用を有する場合があることから、新規ペプチドの探索及びペプチドの様々な生理活性作用の探求が行われている。しかし、ペプチド中のアミノ酸が増減したりアミノ酸の一部が異なると生理活性作用が低下若しくは消失することがあり、また、カゼイン等の乳由来の蛋白質の加水分解物中であっても無数のペプチドが混在するため、目的とする生理活性作用を有する新規又は既知のペプチドを見出すことは困難である。

よって、本発明は、優れたジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ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

[0008] 本発明者は、前記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、カゼインを特定の酵素で加水分解して得られたカゼイン加水分解物中に、ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害作用を有するペプチドが複数存在し、またその中に新規なペプチドが存在することも見出した。この結果から、ペプチドがⅤ

Val-Pro-X〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕（配列番号1）で表される配列を有するペプチド（以下、「ペプチドVPX」ともいう）を見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] しかも、このペプチドは食品由来の成分であったため安全性が高いと考えられ、このペプチドVPXはサプリメントや食品添加物として提供することも可能である。よって、本開示のペプチドVPXは、広く血糖値の改善に資することができると考えられる。また、本開示のペプチドVPXにはアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有するペプチドも存在するので、本開示のペプチドVPXは広く高血圧の改善に資することができると考えられる。

以上のことから、本開示のペプチドVPXは、より付加価値のある有効な物質と言える。

[0010] すなわち、本発明は、Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕である。

また、Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕を有効成分として含有するジペプチジルペプチダーゼ-1V阻害剤及び／又はアンジオテンシン変換酵素阻害剤である。

また、Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕を有効成分として含有する血糖値上昇抑制剤、高血糖改善剤、抗糖尿病剤、血圧降下剤、抗高血圧剤又は血管内皮障害抑制剤である。

前記Xは、塩基性アミノ酸残基、脂肪族中性アミノ酸残基、ヒドロキシ基を有する中性アミノ酸残基、アミド基を有する中性アミノ酸残基又は芳香族を有する中性アミノ酸残基であるのが好適である。

前記Xは、アラニン残基、グルタミン残基、メチオニン残基、アスパラギン残基、グリシン残基、バリン残基、チロシン残基、セリン残基及びリシン残基から選ばれるものであるのが好適である。また、L-アミノ酸が好適である。

前記ペプチドが、下記の (a) ~ (i) のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドから選ばれるものであるのが、好適である。

- (a) Val-Pro-Ala (VPA : 配列番号2)
- (b) Val-Pro-Gln (VPQ : 配列番号3)
- (c) Val-Pro-Met (VPM : 配列番号4)
- (d) Val-Pro-Asn (VPN : 配列番号5)
- (e) Val-Pro-Gly (VPG : 配列番号6)
- (f) Val-Pro-Val (VPV : 配列番号7)
- (g) Val-Pro-Tyr (VPY : 配列番号8)
- (h) Val-Pro-Ser (VPS : 配列番号9)
- (i) Val-Pro-Lys (VPK : 配列番号10)

発明の効果

[0011] 本発明は、本発明のペプチドVPXが優れたジペプチジルペプチダーゼーIV阻害作用を有することから、ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害剤、血糖値上昇抑制剤及び血管内皮障害抑制剤等を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本開示のペプチドVPAのMS/MS分析の結果を示す図である。
[図2]本開示のペプチドVPQのMS/MS分析の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本開示のペプチドは、Val-Pro-Xからなるペプチドで表されるアミノ酸配列 (配列番号1) を有する。

本開示において、Val (V) はバリン残基、Pro (P) はプロリン残基、Xは任意のアミノ酸残基を示す。これらアミノ酸残基はL型であるのが好ましい。

前記Xは、特に限定されないが、例えば、乳蛋白質分解物から得ることができるアミノ酸残基を挙げることができ、これらアミノ酸残基から選ばれるものが好ましい。また、前記Xは、20種の天然アミノ酸が好ましい。なお、遊離アミノ酸は、一般的に「 $^+H_3N - (R_1) CH - COO^-$ 」で示され、

本開示のペプチドは、「Val-Pro-HN-(R₁)CH-COOH」と示すことも可能である。

前記Xで示されるアミノ酸残基は、酸性アミノ酸残基、塩基性アミノ酸残基、中性アミノ酸残基に分類することが可能である。前記Xは、以下のアミノ酸残基の例示から1種又は2種以上選択することが可能である。

[0014] 前記酸性アミノ酸残基として、例えば、アスパラギン酸残基 (Asp (D)) 及びグルタミン酸残基 (Glu (E)) 等が挙げられる。このうち、好ましくはカルボニル基を2つもつものである。

前記塩基性アミノ酸残基として、例えば、リシン残基 (Lys (K))、アルギニン残基 (Arg (R))、ヒスチジン残基 (His (H)) 等が挙げられる。このうち、好ましくはアミノ基を2~4つもつものである。

[0015] 前記中性アミノ酸残基として、例えば、前記アミノ酸残基XのR₁に、水素及びアルキル基；ヒドロキシ基；硫黄；酸性アミド；芳香族を有するもの等が挙げられ、これらそれぞれを一般的に、脂肪族中性アミノ酸残基；ヒドロキシ基を有する中性アミノ酸残基；硫黄を有する中性アミノ酸残基；アミド基を有する中性アミノ酸残基；芳香族を有する中性アミノ酸残基と呼ぶことがある。

[0016] 前記脂肪族中性アミノ酸残基として、アラニン残基 (Ala (A))、グリシン残基 (Gly (G))、バリン残基 (Val (V))、ロイシン残基 (Leu (L))、イソロイシン残基 (Ile (I)) 等が挙げられる。このうち、前記アミノ酸残基XのR₁が水素又はアルキル基である、水素又はアルキル基を有する中性アミノ酸残基が好ましい。このアルキル基は、直鎖及び分岐鎖が好ましく、分岐鎖がより好ましい。また、前記脂肪族中性アミノ酸残基におけるR₁の炭素数は、好ましくは0~4であり、より好ましくは0~3である。さらに好ましくは、R₁=水素、メチル基 (-CH₃) 又はイソプロピル基 (-CH(CH₃)₂) である。

前記ヒドロキシ基を有する中性アミノ酸残基として、セリン残基 (Ser (S))、トレオニン残基 (Thr (T)) 等が挙げられる。前記アミノ酸

残基XのR₁が、ヒドロキシ基を有する炭素数1～2のアルキル基が好ましい。

前記硫黄を有する中性アミノ酸残基として、システイン残基(Cys(C))及びメチオニン残基(Met(M))等が挙げられる。

前記アミド基を有する中性アミノ酸残基として、グルタミン残基(Gln(Q))、アスパラギン残基(Asn(N))等が挙げられる。このうち、好ましくはアミノ基を2つもつものである。また、前記アミノ酸残基XのR₁がアミド基を有する炭素数1～2のアルキル基が好ましい。

前記芳香族を有する中性アミノ酸残基として、フェニルアラニン残基(Phe(F))、チロシン残基(Tyr(Y))、トリプトファン残基(Trp(W))等が挙げられる。前記アミノ酸残基XのR₁は、ヒドロキシ基を有していてもよいベンジル基(例えば、HO-C₆H₄-CH₂-又はH-C₆H₄-CH₂-等)が好ましく、この水酸基の数は0～1が好ましい。

[0017] 上述のアミノ酸残基のうち、塩基性アミノ酸残基及び中性アミノ酸残基が好ましい。前記中性アミノ酸残基のうち、さらに脂肪族中性アミノ酸残基、ヒドロキシ基を有する中性アミノ酸残基、アミド基を有する中性アミノ酸残基及び芳香族を有する中性アミノ酸残基が好ましい。さらに、脂肪族中性アミノ酸残基、アミド基を有する中性アミノ酸残基が好ましい。

前記Xで示されるアミノ酸残基のうち、アラニン残基、グルタミン残基、メチオニン残基、アスパラギン残基、グリシン残基、バリン残基、チロシン残基、セリン残基及びリシン残基から選ばれるものが好適である。このうち、アラニン残基、グルタミン残基、アスパラギン残基、グリシン残基、バリン残基、チロシン残基及びセリン残基が好ましい。さらに、生理活性の点で、アラニン残基、グルタミン残基及びバリン残基が好ましい。

ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害活性の点で、好ましくは、アラニン残基、グルタミン残基、アスパラギン残基、グリシン残基、バリン残基、チロシン残基、セリン残基及びリシン残基であり、またアンジオテンシン変換酵素阻害活性の点で特に好ましくは、アラニン残基及びリシン残基である。

[0018] また、本開示の新規なペプチドの具体的なものとして、以下のアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

Val-Pro-Ala (VPA: 配列番号2) Val-Pro-Gln (VPQ: 配列番号3)、Val-Pro-Met (VPM: 配列番号4)、Val-Pro-Asn (VPN: 配列番号5)、Val-Pro-Gly (VPG: 配列番号6)、Val-Pro-Val (VPV: 配列番号7)、Val-Pro-Tyr (VPY: 配列番号8)、Val-Pro-Ser (VPS: 配列番号9)、Val-Pro-Lys (VPK: 配列番号10) 等のトリペプチドが挙げられる。

[0019] また、本開示のペプチドは、このペプチドの塩類であってもよい。当該塩類としては、例えば、カリウム、ナトリウム等のアルカリ金属類；カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属類等が挙げられ、このうち適宜1種又は2種以上を使用すればよい。

[0020] 本開示のペプチドVPXの製造方法については、例えば国際公開2003/044044号パンフレット〔参考文献1〕等に記載されるような方法に準じて行うことが可能であり、以下の方法が例示されるが、これに特に限定されない。

例えば、Val-Pro-X (配列番号1) で表されるアミノ酸配列又は配列番号2～10で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質やペプチドを加水分解等にて分解し、得られた分解物から分離精製して得る方法；ペプチドの化学合成方法にてペプチドVPXを合成した後、得られた合成物からペプチドVPXを分離精製して得る方法；ペプチドVPX及びこれを含むペプチド等を生産する植物、動物や微生物から抽出し、得られた抽出物から分離精製する方法等が挙げられる。

[0021] 本開示のペプチドVPXは、例えばカゼイン等の蛋白質を、適宜、酸アルカリや酵素等にて加水分解することで、製造することが可能である。

原料蛋白質を加水分解酵素で加水分解して前記ペプチドVPXを得る方法を例示する。

まず、原料蛋白質を酵素で加水分解する前に、蛋白質を水に溶解、分散又は懸濁させる。

前記原料蛋白質は、VPXを含む蛋白質であって、適宜加水分解酵素で消化したときに本開示のペプチドが生成可能なものであれば、特に限定されない。前記蛋白質として、例えば、動物由来や微生物由来のもの等が挙げられ、大量に入手可能なカゼインが好適である。

このとき、原料蛋白質の性状により処法は異なるが、原料蛋白質が可溶性の場合には、原料蛋白質を水又は温水に分散し、溶解すればよく、また、難溶性の場合には熱水に蛋白質を混合攪拌にてホモジナイズすればよい。

[0022] そして、前記蛋白質を含有する溶液に、アルカリ剤又は酸剤を添加し、pHを適宜（例えばpH7～10）に調整してもよい。このpHは使用する加水分解酵素の至適pH又はその付近に調整することが好ましい。

前記アルカリ剤又は酸剤として、特に限定されず、食品又は医薬品に許容されるものを使用すればよい。アルカリ剤として、例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カルシウム等の水酸化物；炭酸カリウム等の炭酸塩などが挙げられ、これらはアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩でもよい。また、酸剤として、例えば、塩酸、リン酸等の無機酸；クエン酸、酢酸、ギ酸等の有機酸などが挙げられる。これらのうち、適宜1種又は2種以上を使用すればよい。

また、前記蛋白質を含有する溶液を70～90℃で15秒～10分間程度加熱殺菌することが、雑菌汚染による変敗防止の点から望ましい。

[0023] 次に、前記蛋白質を含有する溶液に、所定量の加水分解酵素を加え、温度10～85℃程度で0.1～48時間反応を行い、加水分解物を得る。

このとき、前記加水分解酵素を添加した後、当該溶液を、酵素の種類に応じて適当な温度、例えば30～60℃、望ましくは45～55℃に保持して、蛋白質の加水分解を開始するのが望ましい。

また、加水分解反応時間は、酵素反応の分解率をモニターしながら、好ましい分解率に達するまで反応を続ければよい。前記原料蛋白質の分解率は2

0～55%が、本開示のペプチドを得るためには、望ましい。

前記加水分解酵素反応の停止は、例えば、加水分解液中の酵素の失活により行われ、常法による加熱失活処理により実施することができる。加熱失活処理の加熱温度と保持時間は、使用した酵素の熱安定性を考慮し、十分に失活できる条件を適宜設定することができるが、例えば、80～130℃の温度範囲で30分間～2秒間の保持時間で行うことができる。

[0024] 前記加水分解酵素は、特に限定されないが、前記原料蛋白質を加水分解して本開示のペプチドを生成させ得る酵素であるのが好ましく、当該生成させ得る酵素として、具体的にはエンドペプチダーゼが好ましい。

[0025] 前記エンドペプチダーゼとして、例えば、微生物由来や動物由来のものがあるが、具体的には、バチルス (*Bacillus*) 属やアスペルギルス (*Aspergillus*) 属細菌由来のプロテアーゼ、及び動物臓器由来のプロテアーゼ等が挙げられる。前記プロテアーゼは市販されているものを利用することが可能である。市販品のプロテアーゼとして、例えば、プロテアーゼA (天野エンザイム社製) 等のアスペルギルス属細菌由来のプロテアーゼ; パンクレアチン(天野エンザイム社製)等の動物臓器由来のプロテアーゼ等が好ましいものとして例示できる。

例えば、アスペルギルス属細菌由来のプロテアーゼを使用する際には、蛋白質1g当たり100～5000活性単位の割合で添加するのが望ましい。また、動物臓器由来のプロテアーゼを使用する際には、蛋白質1g当たり3000～8000活性単位の割合で添加するのが望ましい。

本開示において用いる加水分解酵素は、単独で又は2種以上組み合わせて使用してもよい。2種以上の酵素を用いる場合には、それぞれの酵素反応は同時に又は別々に行ってもよい。

本開示において、パンクレアチン及びプロテアーゼを併用するのが好ましく、これら2酵素を混合して使用することが特に好ましい。

[0026] なお、原料蛋白質の分解率の算出方法は、ケルダール法 (日本食品工業学会編、「食品分析法」、第102頁、株式会社光琳、昭和59年) により試

料の全窒素量を測定し、ホルモール滴定法（満田他編、「食品工学実験書」、上巻、第547ページ、養賢堂、1970年）により試料のホルモール態窒素量を測定し、これらの測定値から分解率を次式により算出する。

$$\text{分解率 (\%)} = (\text{ホルモール態窒素量} / \text{全窒素量}) \times 100$$

[0027] 前記加水分解液物から、本開示のペプチドVPXを単離又は精製するのが好適である。

本開示のペプチドVPXの精製は、通常、オリゴペプチドの精製に用いられていると同様の手法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー、溶媒沈殿、塩析、2種の液相間での分配等の方法を適宜組み合わせることによって、行うことができる。

[0028] 本開示のペプチドVPXの単離又は精製に際しては、目的物質を含む画分は、後述するジペプチジルペプチダーゼーI V阻害作用及び／又はアンジオテンシン変換酵素阻害作用を指標として決定することができる。また、それらの画分の活性成分は質量分析法により同定することができる。

[0029] また、加水分解酵素によって得られる蛋白質分解物は、少なくともVPXが含まれるものが好ましく、さらに配列番号2～10で表されるアミノ酸配列を含有するように調製されたものが、より良好な活性成分の回収が容易な点で好ましい。

[0030] また、本開示のペプチドVPXは、化学合成によっても製造することができる。

本開示のペプチドVPXの化学合成は、オリゴペプチドの合成に通常用いられている液相法または固相法によって行うことができる。合成されたペプチドは必要に応じて脱保護され、未反応試薬や副生物等を除去して、本開示のペプチドVPXを単離することが可能である。

このようなペプチドの合成は、市販のペプチド合成装置を用いて行うことができる。目的とするペプチドが得られたことは、後述するジペプチジルペ

プチダーゼー I V 阻害作用及び／又はアンジオテンシン変換酵素阻害作用を指標として確認することができる。

[0031] 本開示のペプチド V P X は、後記実施例に示すとおり、ジペプチジルペプチダーゼー I V 阻害作用を有する。

ジペプチジルペプチダーゼー I V が、生体内の生理機能に関与している化合物を分解することで、種々の疾患や症状が生じる場合がある。このため、ジペプチジルペプチダーゼー I V を阻害すると、ジペプチジルペプチダーゼー I V によって分解されていた生体内の生理機能に関与している化合物の寿命が延びることを利用して、ジペプチジルペプチダーゼー I V に起因する疾患や症状の予防、改善又は治療が可能となる。

前記生理機能に関与する化合物として、例えば、インクレチンのグルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) 及びグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) が挙げられる。そして、このインクレチンのグルカゴン様ペプチド 1 の分解抑制によって、インスリンの生合成及び分泌に対するグルコース誘導性の刺激、グルカゴン分泌抑制、遺伝子発現の調整、B 細胞に対する栄養性の効果、食物摂取の抑制、及び胃内容排出の緩徐化などの各作用を奏することが可能である。

これによって、上昇した血糖値の正常化、並びに空腹感及び体重の改善・調整に寄与することが可能である。

[0032] また、ジペプチジルペプチダーゼー I V の作用によって、血管の内皮細胞の機能が低下したり、血管の内皮細胞が障害されることが知られている。この血管の内皮細胞の機能低下や障害によって、血管の緊張増加による血管収縮、動脈硬化、血栓形成等の血管障害が生じ、これらの原因によって臓器の血流障害が生じ、臓器機能不全となり、糖尿病の合併症が誘発されることとなる。

近年、ジペプチジルペプチダーゼー I V 阻害薬の投与による内皮細胞の機能改善効果が多数報告されている（例えば、参考文献 2～5 参照 [参考文献 2] *Endocrine Journal* 2011, 58 (1), 69-73 ; [参考文献 3] *J Am Coll Ca*

rdiol. 2012, 59(3), 265-76 ; [参考文献4] Diabetes Care. 2011, 34(9), 2072-7 ; [参考文献5] Cardiovascular Diabetology 2011, 10(85) (<http://www.cardiab.com/content/10/1/85>) 。

これらの効果は単に血糖値を下げることによる改善の他に、インクレチンによる血管の保護作用を介していると考えられている。高血糖により内皮細胞の機能が低下し、血管のしなやかさが失われると、血圧が上昇し、上昇した血圧がさらに血管を傷めるという悪循環が、心臓・腎臓・脳といった臓器への悪影響となって現れる。この悪循環を断ち切るために、ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害薬とアンジオテンシン変換酵素阻害薬の併用も試みられており、ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤの阻害剤は循環器系の治療においても、重要な役割を果たすものと考えられている。

[0033] すなわち、本開示のペプチドVPXは、ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤ阻害作用を有するので、血糖値上昇抑制作用、高血糖改善作用、血管内皮機能低下抑制作用、血管内皮障害抑制作用、血管障害抑制作用、血管内皮細胞の保護作用及び食欲抑制作用等を示す。また、本開示のペプチドVPXは、食欲抑制及び血管内皮細胞の保護等も可能と考える。なお、ここでいう「血糖値上昇抑制」とは、血糖値低下を含む意味であるが、特に「正常値以上又は必要以上に上昇した血糖値を下げるができること」を意味するものである。血糖値の正常値の判断は、日本糖尿病学会の2010年の診断基準を参考にすればよい。

さらに、本開示のペプチドVPXにより、ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤを阻害することで、ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤに起因する疾患や症状の予防、改善又は治療が可能と考えられる。よって、本開示のペプチドVPXは、ヒトを含む動物に摂取又は投与して、ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤに起因する疾患や症状等の予防、改善及び／又は治療を図るための方法に使用することができる。

本開示のジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤに起因する各種疾患や症状として、例えば、高血糖症、糖尿病、糖尿病合併症、血管内皮障害、血管障害等

が挙げられる。なお、ジペプチジルペプチダーゼー I V に起因する各種疾患等は、ジペプチジルペプチダーゼー I V が介在する各種疾患等であってもよい。

さらに、高血糖症、糖尿病及び高血糖状態によって引き起こされる種々の疾患として、例えば、糖尿病性の細小血管症（例えば、網膜症、腎症、神経障害等）及び大血管合併症（例えば、狭心症・心筋梗塞等の虚血性心疾患、脳梗塞、閉塞性動脈硬化、壊疽等）等が挙げられる。

[0034] なお、ジペプチジルペプチダーゼー I V 阻害剤が前記種々の疾患の予防剤や治療剤として利用できることについては、前記の特許文献 1～5 及び参考文献 2～5 にも開示されているとおりであり、本開示のペプチド V P X についても同様に前記種々の疾患の予防剤や治療剤としても実施できることについては言うまでもない。

よって、本開示のペプチド V P X は、上述のような、ジペプチジルペプチダーゼー I V 阻害、血糖値上昇抑制、高血糖改善、血管内皮障害抑制、及び抗糖尿病等のために使用してもよく、また、ジペプチジルペプチダーゼー I V 阻害剤、血糖値上昇抑制剤、血管内皮障害抑制剤及び抗糖尿病剤等の上述のような使用を目的とした各種製剤に使用することができ、これら各種製剤を製造するために使用することができる。

[0035] また、本開示のペプチド V P X には、後記実施例に示すようにアンジオテンシン変換酵素（以下、「ACE」ともいう）阻害作用を有するものもある。

ここで、アンジオテンシン変換酵素は、レニンによる切断によりアンジオテンシノーゲンから生じるアンジオテンシン I に働き、C 末端の 2 個のアミノ酸を遊離させて、アンジオテンシン II に変換する酵素である。

アンジオテンシン変換酵素は強い昇圧作用を有するアンジオテンシン II を生成させるとともに、降圧作用を有するブラジキニンを不活性化する作用も有している。このため、既にアンジオテンシン変換酵素阻害剤は高血圧の治療薬として使用されており、カプトプリル及びレニベースなどが医薬品に使

用されている。しかしながら、副作用として、カプトプリル及びレニベースでは過度の降圧作用や腎機能障害が見られることがある。このようなことから、サプリメントや食品添加物として提供しても安全性が高いものが望まれ、アンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する物質の探索が多数報告されている（参考文献1、6～8参照。〔参考文献1〕国際公開2003/044044号パンフレット；〔参考文献6〕特開平6-40944号号公報；〔特許文献7〕特開2001-136995号号公報；〔参考文献8〕特開平7-101982号公報）。

例えば、参考文献6及び7には、カゼイン等を乳酸菌又はプロテイナーゼとペプチダーゼの組み合わせにより分解して得たVal-Pro-ProとIle-Pro-Proにアンジオテンシン変換酵素阻害作用があることが知られている。この他、アンジオテンシン変換酵素阻害作用を有するトリペプチドとして、例えば、参考文献8にはLeu-Leu-Trpが知られ、また参考文献1にはMet-Lys-Proが知られている。

[0036] アンジオテンシン変換酵素を阻害することで、血圧降下作用及びブラジキニン不活性化作用の他、心肥大退縮作用、末梢血管拡張作用、腎保護作用、サブスタンスP分解抑制作用等が可能であり、また高血圧状態による血管内皮障害の抑制作用及び血管障害の抑制作用等が可能であると考えられている。また、アンジオテンシン変換酵素阻害剤によって、本態性高血圧症の改善等に効果があることも知られている。

さらに、アンジオテンシン変換酵素を阻害することで、アンジオテンシン変換酵素に起因する疾患や症状予防、改善又は治療が可能と考えられる。

アンジオテンシン変換酵素に起因する疾患や症状として、例えば、高血圧症、心臓肥大、腎臓肥大等が挙げられる。なお、アンジオテンシン変換酵素に起因する各種疾患等は、アンジオテンシン変換酵素が介在する各種疾患等であってもよい。

また、高血圧症又は高血圧状態によって引き起こされる種々の疾患や症状は、例えば、脳出血、脳梗塞、狭心症、心筋梗塞、腎不全、視力障害、血管

浮腫等の心血管疾患や血管障害が挙げられる。

[0037] すなわち、本開示のペプチドVPXは、アンジオテンシン変換酵素阻害作用を有するので、上述の血压降下作用、ブラジキニン不活性化作用、高血圧症状の改善作用、高血圧状態による血管内皮障害の抑制作用及び血管障害の抑制作用等を示す。さらに、本開示のペプチドVPXにより、アンジオテンシン変換酵素を阻害することで、上述のアンジオテンシン変換酵素に起因する疾患や症状等も予防、改善又は治療が可能と考えられる。よって、本開示のペプチドVPXは、ヒトを含む動物に摂取又は投与して、アンジオテンシン変換酵素に起因する疾患や症状等の予防、改善及び／又は治療を図るための方法に使用することができる。

なお、アンジオテンシン変換酵素阻害剤が前記種々の疾患の予防剤や治療剤として利用できることについては、前記の特許文献1及び6～8にも開示されているとおりであり、本開示のペプチドVPXについても同様に前記種々の疾患の予防剤や治療剤としても実施できることについては言うまでもない。

よって、本開示のペプチドVPXは、アンジオテンシン変換酵素阻害、血压降下及び高血圧症等のために使用してもよく、またアンジオテンシン変換酵素阻害剤、血压降下剤及び抗高血圧剤等の上述のような使用を目的とした各種製剤に使用することができ、これら各種製剤を製造するために使用することができる。

[0038] また、本開示のペプチドVPXは、血糖値上昇抑制作用及び血压降下作用の2つの効能を併せ持った際に、さらに有益な化合物として提供することが可能である。

ところで、高血糖値状態が続くと、血管の内皮細胞の機能が低下し、血管内皮障害が生じやすいが、さらにその血管に強い負荷を与えるような高血圧は血管障害を引き起こす危険性を高めることで知られている。血管内皮細胞からは、血管平滑筋を弛緩させる因子（NOやPGI₂）が産生されている。そして、高血糖により血管内皮細胞の機能が低下するとそれらの遊離能力

も低下する。結果として、糖尿病患者は高血圧を併発する。さらに、高い血圧が血管内皮細胞に負荷をかける悪循環に陥る。

[0039] そして、糖尿病のヒト又はその予備群（この予備群とは、糖尿病には至っていないが、高血糖値状態のヒトをいう）のヒトは、高血圧に留意する必要性がある。しかし、一般的に、高血糖改善薬で血糖値を低下させても血圧を低下させることはできるとは言えず、一方、血圧降下薬で血圧を低下させても血糖が低下させることはできるとは言えない。このため、糖尿病かつ高血圧のヒトは、高血糖改善薬と血圧降下薬の両方を処方されることが多く、薬の組み合わせによる副作用の懸念もある。

このような効能を併せ持つことにより、薬剤の使用量も減らすことが可能となるので、副作用の低減が期待できる。

[0040] すなわち、本開示のペプチドVPXは、血管改善、血管内皮障害抑制及び糖尿病の予防、改善又は治療に非常に有効なものと言え、特に高血糖状態によって引き起こされる血管内皮障害の予防、改善又は治療に有効であると考えられる。

本開示の血管内皮障害の具体的な疾患及び症状として、例えば、糖尿病性の血管障害などが挙げられる。

[0041] 以上従って、本開示のペプチドVPX及びこれを有効成分として含有する上述の各種製剤（以下、「前記ジペプチジルペプチダーゼーⅠV阻害剤等」とする）は、ヒトを含む動物に摂取又は投与して、上述の、高血糖症、糖尿病（特に2型糖尿病）、高血圧症及び糖尿病合併症（例えば、糖尿病性の血管内皮障害や腎症、高血圧等）、血管内皮障害、血管障害等の予防、改善及び／又は治療を図るための方法に使用することができる。

また、本開示のペプチドVPXを有効成分として含有する上述の各種製剤は、ヒトを含む動物に摂取又は投与して、上述の、高血糖症、糖尿病（特に2型糖尿病）及び糖尿病合併症（例えば、糖尿病性の血管内皮障害や腎症、高血圧等）、血管内皮障害、血管障害等の予防、改善及び／又は治療を図るための方法に使用することができる。

また、本開示のペプチドV P X及びこれを有効成分として含有する上述の各種製剤は、上述のような高血糖症、糖尿病、血管障害、高血圧症等の予防、改善及び／又は治療のためのヒト若しくは動物用の医薬品、医薬部外品、皮膚外用剤、化粧品及び食品等の有効成分としてこれらに配合して使用可能である。

医薬品に配合する場合、経口投与剤や非経口投与剤などとすることができる。また、食品に配合する場合には、上述のジペプチジルペプチダーゼーI Vに起因する各種疾患及び／又はアンジオテンシン変換酵素に起因する各種疾患、並びに高血糖状態及び／又は高血圧症によって引き起こされる各種疾患などの予防、改善又は治療、ジペプチジルペプチダーゼーI V阻害、血糖値上昇抑制、高血糖改善、アンジオテンシン変換酵素阻害及び血圧降下等の生理機能をコンセプトとする機能性食品、病者用食品、特定保健用食品などに応用できる。

本開示のペプチドV P X及びこれを有効成分として含有する上述の各種製剤は、上述のような、高血糖症、糖尿病、高血圧症、血管障害等の予防、改善及び／又は治療のためのヒト若しくは動物用の医薬品、医薬部外品、皮膚外用剤、化粧品及び食品等の有効成分としてこれらに配合して使用可能である。

[0042] 本開示のペプチドV P X及びこれを有効成分として含有する上述の各種製剤は、経口投与及び非経口投与の何れでもよいが、経口投与が望ましい。非経口投与として、静注、直腸投与、吸入等が挙げられる。経口投与の剤形として、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、顆粒剤、酸剤、軟膏等が挙げられる。

製剤化に際しては、乳蛋白加水分解物や本開示のペプチドV P Xの他に、通常製剤化に用いられている賦形剤、pH調整剤、着色剤、矯味剤等の成分を用いることができる。また、公知の又は将来的に見出されるジペプチジルペプチダーゼーI V阻害作用及び／又はアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する薬、抗糖尿病薬、高血糖改善薬、血圧降下薬などを併用することも

可能である。

[0043] また、本開示のペプチドVPXを有効成分として食品中に含有させ、本開示のペプチドVPX及びこれを有効成分として含有する上述の各種製剤の一態様として、ジペプチジルペプチダーゼーIV作用及び／又はアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する食品として加工することも可能である。

このような食品として、液状、ペースト状、固体、粉末等の形態を問わず、錠菓、流動食、飼料（ペット用を含む）等のほか、例えば、小麦粉製品、即席食品、農産加工品、水産加工品、畜産加工品、乳・乳製品、油脂類、基礎調味料、複合調味料・食品類、冷凍食品、飲料、これら以外の市販品等が挙げられる。

[0044] 例えば、前記小麦粉製品として、パン、マカロニ、スパゲッティ、めん類、ケーキミックス、から揚げ粉、パン粉等が挙げられる。前記即席食品類として、即席めん、カップめん、レトルト・調理食品、調理缶詰め、電子レンジ食品、即席スープ・シチュー、即席みそ汁・吸い物、スープ缶詰め、フリーズ・ドライ食品、その他の即席食品等が挙げられる。

例えば、前記農産加工品として、農産缶詰め、果実缶詰め、ジャム・マーマレード類、漬物、煮豆類、農産乾物類、シリアル（穀物加工品）等が挙げられる。前記水産加工品として、水産缶詰め、魚肉ハム・ソーセージ、水産練り製品、水産珍味類、つくだ煮類等が挙げられる。前記畜産加工品として、畜産缶詰め・ペースト類、畜肉ハム・ソーセージ等が挙げられる。

例えば、前記乳・乳製品として、加工乳、乳飲料、ヨーグルト類、乳酸菌飲料類、チーズ、アイスクリーム類、調製粉乳類、クリーム、その他の乳製品等が挙げられる。前記油脂類として、バター、マーガリン類、植物油等が挙げられる。

例えば、前記基礎調味料として、しょうゆ、みそ、ソース類、トマト加工調味料、みりん類、食酢類等が挙げられ、前記複合調味料・食品類として、調理ミックス、カレーの素類、たれ類、ドレッシング類、めんつゆ類、スパイス類、その他の複合調味料等が挙げられる。

例えば、前記冷凍食品として、素材冷凍食品、半調理冷凍食品、調理済冷凍食品等が挙げられる。

例えば、前記菓子類として、キャラメル、キャンディー、チューインガム、チョコレート、クッキー、ビスケット、ケーキ、パイ、スナック、クラッカー、和菓子、米菓子、豆菓子、デザート菓子、その他の菓子等が挙げられる。

例えば、前記飲料類として、炭酸飲料、天然果汁、果汁飲料、果汁入り清涼飲料、果肉飲料、果粒入り果実飲料、野菜系飲料、豆乳、豆乳飲料、コーヒー飲料、お茶飲料、粉末飲料、濃縮飲料、スポーツ飲料、栄養飲料、アルコール飲料、その他の嗜好飲料等が挙げられる。

例えば、上記以外の市販食品として、ベビーフード、ふりかけ、お茶漬けのり等が挙げられる。

[0045] 本開示のジペプチジルペプチダーゼーI V阻害剤等において、本開示のペプチドVPXの配合量は、製剤の最終組成物に対し、少なくとも0.001質量%であることが好ましい。

本開示のペプチドVPXの投与量は、年齢、症状等により異なるが、通常、0.001~3000mg/日、好ましくは0.01~30mg/日であり、1日1回から3回に分けて投与してもよい。

実施例

[0046] 以下に、具体的な実施例等を説明するが、本発明（本開示）はこれに限定されるものではない。

[0047] 製造例1：カゼインの酵素分解によるVPXペプチドの製造

<1>カゼインの酵素分解

市販のカゼイン（ニュージーランドデーリーボード製）100gに水900gを加え、よく分散させ、水酸化ナトリウムを添加して溶液のpHを7.0に調整し、カゼインを完全に溶解した。該カゼイン水溶液を85℃で10分間加熱殺菌し、50℃に温度調整し、水酸化ナトリウムを添加してpHを9.0に調整した後、パンクレアチンを2g（天野エンザイム社製）、プロ

テアーゼAを4g（天野エンザイム社製）それぞれ添加して、加水分解反応を開始した。カゼインの分解率が54.9%に達した時点で、80℃で6分間加熱して酵素を失活させて酵素反応を停止し、10℃に冷却した。この加水分解液を珪藻土ろ過し、濃縮後凍結乾燥し、凍結乾燥品80gを得た。

[0048] <2>HPLCによるペプチドの分離

逆相HPLCで上記カゼイン加水分解物の分離を行った。このHPLC条件は下記HPLC条件1に示した。

〔HPLC条件1〕

カラム：Cadenza CD-C18

10mm I. D. × 250mm （インタクト（株）製）

検出：UV 215nm

流速：3ml/分

溶離液A：0.2% FAを含む水溶液

溶離液B：0.2% FAを含むアセトニトリル溶液

溶離液Aの割合98%から、30分後に75%、40分後に50%、43分後に20%、になるようなグラジエント条件で、加水分解物を分離し、溶出液を0.75ml毎に分画した。溶出画分について、ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害能を測定したところリテンションタイム16.5分に溶出された画分（画分1）に強い阻害活性が認められた。

さらに、精製するため、別条件のHPLCで精製した。このときの条件を下記HPLC条件2に示した。このとき、条件1の溶離液A、Bを、それぞれ条件2の溶離液A、Bに変更し、その他の条件は条件1と同様に行った。

〔HPLC条件2〕

カラム：Cadenza CD-C18

10mm I. D. × 250mm （インタクト（株）製）

検出：UV 215nm

流速：3ml/分

溶離液A：0.1% TFAを含む水溶液

溶離液 B : 0.1% TFA を含むアセトニトリル溶液

[0049] 同グラジエント条件で、加水分解物を分離し、溶出液を 0.75 ml 毎に分画した。溶出画分について、ジペプチジルペプチダーゼ I V 阻害能を測定したところリテンションタイム 23.0 分に溶出された画分 2 及びリテンションタイム 22.0 分に溶出された画分 3 に強い阻害活性が認められた。画分 2 における酵素活性の 50% 阻害濃度は、 $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

上記活性ピークの画分 2 の化合物を、島津製作所製のプロテイン・シーケンサー (PPSQ-23A) で同定した。その結果、Val-Pro-Ala (配列番号 2) という新規な構造をもつことがわかった。なお、これらアミノ酸残基は L-型であった。

更に、サーモクエスト社製質量分析計 LTQ により、分子量は 285.2、 $m/z = 286.2$ (MH+) をプリカーサーイオンとする MS/MS 分析により、図 1 に示す通り、 $m/z = 169.3, 187.2, 197.1$ 等のプロダクトイオンが検出された。

こうして、ジペプチジルペプチダーゼ I V 阻害能を有するペプチドの構造は、Val-Pro-Ala であることが明らかとなった

また、後述の製造例 2 で得られた合成ペプチド VPA (配列番号 2) での 50% 阻止濃度は、 $1.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、精製フラクションの値と一致した。

[0050] また、上記活性ピークの画分 3 の化合物も同様に同定した結果、図 2 に示すように、Val-Pro-Gln (配列番号 3) という新規な構造 (分子量 342.2) をもつことがわかった。なお、これらアミノ酸残基は全て L-型であった。

よって、上記<1>カゼイン酵素分解物中には、VPA (配列番号 2) 及び VPQ (配列番号 3) がジペプチジルペプチダーゼ I V 阻害活性を持つ新規なペプチドとして含まれることが確認できた。

さらに、上記<1>カゼイン加水分解物には、ジペプチジルペプチダーゼ

ー I V 阻害活性が認められ、その分解物中には、V P V (配列番号 7)、V P Y (配列番号 8)、V P K (配列番号 10) が含まれていたことも確認できた。なお、これらアミノ酸残基は全て L-型であった。

[0051] 製造例 2 : V P X ペプチドの化学合成

ペプチドシンセサイザー (Model 433A 型、アプライドバイオシステムズ社) を使用し、Fmoc-Val ((株) ペプチド研究所)、Fmoc-Pro ((株) ペプチド研究所)、Fmoc-Ala-Wanger-PEG Resin (渡辺化学工業 (株)) を原料に用いて、固相合成法によりトリペプチド Val-Pro-Ala を合成した。

操作はアプライドバイオシステムズ社のマニュアルに従って行った後、脱保護した。このペプチドは、上記 HPLC 条件 1 で精製した。

得られたトリペプチドは、質量分析により分子量 (M) は 285.2 と測定され、 $m/z = 286.2$ (MH+) をプリカーサーイオンとする MS/MS 分析により、精製フラクションでのスペクトルと同様のスペクトルが得られた。また、V P Q (配列番号 3) も同様に作成し、これは精製フラクションでのスペクトルと同様のスペクトル (質量分析による分子量 (M) は 342.2) が得られた。

さらに、V P M (配列番号 4)、V P N (配列番号 5)、V P G (配列番号 6)、V P V (配列番号 7)、V P Y (配列番号 8)、V P S (配列番号 9) 及び V P K (配列番号 10) についても製造例 2 に準じて操作することで、これらペプチドを化学合成した。

[0052] 試験例 1 : 各ペプチドのジペプチジルペプチダーゼー I V 阻害活性確認試験

表 1 に示す、製造例 2 で得た各ペプチドのジペプチジルペプチダーゼー I V 阻害活性確認試験を行い、その結果を表 1 に示した。

[0053]

[表1]

表1：各ペプチド	試験例1： DPP-4阻害活性 IC ₅₀ (μg/ml)
VPA (配列番号2)	1.9 μg/ml
VPQ (配列番号3)	2.6 μg/ml
VPN (配列番号5)	5.7 μg/ml
VPG (配列番号6)	3.4 μg/ml
VPV (配列番号7)	1.0 μg/ml
VPY (配列番号8)	7.15 μg/ml
VPS (配列番号9)	5.17 μg/ml
VPK (配列番号10)	10.4 μg/ml
VPP (配列番号11)	>2000 μg/ml
IPP (配列番号12)	1342 μg/ml
LY (配列番号13)	486 μg/ml

[0054] 試験例2：各ペプチドのアンジオテンシン変換酵素阻害活性確認試験

また、VPA (配列番号2) 及びVPK (配列番号10) のACE阻害活性確認試験を行った結果、50%阻止濃度は、それぞれ24.8 μg/ml 及び132 μg/mlであった。よって、このVPA及びVPKは、ジペプチジルペプチダーゼ-IV阻害作用及びアンジオテンシン変換酵素阻害作用の両方の性質を有するため、血管改善、血管内皮障害抑制及び糖尿病の予防、改善又は治療に非常に有効なものと言える。

[0055] このことから、これらトリペプチド (配列番号2~10) の少なくともいずれか1つを含むカゼインの酵素分解物は、ジペプチジルペプチダーゼ-IV阻害作用やアンジオテンシン変換酵素阻害作用等を有する素材又は食材として、食品、医薬品等に利用可能であると考えられる。

VPAを少なくとも含む市販品のカゼイン分解物を検索したところ、CU5000 (森永乳業社製) のカゼイン分解物にVPAが認められ、これらのジペプチジルペプチダーゼ-IV阻害の50%阻止濃度は、84 μg/mlであった。なお、C800 (森永乳業社製) についてのジペプチジルペプチダーゼ-IV阻害の50%阻止濃度は、>1000 μg/mlであり、カゼイン分解物であってもジペプチジルペプチダーゼ-IV阻害活性が認められ

ないものがあった。

[0056] <ジペプチジルペプチダーゼー I V 阻害活性の測定方法>

ジペプチジルペプチダーゼー I V (DPP-4) 阻害の測定は、カトウらの方法「Kato, T. et al. Biochem. Med. 19, p351, 1978」に準じて行った。

具体的には、酵素 (DPP-4) は Recombinant Human DPP-4 (R&D Systems, Inc.)、基質は H-Gly-Pro-AMC (Biomol GmbH) を用いて、酵素反応を行なった。

96穴マイクロプレート (nunc 137101) の各ウエルに、水又は各濃度の試験物質の水溶液または、HPLCの分画フラクションを添加し、Tris-HCl (0.25 M, pH 8.0) を 20 μ l 添加して全量を 80 μ l に調製した。攪拌の後プレートを 37°C のインキュベーターで約 10 分程度温め、DPP-4 溶液 10 μ l と、基質溶液 10 μ l を添加し (全液量 100 μ l)、攪拌して反応を開始した。酵素の代わりに水を添加したウエルをコントロールとした。

酵素反応の測定はマイクロプレートリーダー (SH-9000, コロナ電気 (株)) を用い、庫内温度を 37°C に保った条件下で測定した (5 分間隔、ex360nm/em460nm)。

蛍光強度の経時的な増加が直線的な期間 (反応開始から 30 分以内) の蛍光強度の値から、下式により阻害活性を算出した陽性対象として Vildagliptin (JS Research Chemicals Trading 社) を用いた。

[0057] 阻害率 (%) = $100\% - [(Y - b) / (X - a)] \times 100\%$

X : 水 + 酵素 + 基質

Y : 試験物質 + 酵素 + 基質

a : 水 + 基質

b : 試験物質 + 基質

< IC₅₀ の濃度の求め方 >

試験物質の濃度を段階的に希釈し (10 ~ 2000 μ g/ml)、その阻

害率を求めた。その結果を基に試験物質の添加濃度の対数 (\log_{10}) と阻害率の間の関係式を求めた。

そしてこの関係式から酵素の阻害率が50%になる濃度を逆算することで、 IC_{50} を算出した。

[0058] <アンジオテンシン変換酵素阻害活性の測定方法>

アンジオテンシン変換酵素阻害 (ACE阻害) の測定は、Araujoらの方法 [Araujo, M.C., et al., Biochemistry 39, 8519, 2000] に準じて行った。

酵素 (ACE) は Angiotensin Converting Enzyme, from rabbit lung (SIGMA)、基質は Abz-FRK(Dnp)-P (Enzo Life Sciences International, Inc.) を用いて、酵素反応を行なった (Araujo, M.C., et al., Biochemistry 39, 8519, 2000)。

96穴マイクロプレート (nunc 137101) の各ウエルに、水または各濃度の試験物質の水溶液または、HPLC の分画フラクションを添加し、Tris-HCl (0.25M, pH 8.0) を $20\mu\text{l}$ 添加して全量を $80\mu\text{l}$ に調製した。攪拌の後プレートを 37°C のインキュベーターで約10分程度温め、ACE溶液 $10\mu\text{l}$ と、基質溶液 $10\mu\text{l}$ を添加し (全液量 $100\mu\text{l}$)、攪拌して反応を開始した。酵素の代わりに水を添加したウエルをコントロールとした。

酵素反応の測定はマイクロプレートリーダー (SH-9000, コロナ電気 (株)) を用い、庫内温度を 37°C に保った条件下で測定した (5分間隔、ex320nm/em420nm)。

蛍光強度の経時的な増加が直線的な期間 (反応開始から30分以内) の蛍光強度の値から、下式により阻害活性を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = 100\% - [(Y - b) / (X - a)] \times 100\%$$

X : 水 + 酵素 + 基質

Y : 試験物質 + 酵素 + 基質

a : 水 + 基質

b : 試験物質 + 基質

< IC_{50} の濃度の求め方>

試験物質の濃度を段階的に希釈し（10～2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、その阻害率を求める。その結果を基に試験物質の添加濃度の対数（ \log_{10} ）と阻害率の関係式を求めた。そしてこの関係式から酵素の阻害率が50%になる濃度を逆算することで、 IC_{50} を算出した。

産業上の利用可能性

[0059] 本発明のペプチドVPXは、カゼイン加水分解物から単離することが可能なものであるので、安全性が高く、医薬品、食品、皮膚外用剤及び機能性食品等の幅広い分野に利用することが可能である。

[0060] また、本技術は、以下の構成をとることも可能である。

[1] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕。

[0061] [2] 前記Xは、塩基性アミノ酸残基、脂肪族中性アミノ酸残基、アミド基を有する中性アミノ酸残基又は芳香族を有する中性アミノ酸残基である前記[1]記載のペプチド。

[3] 前記Xは、アラニン残基、グルタミン残基、メチオニン残基、アスパラギン残基、グリシン残基、バリン残基、チロシン残基、セリン残基及びリシン残基から選ばれる前記[1]又は[2]記載のペプチド。

[4] 前記ペプチドが、下記の(a)～(i)のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドから選ばれる1種又は2種以上のものである前記[1]～[3]のいずれか1項記載のペプチド。

(a) Val-Pro-Ala (配列番号2)

(b) Val-Pro-Gln (配列番号3)

(c) Val-Pro-Met (配列番号4)

(d) Val-Pro-Asn (配列番号5)

(e) Val-Pro-Gly (配列番号6)

(f) Val-Pro-Val (配列番号7)

(g) Val-Pro-Tyr (配列番号8)

(h) Val-Pro-Ser (配列番号9)

(i) Val-Pro-Lys (配列番号10)

生理活性の点で好適には、VPA (配列番号2)、VPQ (配列番号3)、VPN (配列番号5)、VPG (配列番号6)、VPV (配列番号7)、VPY (配列番号8)、VPS (配列番号9)、VPK (配列番号10)である。

ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害活性の点で、VPA (配列番号2)、VPQ (配列番号3)、VPV (配列番号7)であるのが好適である。

アンジオテンシン変換酵素阻害活性の点で、VPA (配列番号2)、VPK (配列番号10)であるのが好適である。

[0062] [5] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基(Loopリン残基を除く)を示す〕の単数又は複数、又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチドを有効成分として含有する、

ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害剤、高血糖改善剤、血糖値上昇抑制剤、抗糖尿病剤、血管内皮障害抑制剤、血管改善剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、血圧降下剤又は抗高血圧症剤。

〔6〕ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害剤、高血糖改善剤、血糖値上昇抑制剤、抗糖尿病剤、血管内皮障害抑制剤、血管改善剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、血圧降下剤又は抗高血圧症剤の製造のための、

Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基(Loopリン残基を除く)を示す〕、又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチドの使用。

〔7〕ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害用食品、高血糖改善剤、血糖値上昇抑制用食品、抗糖尿病用食品、血管内皮障害抑制用食品、血管改善用食品、アンジオテンシン変換酵素阻害用食品、血圧降下用食品の製造のための、

Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基(Loopリン残基を除く)を示す〕、又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチドの使用。

[0063] [8] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕、又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチドの、

ジペプチジルペプチダーゼーI V阻害剤、高血糖改善剤、血糖値上昇抑制剤、抗糖尿病剤、血管内皮障害抑制剤、血管改善剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、血圧降下剤又は抗高血圧症剤への使用。

[9] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕、又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチドの、

ジペプチジルペプチダーゼーI V阻害用食品、血糖低下用食品、抗糖尿病用食品、血管内皮障害抑制用食品又は血管改善用食品への使用。

[10] ジペプチジルペプチダーゼーI Vに起因する疾患、高血糖状態に起因する疾患、糖尿病、血管内皮障害若しくは血管障害に起因する疾患、アンジオテンシン変換酵素に起因する疾患、高血圧状態に起因する疾患の、予防、改善又は治療のための、

Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕、又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチド。

[11] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕、又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチドを有効成分として、

ジペプチジルペプチダーゼーI Vに起因する疾患、高血糖状態に起因する疾患、糖尿病、血管内皮障害若しくは血管障害に起因する疾患、アンジオテンシン変換酵素に起因する疾患、高血圧状態に起因する疾患の、予防、改善又は治療方法。

[12] ジペプチジルペプチダーゼーI Vに起因する疾患、高血糖状態に起因する疾患、糖尿病、血管内皮障害若しくは血管障害に起因する疾患、アンジオテンシン変換酵素に起因する疾患、高血圧状態に起因する疾患の、予防

、改善又は治療における使用のための、

V a l - P r o - Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕、又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチド。

〔13〕ジペプチジルペプチダーゼーIVに起因する疾患、高血糖状態に起因する疾患、糖尿病、血管内皮障害若しくは血管障害に起因する疾患、アンジオテンシン変換酵素に起因する疾患、高血圧状態に起因する疾患の、予防、改善又は治療のための、

V a l - P r o - Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕、又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチドの使用。

[0064] 〔14〕前記ジペプチジルペプチダーゼーIVに起因する疾患及び／又は症状が、高血糖症、糖尿病、糖尿病合併症、血管内皮障害及び血管障害から選ばれるものであるのが好適である。

〔15〕前記アンジオテンシン変換酵素に起因する疾患及び／又は症状が、高血圧症、心血管疾患から選ばれるものであるのが好適である。

〔16〕カゼインを加水分解して得られるV a l - P r o - Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕、又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチド及びその製造方法。

〔17〕カゼインを以下の工程にて分離精製して得られる、V a l - P r o - Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕又は前記〔2〕～〔4〕のいずれか1項記載のペプチド及びその製造方法。

(a) 加水分解酵素（好適にはエンドペプチダーゼ）にて行うこと。好適には10～85℃、0.1～48時間の条件下にて行う。

(b) その加水分解分解物を、クロマトグラフィーにて分離精製すること。好適にはイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー等から選ばれる1種又は2種のものを使用。

請求の範囲

- [請求項1] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕。
- [請求項2] 前記Xは、塩基性アミノ酸残基、脂肪族中性アミノ酸残基、ヒドロキシ基を有する中性アミノ酸残基、アミド基を有する中性アミノ酸残基及び芳香族を有する中性アミノ酸残基から選ばれるものである請求項1記載のペプチド。
- [請求項3] 前記Xが、アラニン残基、グルタミン残基、メチオニン残基、アスパラギン残基、グリシン残基、バリン残基、チロシン残基、セリン残基及びリシン残基から選ばれるものである請求項1又は2記載のペプチド。
- [請求項4] 前記ペプチドが、下記の（a）～（i）のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドから選ばれるものである請求項1～3の何れか1項記載のペプチド。
- (a) Val-Pro-Ala（配列番号2）
 - (b) Val-Pro-Gln（配列番号3）
 - (c) Val-Pro-Met（配列番号4）
 - (d) Val-Pro-Asn（配列番号5）
 - (e) Val-Pro-Gly（配列番号6）
 - (f) Val-Pro-Val（配列番号7）
 - (g) Val-Pro-Tyr（配列番号8）
 - (h) Val-Pro-Ser（配列番号9）
 - (i) Val-Pro-Lys（配列番号10）
- [請求項5] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕を有効成分として含有するジペプチジルペプチダーゼーIV阻害剤。
- [請求項6] 前記ペプチドが、請求項2～4の何れか1項記載のペプチドである請求項5記載のジペプチジルペプチダーゼーIV阻害剤。

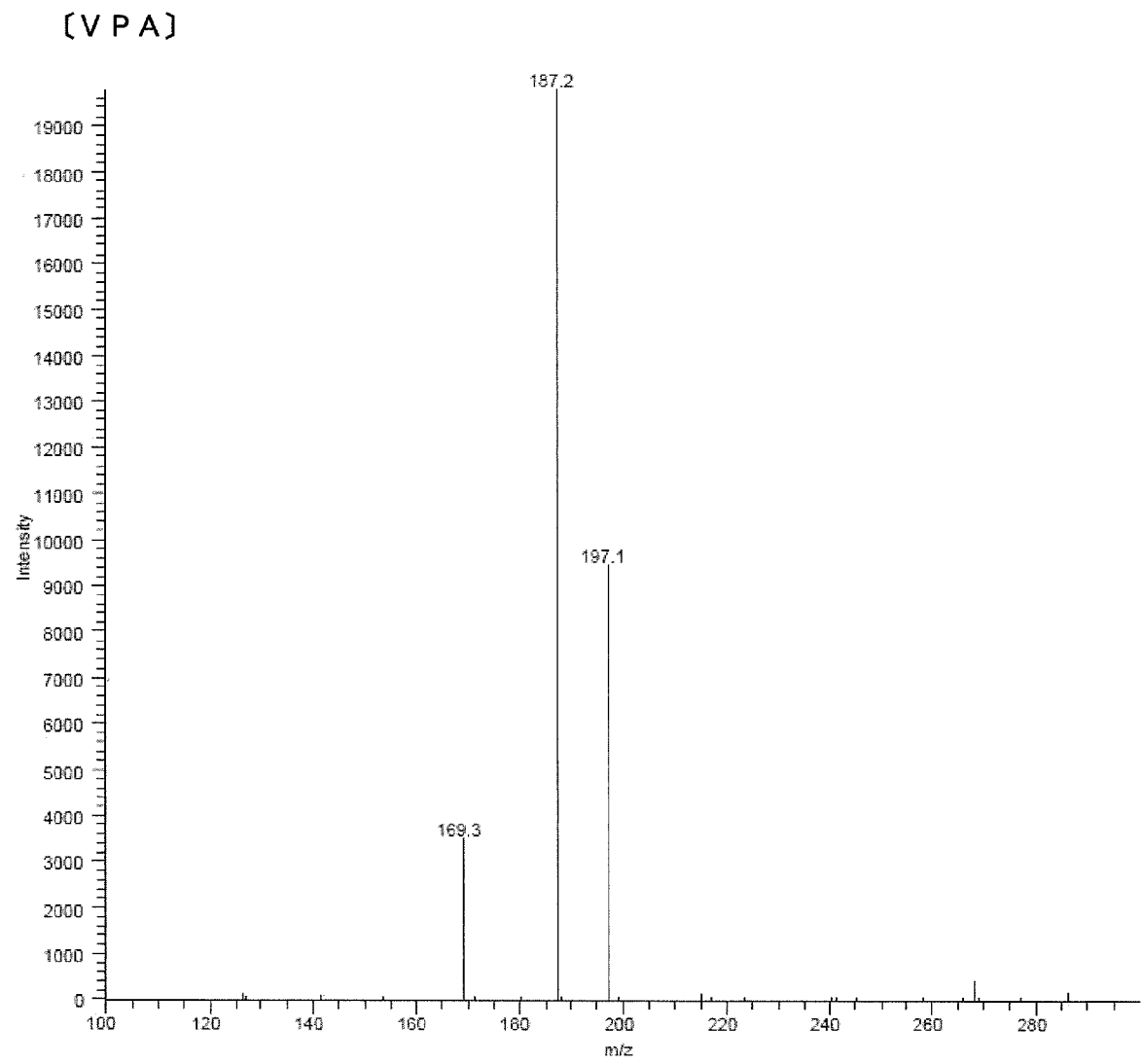
- [請求項7] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕を有効成分として含有する血糖値上昇抑制剤。
- [請求項8] 前記ペプチドが、請求項2～4の何れか1項記載のペプチドである請求項7記載の血糖値上昇抑制剤。
- [請求項9] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕を有効成分として含有する血管内皮障害抑制剤。
- [請求項10] 前記ペプチドが、請求項2～4の何れか1項記載のペプチドである請求項9記載の血管内皮障害抑制剤。
- [請求項11] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕を有効成分として含有するアンジオテンシン変換酵素阻害剤。
- [請求項12] 前記ペプチドが、請求項2～4の何れか1項記載のペプチドである請求項11記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。
- [請求項13] ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害剤、血糖値上昇抑制剤、血管内皮障害抑制剤、又はアンジオテンシン変換酵素阻害剤の製造のための、Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕の使用。
- [請求項14] ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害剤用食品、血糖値上昇抑制剤用食品、血管内皮障害抑制剤用食品、アンジオテンシン変換酵素阻害剤用食品の製造のための、Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕の使用。
- [請求項15] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（L-プロリン残基を除く）を示す〕の、ジペプチジルペプチダーゼーIV阻害剤、血糖値上昇抑制剤、血管内皮障害抑制剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤への使用。
- [請求項16] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（

Ｌ－プロリン残基を除く）を示す] の、ジペプチジルペプチダーゼー
ⅠⅤ阻害用食品、血糖値上昇抑制用食品、血管内皮障害抑制用食品、
アンジオテンシン変換酵素阻害用食品への使用。

[請求項17] ジペプチジルペプチダーゼーⅠⅤに起因する疾患、高血糖状態に起
因する疾患、糖尿病、血管内皮障害若しくは血管障害に起因する疾患
、アンジオテンシン変換酵素に起因する疾患、高血圧状態に起因する
疾患の、予防、改善又は治療における使用のための、Val-Pro
-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（Ｌ－プロリン残基
を除く）を示す〕、又は請求項2～4のいずれか1項記載のペプチド
。

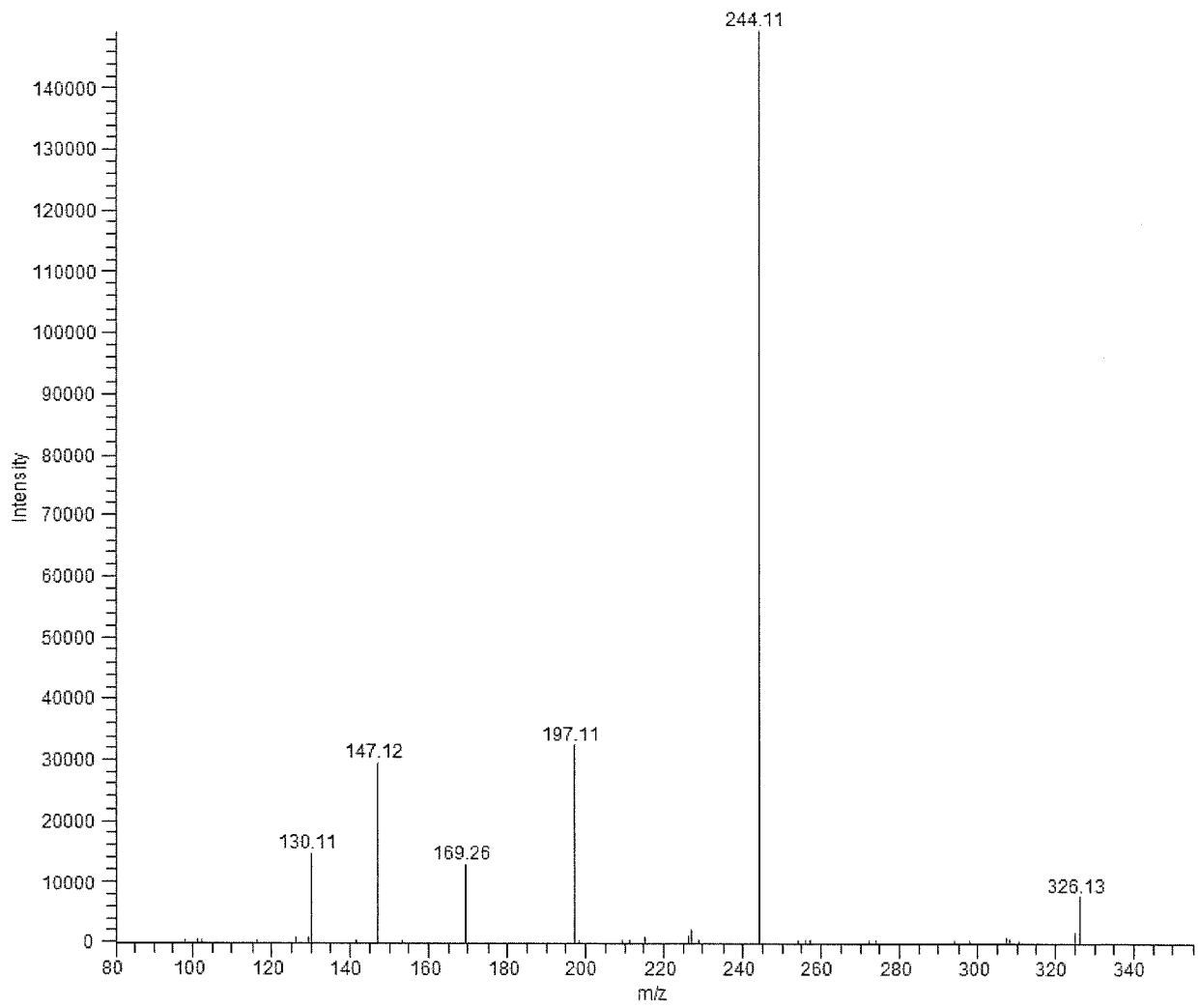
[請求項18] Val-Pro-Xからなるペプチド〔式中、Xはアミノ酸残基（
Ｌ－プロリン残基を除く）を示す〕、又は請求項2～4のいずれか1
項記載のペプチドを有効成分として、ジペプチジルペプチダーゼーⅠ
Ⅴに起因する疾患、高血糖状態に起因する疾患、糖尿病、血管内皮障
害若しくは血管障害に起因する疾患、アンジオテンシン変換酵素に起
因する疾患、高血圧状態に起因する疾患の、予防、改善又は治療方法
。

[図1]



[圖2]

[V P Q]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K5/083(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K38/55(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/14(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N9/99(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)

C07K5/08-5/097, A61K38/00, A61K38/55, A61P3/10, A61P9/14, A61P43/00, C12N9/99

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/REGISTRY (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	CN 1660888 A (Shandong University), 31 August 2005 (31.08.2005), (Family: none)	<u>1-4, 11-17</u> 5-10
<u>X</u> A	JP 08-099994 A (The Calpis Food Industry Co., Ltd.), 16 April 1996 (16.04.1996), (Family: none)	<u>1-4, 11-17</u> 5-10
<u>X</u> A	MINERVINI F. et.al., Angiotensin I-converting- enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from <i>Lactobacillus helveticus</i> PR4 proteinase- hydrolyzed caseins of milk from six species. Appl. Environ. Microbiol., 2003, vol.69, no.9, pp.5297-5305	<u>1-4, 11-17</u> 5-10

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
16 May, 2013 (16.05.13)

Date of mailing of the international search report
28 May, 2013 (28.05.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054291

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	VAN PLATERINK C.J. et.al., Application of at-line two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry for identification of small hydrophilic angiotensin I-inhibiting peptides in milk hydrolysates. Anal. Bioanal. Chem., 2008, vol.391, no.1, pp.299-307	<u>1-4, 11-17</u> 5-10
<u>X</u> A	WO 2006/108211 A1 (THE MURDOCH CHILDRENS RESEARCH INSTITUTE), 19 October 2006 (19.10.2006), (Family: none)	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	WO 2010/077988 A2 (GEORGIADES, Jerzy, Alexander), 08 July 2010 (08.07.2010), & US 2010/0173827 A1	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	RYAN K. et.al., Construction of sequence-selective peptide receptors from conformationally restricted <i>eta</i> - and <i>theta</i> -amino acids. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, vol.9, no.18, pp.2673-2678	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	WO 2010/072327 A2 (KAMAMED GMBH), 01 July 2010 (01.07.2010), & DE 102008062136 A1	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	WO 2003/031574 A2 (NORTH SHORE-LONG ISLAND JEWISH RESEARCH INSTITUTE), 17 April 2003 (17.04.2003), & US 2003/0069187 A1	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	JP 09-227591 A (Hoechst AG.), 02 September 1997 (02.09.1997), & EP 0801073 A2	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	WO 2011/007612 A1 (Fuji Oil Co., Ltd.), 20 January 2011 (20.01.2011), & US 2012/0157395 A1	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	WO 1999/048910 A1 (UNIVERSITY OF DUNDEE), 30 September 1999 (30.09.1999), & JP 2002-507623 A & EP 1066315 A1	<u>1-4, 17</u> 5-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054291

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.: 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 18 pertains to "method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy" and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].
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:

Claims 1 to 17 include nine inventions relating to peptides with structures represented by Val-Pro-X (wherein X does not stand for L-Pro), said structures corresponding to SEQ ID NOS:2 to 10 respectively.

It appears that the matter common to the aforementioned inventions is "a peptide with a structure represented by Val-Pro-X (wherein X does not stand for L-Pro)". However, this matter has been already known (see the documents cited in the present search report) and, therefore, cannot be considered as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2.

(Continued to extra sheet)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054291

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Therefore, it cannot be deemed that the inventions involved in claims 1-17 are so linked as to form a single general inventive concept, and it is considered that nine inventions are set forth in the present international application.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K5/083(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K38/55(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/14(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N9/99(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 (IPC))
 Int.Cl. C07K5/08-5/097, A61K38/00, A61K38/55, A61P3/10, A61P9/14, A61P43/00, C12N9/99

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 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2013年
 日本国実用新案登録公報 1996-2013年
 日本国登録実用新案公報 1994-2013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)
 CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/REGISTRY(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	CN 1660888 A (山東大学) 2005. 08. 31. (ファミリーなし)	1-4, 11-17 5-10
X A	JP 08-099994 A (カルピス食品工業株式会社) 1996. 04. 16. (ファミリーなし)	1-4, 11-17 5-10

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
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 16.05.2013	国際調査報告の発送日 28.05.2013
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 戸来 幸男	4B	3964
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>X</u> A	MINERVINI F. et.al., Angiotensin I-converting-enzyme- inhibitory and antibacterial peptides from <i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. Appl. Environ. Microbiol., 2003, vol.69, no.9, pp.5297-5305	<u>1-4, 11-17</u> 5-10
<u>X</u> A	VAN PLATERINK C.J. et.al., Application of at-line two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry for identification of small hydrophilic angiotensin I-inhibiting peptides in milk hydrolysates. Anal. Bioanal. Chem., 2008, vol.391, no.1, pp.299-307	<u>1-4, 11-17</u> 5-10
<u>X</u> A	WO 2006/108211 A1 (THE MURDOCH CHILDRENS RESEARCH INSTITUTE) 2006.10.19. (ファミリーなし)	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	WO 2010/077988 A2 (GEORGIADES, Jerzy, Alexander) 2010.07.08. & US 2010/0173827 A1	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	RYAN K. et.al., Construction of sequence-selective peptide receptors from conformationally restricted <i>eta</i> - and <i>theta</i> - amino acids. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, vol.9, no.18, pp.2673-2678	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	WO 2010/072327 A2 (KAMAMED GMBH) 2010.07.01. & DE 102008062136 A1	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	WO 2003/031574 A2 (NORTH SHORE-LONG ISLAND JEWISH RESEARCH INSTITUTE) 2003.04.17. & US 2003/0069187 A1	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	JP 09-227591 A (ヘキスト・アクチェングゼルシャフト) 1997.09.02. & EP 0801073 A2	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	WO 2011/007612 A1 (不二製油株式会社) 2011.01.20. & US 2012/0157395 A1	<u>1-4, 17</u> 5-16
<u>X</u> A	WO 1999/048910 A1 (UNIVERSITY OF DUNDEE) 1999.09.30. & JP 2002-507623 A & EP 1066315 A1	<u>1-4, 17</u> 5-16

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。

- 請求項 1 8 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 8 は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法」に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及び[PCT規則39.1(iv)]の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
- 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、
- 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。

請求項 1-17には、V a l - P r o - X（式中、XはL - P r oを除く）として表される構造からなるペプチドについて、配列番号 2 - 1 0 の構造に対応する 9 つの発明が包含されている。

そして、上記の各発明に共通する事項は「V a l - P r o - X（式中、XはL - P r oを除く）として表される構造からなるペプチド」にあるものと解されるが、当該事項は既に知られており（本調査報告で引用する各文献参照）、PCT規則 1 3 . 2 に規定される特別な技術的特徴に該当するものとは認められない。

よって、請求項 1 - 1 7 に包含される各発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは言えず、本国際出願には 9 つの発明が記載されているものと認められる。

- 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。
- 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。
- 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ため、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。
- 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ため、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。