



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월18일
(11) 등록번호 10-1244331
(24) 등록일자 2013년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/08 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7004549
(22) 출원일자(국제) 2008년08월07일
심사청구일자 2010년09월28일
(85) 번역문제출일자 2010년02월26일
(65) 공개번호 10-2010-0051838
(43) 공개일자 2010년05월18일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2008/064247
(87) 국제공개번호 WO 2009/020189
국제공개일자 2009년02월12일
(30) 우선권주장
JP-P-2007-204929 2007년08월07일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
KR100264344 B1*
WO2006052031 A1*
DE000010133576 A
European journal of pharmacology(1996), Vol.
304, pp. 93-98
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
엠지 팜마 아이엔씨.
일본 오사카 5670085 이바라키-시 사이토-아사기
7-7-25
(72) 발명자
카가와 료이치
일본 5670085 오사카 이바라키시 사이토 아사기
7-7-25 엠지 팜마 아이엔씨 나이
후쿠하마 치즈코
일본 5670085 오사카 이바라키시 사이토 아사기
7-7-25 엠지 팜마 아이엔씨 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 혈압강하제

(57) 요약

본 발명은 혈압강하제를 제공한다. 본 발명의 혈압강하제는, 글로빈 단백질분해물에서 유래하는 하기 (1) ~ (6)의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드들로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 펩티드, 또는 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 함유하는 글로빈 단백질분해물을 유효성분으로 함유한다:

- (1) Val-Val-Tyr-Pro (서열번호 1),
- (2) Trp-Gly-Lys-Val-Asn (서열번호 2),
- (3) Trp-Gly-Lys-Val (서열번호 3),
- (4) Trp-Gly-Lys (서열번호 4),
- (5) Ala-Ala-Trp-Gly-Lys (서열번호 5), 및
- (6) Phe-Glu-Ser (서열번호 6).

(72) 발명자

후지노 히로아키

일본 5670085 오사카 이바라키시 사이토 아사기
7-7-25 엠지 팜마 아이엔씨 나이

히다사 준네이

일본 5670085 오사카 이바라키시 사이토 아사기
7-7-25 엠지 팜마 아이엔씨 나이

특허청구의 범위

청구항 1

하기 (2) ~ (6)의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드들로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 펩티드, 또는 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 포함하는 글로빈 단백분해물을 유효성분으로 함유하는 혈압강하제:

- (2) Trp-Gly-Lys-Val-Asn (서열번호 2),
- (3) Trp-Gly-Lys-Val (서열번호 3),
- (4) Trp-Gly-Lys (서열번호 4),
- (5) Ala-Ala-Trp-Gly-Lys (서열번호 5), 및
- (6) Phe-Glu-Ser (서열번호 6).

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 경증고혈압용 경구투여 제제인 것을 특징으로 하는 혈압강하제.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, (2) ~ (6)의 아미노산 서열로 구성된 펩티드를 성인당 하루에 총량 1 mg ~ 500 mg의 비율, 또는 상기 펩티드의 적어도 1종을 함유하는 글로빈 단백분해물을 0.1 g ~ 5 g의 비율로 매일 경구투여되는 것을 특징으로 하는 혈압강하제.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

하기 (2) ~ (6)의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드들로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 펩티드, 또는 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 함유하는 글로빈 단백분해물을 유효성분으로 함유하는 고혈압상태의 개선, 또는 고혈압증의 예방 또는 치료용 조성물:

- (2) Trp-Gly-Lys-Val-Asn (서열번호 2),
- (3) Trp-Gly-Lys-Val (서열번호 3),
- (4) Trp-Gly-Lys (서열번호 4),

(5) Ala-Ala-Trp-Gly-Lys (서열번호 5), 및

(6) Phe-Glu-Ser (서열번호6).

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 펩티드를 유효성분으로 함유하는 혈압강화제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 고혈압 및 이로 인한 질환은 전세계적으로 사망의 주된 원인이 되고 있으며, 전세계적으로, 약 10억 명에 상응하는, 성인 네 명 중 한 명은, 이러한 질환을 앓고 있다고 한다. 특히, 고혈압으로 인해 발생한 심혈관 합병증의 위험성은 비-당뇨병 환자보다 당뇨병 환자에게서 2 내지 4배 더 높아, 국제 당뇨병연합에서는 엄격한 혈압 조절의 필요성을 주장하고 있다.

[0003] 그러나, 다양한 치료가 행해지고 있는데도 불구하고, 혈압은 고혈압 환자의 약 70%와 당뇨병 및 고혈압을 모두 앓고 있는 환자의 약 90%에서 바람직한 수준까지 감소되지 않는다. 비록 고혈압이 뇌졸중 및 심근경색증과 같은 심혈관질환에 주요 위험인자로 여겨지지만, 불충분한 혈압 조절(특히, 잠복성 고혈압)이 더욱 심각한 위험인자인 것은 잘 알려져 있지 않다. 사실, 뇌경색이 있는 고혈압 환자의 약 90%가 뇌경색의 발명 전에 고혈압을 치료해 왔다는 보고가 있으나, 이는 불충분한 항-고혈압 치료가 뇌졸중을 야기한다는 것을 정확하게 나타낸다. 또 다른 임상실험의 결과에서는 오직 10 mmHg까지 수축 혈압의 감소가 약 40%까지 뇌졸중의 발병을 감소시킬 수 있음을 나타내고 있어, 혈압에 있어서 "10 mmHg 증가"가 매우 높은 위험인자임을 나타낸다.

[0004] 고혈압 치료에 현재 사용되는 약제는 그들의 작용 매커니즘에 따라 하기 6종류의 형태로 개략적으로 분류될 수 있다:

[0005] (A) 이뇨제;

[0006] (B) 칼슘 길항제;

[0007] (C) 안지오텐신-수용체 길항제;

[0008] (D) 안지오텐신-전환 효소 억제제;

[0009] (E) 베타 수용체 차단제(beta blockers); 및

[0010] (F) 알파 수용체 차단제(alpha blockers).

[0011] 최근에, 혈압 감소 작용을 갖는 항-고혈압성 펩티드가 주목받고 있다. 항-고혈압성 펩티드의 특정 예시에는 나트륨노배설촉진제 펩티드(ANP, BNP, CNP)와 같은 생물기원의 펩티드(예를 들면, 비특허문헌 1 내지 3 참조) 및 아드레노메둘린(adrenomedullin)(비특허문헌 4 참조); 효소의 알부민 가수분해물 Arg-Pro-Leu-X-Pro-Trp(상기 X는 His, Lys, 또는 Arg)(서열번호: 7)(특허문헌 1 참조); 및 대두 단백질의 효소의 가수분해물(비특허문헌 5 참조)을 포함한다.

[0012] 생활방식 습관이 고혈압 발병에 강하게 영향을 미치는 것으로 여겨지고 있어서, 식생활이 다시 평가되고 있는 현재에 있어서는, 특허문헌 1 또는 비특허문헌 5에 기재된 것과 같은, 달걀 흰자위 또는 대두로부터 유래한 펩티드는 안전하고 달걀 흰자위 또는 대두의 섭취 및 뒤이어 일어나는 소화에 의해서 제조될 수 있기 때문에 이러한 펩티드는 매우 유용한 것으로 여겨진다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 일본비심사특허공개번호2002-80496

비특허문헌

- [0014] (비특허문헌 0001) F. Yoshihara, et al., Plasma atrial natriuretic peptide concentration inversely correlates with left atrial collagen volume fraction in patients with atrial fibrillation. Plasma ANP as a possible biochemical marker to predict the outcome of the maze procedure. J Am Coll Cardiol, 39, 288-294, 2002
- (비특허문헌 0002) T. Horio, et al. Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Endocrinology, 144, 2279-2284, 2003
- (비특허문헌 0003) Y. Takami, et al. Diagnostic and prognostic value of plasma brain natriuretic peptide in non-dialysis-dependent chronic renal failure. Am J Kidney Dis, 44, 419-429, 2004
- (비특허문헌 0004) F. Yoshihara, et al. Possible involvement of oxidative stress in hypoxia-induced adrenomedullin secretion in cultured rat cardiomyocytes. Eur J Pharmacol, 436, 1-6, 2002
- (비특허문헌 0005) Toshiro Matsui, "Production of Hypotensive Peptide, SVY, from 7S Globulin of Soybean Protein and Its Physiological Functions", Soybean protein research, 6, 73-77, 2003

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 저분자 펩티드, 특히 글로빈(globin) 단백질분해물에서 유래하는 펩티드를 유효성분으로 함유하는 혈압강화제를 제공하는 것이다.

[0016] 고혈압으로 인한 심혈관계 합병증의 위험성이 당뇨병 환자가 비-당뇨병 환자에 비해 2배 내지 4배 더 높기 때문에, 본 발명의 또 다른 목적은 혈압강화 작용과 더불어 항당뇨병 작용이 있고, 당뇨병 환자 또는 당뇨병 전단계에 있는 환자에 대한 고혈압의 개선에 특히 적절하게 사용할 수 있는 혈압강화제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명자들은, 상기 목적을 달성하기 위하여 광범위한 연구를 수행하던 중, 혈당상승 억제작용 또는 인슐린 분비 촉진작용을 가지는, 당뇨병 치료에 효과적인 것으로 알려져 있는 글로빈(globin) 단백질분해물(WO 2006/052031A1 참조), 및 상기 글로빈 단백질분해물에 포함되고 Val-Val-Tyr-Pro(서열번호 1), Trp-Gly-Lys-Val-Asn(서열번호 2), Trp-Gly-Lys-Val(서열번호 3), Trp-Gly-Lys(서열번호 4), Ala-Ala-Trp-Gly-Lys(서열번호 5), 또는 Phe-Glu-Ser(서열번호 6)의 아미노산 서열로 이루어진 각 펩티드가, 혈압이 높은 환자에 대하여 혈압강화 효과를 나타내는 것을 찾아냈고, 따라서 이러한 상기 과제를 해결하는 생리활성 펩티드로서 유효한 것을 확인하였다.

[0018] 또한, 본 발명자들은 상기 펩티드 중에서도 Val-Val-Tyr-Pro(서열번호 1)의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드, 및 이를 포함하는 글로빈 단백질분해물이, WO2006/052031A1에 기재된 바와 같이, 혈당상승 억제작용 또는 인슐린 분비 촉진작용을 가지는 것을 발견함으로써, 당뇨병 환자 또는 당뇨병 전단계에 있는 환자에 대한 고혈압의 개선에 적절하게 사용할 수 있는 생리활성 펩티드인 것을 확인하였다.

- [0019] 본 발명은 상기 발견에 근거하여 완성된 것이며, 하기의 태양을 제공한다.
- [0020] (I) 혈압강하제
- [0021] (I -1) 글로빈 단백분해물에서 유래하는 하기 (1) ~ (6)의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드들로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 펩티드, 또는 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 함유하는 글로빈 단백분해물을 유효 성분으로 함유하는 혈압강하제:
- [0022] (1) Val-Val-Tyr-Pro (서열번호 1),
- [0023] (2) Trp-Gly-Lys-Val-Asn (서열번호 2),
- [0024] (3) Trp-Gly-Lys-Val (서열번호 3),
- [0025] (4) Trp-Gly-Lys (서열번호 4),
- [0026] (5) Ala-Ala-Trp-Gly-Lys (서열번호 5), 및
- [0027] (6) Phe-Glu-Ser (서열번호 6).
- [0028] (I -2) (1) Val-Val-Tyr-Pro(서열번호 1)의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드, 또는 상기 펩티드를 함유하는 글로빈 단백분해물을 유효성분으로 함유하는, (I -1)에 기재된 혈압강하제.
- [0029] (I -3) 경증고혈압 환자에게 경구투여되는 것을 특징으로 하는 (I -1) 또는 (I -2)에 기재된 혈압강하제.
- [0030] (I -4) 고혈당증에 기인하는 질환을 가지거나 또는 그 전(前) 상태에 있는 고혈압 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는, (I -2)에 기재된 혈압강하제.
- [0031] (I -5) 경구투여 경로를 통해 (1) ~ (6)의 아미노산 서열로 구성된 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 성인당 하루에 총량 1 mg ~ 500 mg의 비율, 또는 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 함유하는 글로빈 단백분해물을 0.1 g ~ 5 g의 비율로, 매일 투여하는 것을 특징으로 하는, (I -1) 내지 (I -4) 중 어느 하나에 기재된 혈압강하제.
- [0032] II 고혈압상태의 개선 또는 고혈압상태에 기인하는 질환의 예방 또는 치료 방법
- [0033] (II -1) 글로빈 단백분해물에서 유래하는 하기 (1) ~ (6)의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드들로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 펩티드, 또는 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 함유하는 글로빈 단백분해물을 유효성분으로 함유하는 혈압강하제를 고혈압 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 고혈압상태의 개선 또는 고혈압상태에 기인하는 질환의 예방 또는 치료 방법:
- [0034] (1) Val-Val-Tyr-Pro (서열번호 1),
- [0035] (2) Trp-Gly-Lys-Val-Asn (서열번호 2),
- [0036] (3) Trp-Gly-Lys-Val (서열번호 3),
- [0037] (4) Trp-Gly-Lys (서열번호 4),
- [0038] (5) Ala-Ala-Trp-Gly-Lys (서열번호 5), 및
- [0039] (6) Phe-Glu-Ser (서열번호 6).
- [0040] (II -2) (1) Val-Val-Tyr-Pro(서열번호 1)의 아미노산 서열로 구성된 펩티드, 또는 상기 펩티드를 함유하는 글로빈 단백분해물을 유효성분으로 함유하는 혈압강하제를, 고혈당증에 기인하는 질환을 가진 고혈압 환자에게 투여

하는 단계를 포함하는, 고혈압상태의 개선 또는 고혈압상태에 기인하는 질환의 예방 또는 치료 방법.

- [0041] (Ⅱ-3) 경증고혈압 환자에게 경구투여되는 것을 특징으로 하는 (Ⅱ-1) 또는 (Ⅱ-2)에 기재된 방법.
- [0042] (Ⅱ-4) 고혈당증에 기인하는 질환을 가지거나 또는 그 전 상태에 있는 고혈압 환자에게 투여되는 것을 특징으로 하는 (Ⅱ-2)에 기재된 방법.
- [0043] (Ⅱ-5) 경구투여 경로를 통해, (1) ~ (6)의 아미노산 서열로 구성된 상기 펩티드를 성인당 하루에 총량 1 mg ~ 500 mg의 비율, 또는 상기 펩티드의 적어도 1종을 함유하는 글로빈 단백분해물을 0.1 g ~ 5 g의 비율로, 매일 투여하는 것을 특징으로 하는, (Ⅱ-1) 내지 (Ⅱ-4) 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0044] (Ⅲ) 펩티드 및 글로빈 단백분해물의 용도
- [0045] (Ⅲ-1) 글로빈 단백분해물에서 유래하는 하기 (1) ~ (6)의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드들로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 펩티드, 또는 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 함유하는 글로빈 단백분해물의, 혈압강하제의 제조를 위한 용도:
- [0046] (1) Val-Val-Tyr-Pro (서열번호 1),
- [0047] (2) Trp-Gly-Lys-Val-Asn (서열번호 2),
- [0048] (3) Trp-Gly-Lys-Val (서열번호 3),
- [0049] (4) Trp-Gly-Lys (서열번호 4),
- [0050] (5) Ala-Ala-Trp-Gly-Lys (서열번호 5), 및
- [0051] (6) Phe-Glu-Ser (서열번호 6).
- [0052] (Ⅲ-2) (1) Val-Val-Tyr-Pro(서열번호 1)의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드, 또는 상기 펩티드를 함유하는 글로빈 단백분해물의, 고혈당증에 기인하는 질환을 가지는 고혈압 환자에 대한 혈압강하제의 제조를 위한 용도.
- [0053] (Ⅲ-3) 고혈압상태의 개선 또는 고혈압상태에 기인하는 질환의 예방 또는 치료에 사용되는, 글로빈 단백분해물로부터 유래하는 하기 (1) ~ (6)의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드들로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 펩티드, 또는 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 함유하는 글로빈 단백분해물:
- [0054] (1) Val-Val-Tyr-Pro (서열번호 1),
- [0055] (2) Trp-Gly-Lys-Val-Asn (서열번호 2),
- [0056] (3) Trp-Gly-Lys-Val (서열번호 3),
- [0057] (4) Trp-Gly-Lys (서열번호 4),
- [0058] (5) Ala-Ala-Trp-Gly-Lys (서열번호 5), 및
- [0059] (6) Phe-Glu-Ser (서열번호 6).
- [0060] (Ⅲ-4) 고혈당증에 기인하는 질환을 가지는 고혈압 환자의 고혈압상태의 개선 또는 상기 환자의 고혈압상태에 기인하는 질환의 예방 또는 치료에 사용되는, (1) Val-Val-Tyr-Pro의 아미노산 서열(서열번호 1)로 이루어지는 펩티드, 또는 상기 펩티드를 함유하는 글로빈 단백분해물.

발명의 효과

- [0061] 본 발명은 혈압을 강하시켜서 고혈압상태를 개선할 수 있는 혈압강화제를 제공한다. 특히, (1) Val-Val-Tyr-Pro(서열번호 1)의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드, 또는 상기 펩티드를 함유하는 글로빈 단백분해물을 유효성분으로 함유하는 본 발명의 혈압강화제는, 혈압강화 작용과 함께 혈당상승 억제 작용 또는 인슐린 분비 촉진 작용을 가지기 위하여, 당뇨병 또는 그 전(前) 상태에 있는 고혈압 환자에 대하여 보다 효율적으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 글로빈(globin) 단백분해물 겔 여과 크로마토그램을 나타낸다(제조 예 1).
- 도 2는 제조예 2(3)에서 실시한 역상(산성)크로마토그래피의 결과(크로마토그램)를 나타낸다.
- 도 3은 제조예 2(4)에서 실시한 역상(중성)크로마토그래피의 결과(크로마토그램)를 나타낸다.
- 도 4는 제조예 3에서 실시한 글로빈 단백분해물 에탄올 5용량% 용출 분획물의 역상(산성)크로마토그래피의 결과(크로마토그램)를 나타낸다.
- 도 5는 제조예 3에서 실시한 글로빈 단백분해물 에탄올 15용량% 용출 분획물의 역상(산성)크로마토그래피의 결과(크로마토그램)를 나타낸다.
- 도 6은 자연발증 고혈압 래트에, 펩티드(VVYP)를 경구투여 했을 경우의, 혈압의 시간에 따른 변화를 나타낸다(실험예 1).
- 도 7은 자연발증 고혈압 래트에, 펩티드(VVYP)를 포함하는 글로빈 단백분해물을 경구투여 했을 경우의, 혈압의 시간에 따른 변화를 나타낸다(실험예 2).
- 도 8은 경증고혈압증의 인간 환자에게 펩티드(VVYP)를 포함하는 글로빈 단백분해물을 경구투여 했을 경우의, 혈압(수축기혈압, 이완기혈압)의 시간에 따른 변화를 나타낸다(실험예 3).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0063] 본 발명의 혈압강화제는, (1) Val-Val-Tyr-Pro(서열번호 1)의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드(이하, 간단히 "펩티드(VVYP)"라고 기재), (2) Trp-Gly-Lys-Val-Asn의 아미노산 서열(서열번호 2)로 이루어지는 펩티드(이하, 간단히 "펩티드(WGKVN)"라고 기재), (3) Trp-Gly-Lys-Val(서열번호 3)로 이루어지는 펩티드(이하, 간단히 "펩티드(WGKV)"라고 기재), (4) Trp-Gly-Lys(서열번호 4)로 이루어지는 펩티드(이하, 간단히 "펩티드(WGK)"라고 기재), (5) Ala-Ala-Trp-Gly-Lys(서열번호 5)로 이루어지는 펩티드(이하, 간단히 "펩티드(AAWGK)"라고 기재), 및 (6) Phe-Glu-Ser(서열번호 6)로 이루어지는 펩티드(이하, 간단히 "펩티드(FES)"라고 기재)들로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 펩티드, 또는 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 함유하는 글로빈 단백분해물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 한다.

- [0064] 상기 모든 펩티드는 공지의 펩티드 합성법을 이용하여 화학적 합성에 의해 제조할 수 있다. 펩티드 합성법의 예시는, 아자이드법, 산염화물법, 무수탄산법, 혼합 무수탄산법, DCC법, 활성 에스터(Ester)법, 카보이미다졸법, 산화환원법, DCC-첨가제(HOMB, HOBT, HOSu)법("The Peptide" Vol.1 (1966), Schreder&Luhke, Academic Press, New York, USA; 또는 "펩티드 합성" Izumiya et al., Maruzen (1975) 등), 등의 펩티드 합성법을 포함한다. 이러한 펩티드 합성법은, 고체상태 또는 액체상태 합성법의 어느 것으로도 실시될 수 있다.

- [0065] 상기 펩티드 합성법에 있어서, 예를 들면, 티로신(thyrosine) 및 트레오닌(threonine)과 같은, 측쇄 작용기를 가진 아미노산은, 상기 측쇄 작용기를 보호하는 것이 바람직하다. 사용될 수 있는 보호기의 예시에는 벤질옥시카보닐기(Cbz-), t-부트옥시카보닐(Boc-) 및 벤질(Bz-)기와 같은 공지의 보호기를 포함한다. 상기 보호기는, 본 발명의 펩티드 합성 과정에 있어서, 공지의 방법에 의해 제거될 수 있다.

- [0066]

- [0067] 또한, 상기 모든 펩티드는 헤모글로빈 및 미오글로빈(myoglobin)과 같은, 글로빈 단백질의 가수분해물(이하, "글로빈 단백질분해물"이라고 기재)에 포함되어 있기 때문에, 상기 글로빈 단백질분해물로부터 분리 및 정제하여 수득할 수 있다. 또한, 어육단백질, 어분(생선을 말려서 뺀 가루), 옥수수단백질(zein)의 가수분해물과 같은, 글로빈(globin) 이외의 단백질 가수분해물을 원료로서 분리 및 정제할 수 있다. 상기 글로빈 단백질이 동물성 단백질일 경우, 상기 단백질의 공급원은 특별히 한정되지 않고, 소, 돼지, 양, 인간, 및 말과 같은, 다양한 동물의 혈액을 이용할 수 있다. 또한, 사육된 동물의 고기 또는 어육과 같은, 다량의 미오글로빈(myoglobin)을 포함하는 육류를 상기 글로빈 단백질의 공급원으로서 이용할 수 있다.
- [0068] 글로빈 단백질의 가수분해 및 다른 절차들은, 국제공개공보 W089/06970에 기재된 방법에 따라 실시할 수 있다. 상기 가수분해는, 보통 산성 프로테아제, 중성 프로테아제 또는 알칼리성 프로테아제와 같은, 하나 또는 그 이상의 가수분해효소를 이용하여 실시된다.
- [0069] 보다 구체적으로는, 글로빈 단백질을 가수분해하기 위해서는, 우선 글로빈 단백질 함유물을 물에 5~30중량%(고형분으로서)가 되도록 분산하고, 프로테아제에 대한 최적 pH를 위해 산 및 알칼리로 pH를 조정하고, 프로테아제를 한번에 모두 또는 점차적으로 첨가하며, 20~70℃의 온도로 3~48시간 동안 상기 효소를 반응시키는 방법을 예시할 수 있다.
- [0070] 이렇게 하여 수득할 수 있는 글로빈 단백질분해물로부터 본 발명의 펩티드를 분리하는 방법으로는, 단백질 또는 펩티드에 관한 공지된 정제 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, 염석법, 투석법, 이온교환수지법, 한외여과법, 역상크로마토그래피법 등을 이용하고, 또한 필요하다면 이들을 적당히 조합시키는 것에 의해, 각 펩티드{펩티드(VVYP), 펩티드(WGKVN), 펩티드(WGKV), 펩티드(WGK), 펩티드(AAWGK), 또는 펩티드(FES)}를 포함하는 분획물(fraction)을 수득하고, 또한 상기 분획물로부터 상기 각 펩티드를 분리할 수 있다. 상기 정제 방법 중 역상크로마토그래피는, 산성조건하에서의 역상크로마토그래피, 또는 상기 산성조건하에서의 역상크로마토그래피와 중성하에서의 역상크로마토그래피를 조합시켜서 실시하는 것이 바람직하다.
- [0071] 각 분획물 내 단백질의 양은, 닐하이드린법과 같은, 공지된 단백질 정량법에 의해 측정할 수 있다. 또한, 선별된 분획물에 포함되는 펩티드의 아미노산 서열은, 공지된 방법(아미노산 분석법)에 의해 동정될 수 있고, 그것에 의해서 본 발명이 대상으로 삼는 펩티드(VVYP), 펩티드(WGKVN), 펩티드(WGKV), 펩티드(WGK), 펩티드(AAWGK) 또는 펩티드(FES)의 존재를 확인할 수 있다. 본 발명의 혈압강하제에는, 상기 방법에 의해 분리 및 정제된 펩티드 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 혈압강하 작용을 가지는 한, 상기 펩티드 중 적어도 하나를 포함하는 조생성물을 포함할 수 있다. 이러한 조생성물의 예시로는, 상기 펩티드를 포함하는 글로빈 단백질분해물 또는 이의 분획물을 들 수 있다.
- [0072]
- [0073] 본 발명의 혈압강하제는, 상기 펩티드들 또는 상기 펩티드들 중 적어도 1종을 포함하는 상기 조생성물(글로빈 단백질분해물 또는 이의 분획물)로 구성될 수 있으나, 통상, 상기 혈압강하제는 상기 유효성분에 더하여 약학적으로 허용가능한 담체 또는 첨가제와 함께 제조된다. 약학적으로 허용가능한 담체 또는 첨가제를 조합시켜서 혈압강하제를 제조할 경우, 배합하는 각 펩티드의 양은, 혈압강하 작용을 가지는 유효량이라면, 특별히 제한되지 않는다.
- [0074] 상기 펩티드(VVYP) 또는 상기 펩티드를 함유하는 글로빈 단백질분해물은, 혈압강하 작용과 더불어, 혈당상승 억제 작용 또는 인슐린 분비 촉진작용을 가지고 있다. 이 때문에 본 발명의 혈압강하제가 상기 펩티드(VVYP) 또는 상기 펩티드를 함유하는 글로빈 단백질분해물을 유효성분으로 함유하는 경우, 배합하는 상기 펩티드의 양은, 혈압강하 작용을 가지고, 더불어 혈당상승 억제작용 또는 인슐린 분비 촉진작용을 나타내는 유효량인 것이 바람직하다.

[0075] 여기에서 본 발명의 혈압강하제에 배합하는 상기 담체는, 제제의 투여 형태에 따르고, 보통 사용되는 첨가제, 희석제, 결합제, 습윤제, 붕괴제, 붕괴억제제, 흡수 촉진제, 유회제, 용해보조제, 완충제, 유화제, 및 현탁제 등에서 적절히 선택할 수 있다. 상기 첨가제는, 제제의 투여 형태에 따르고, 보통 사용되는 안정화제, 보존제, 완충제, 등장화제, 킬레이트제, pH조정제, 계면활성제, 착색제, 향료, 풍미제, 및 감미료 등에서 적절히 선택할 수 있다.

[0076] 상기 혈압강하제의 투여 단위 형태는, 투여 경로에 따라서 다양한 형태에서 적절히 선택할 수 있고, 이러한 형태는 크게 경구제, 경폐투여제, 경비제, 설하제, 비경구제(주사제, 점적제) 등으로 분류된다. 상기 혈압강하제는 공지의 방법을 따르고, 정제, 환제, 가루약, 분말제, 과립제, 및 캡슐제 등의 고체투여 형태; 또는 용액, 현탁제, 유제, 시럽, 및 엘릭시르(Elixir) 등의 물약투여 형태로 조합할 수 있다. 또한, 사용시에 적절한 담체를 첨가함으로써 액상으로 전환될 수 있는 건조품으로서 조제될 수 있다. 이들은 모두 공지의 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0077] 본 발명의 상기 혈압강하제에 배합되는 각 펩티드의 비율은, 총량에서 일반적으로 약 0.001~80중량%, 바람직하게는 약 0.1~50중량%, 더욱 바람직하게는 약 0.1~10중량%일 수 있다.

[0078] 이렇게 하여 수득할 수 있는 상기 혈압강하제의 투여량은, 그 목적(혈압강하 작용의 발휘, 또는 혈당상승 억제 작용 또는 인슐린 분비 촉진작용에 더불어 혈압강하 작용의 발휘), 상기 혈압강하제의 투여 방법, 투여 형태, 투여하는 환자의 연령이나 체중 또는 증상(질병의 중증도) 등에 따라서 적당히 선택될 수 있다. 구체적으로는, 본 발명의 펩티드의 투여량(2개 이상의 펩티드를 조합시켜서 투여할 경우는 총량)은, 성인당 하루에, 약 1 ~ 500 mg, 바람직하게는 약 2 ~ 100 mg의 범위일 수 있다. 본 발명의 상기 글로빈 단백질분해물의 투여량은, 성인당 하루에, 0.1~5 g, 바람직하게는 약 0.5~3 g의 범위일 수 있다.

[0079] 상기 투여는 반드시 1일 1회일 필요는 없고 1일 2~4회로 분할하여 투여하는 것도 가능하다. 상기 각종 형태의 제제는, 그 형태에 따른 적절한 투여 경로, 예를 들면 주사제 형태에 있어서는, 정맥내, 근육내, 피하, 가죽(접질)내, 복강내 투여 등에 의해, 고체형태의 의약제제는, 경구투여 등에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게는 경구투여형태이다.

[0080]

[0081] 본 발명의 상기 혈압강하제는, 하기 실험예에서 나타난 바와 같이, 고혈압상태에 있는 환자에 대하여 혈압강하 작용을 나타내고, 고혈압상태를 개선한다. 이 때문에 본 발명의 혈압강하제는, 고혈압상태에 기인하는 질환의 예방 또는 치료제로서도 유효하다.

[0082] 일본 고혈압학회 및 WHO/ISH에서 규정하는 고혈압 분류를 표 1에 나타낸다.

표 1

[0083]

분류	수축기혈압	이완기혈압
최적혈압	<120	및 <80
정상혈압	<130	및 <85
고정상혈압	130 ~ 139	또는 85 ~ 89
경중고혈압	140 ~ 159	또는 90 ~ 99
중중중고혈압	160 ~ 179	또는 100 ~ 109
중중고혈압	≥180	또는 ≥110
수축기고혈압	≥140	및 <90

[0084] (일본 고혈압학회, 고혈압 치료에 대한 지침의 제작을 위한 위원회에서 편집한, 2004 고혈압 치료 지침)

[0085] 본 발명이 대상으로 삼는 고혈압 환자로는, 상기 고혈압 분류에서의 경증고혈압, 중등증고혈압, 중증고혈압, 및 수축기고혈압에 속하는 환자가 포함된다. 바람직하게는, 경증고혈압, 중등증 고혈압, 또는 중증고혈압에 속하는 환자이며, 보다 바람직하게는 경증고혈압에 속하는 환자이다. 특히 본 발명에서 사용하는 펩티드(VVYP) 및 상기 펩티드를 포함하는 글로빈 단백질분해물은, 수축기혈압보다 이완기혈압을 내리는 작용이 강하다. 이 때문에, 상기 펩티드 및 상기 펩티드를 포함하는 글로빈 단백질분해물을 유효성분으로 함유하는 본 발명의 혈압강하제가 표적으로 하는 적합한 고혈압 환자로서는, 이완기혈압이 비교적 높은 고혈압환자일 수 있다.

[0086] 또한, 펩티드(VVYP) 및 상기 펩티드를 포함하는 글로빈 단백질분해물을 유효성분으로 함유하는 본 발명의 혈압강하제는, 상기 혈압강하 작용과 더불어, 유효성분인 펩티드(VVYP)에 기인해서 인슐린 분비 촉진작용을 가지고, 인슐린 작용의 저하 또는 결핍에 의해 생기는 고혈당상태를 개선하고, 혈당강하 작용을 나타낸다. 이 때문에, 상기 혈압강하제는, 인슐린 작용의 저하 또는 결핍에 의해 생기는 고혈당상태에 기인하는 각종 질환을 가지는 고혈압 환자를 위하여, 이롭게 사용되는 혈압강하제로서 유효하다. 여기서 고혈당상태에 기인하는 질환으로서, 당뇨병 및 당뇨병의 합병증을 들 수 있다. 여기서 표적으로 하는 당뇨병에는, II형 당뇨병(인슐린 비의존형 당뇨병) 및 I형 당뇨병(인슐린 의존형 당뇨병)이 모두 포함된다. 바람직하게는 인슐린 비의존성의 II형 당뇨병이다. 일본 당뇨병학회의 지침(1999)에 의하면, 수시 혈당값이 200 mg/dL 이상, 공복시 혈당값이 126 mg/dL 이상, 75 g 경구 포도당 부하 시험 후 2시간 후-로드값이 200 mg/dL 이상의 어느 것에 해당할 경우에, 당뇨병이라고 판단할 수 있다. 또한, 다른 날의 검사로 상기 기준에 2회 해당할 경우, 또는 1회의 확인이라도 당뇨병의 특징적인 증상이 있을 경우, HbA1c(헤모글로빈A1c)이 6.5% 이상의 경우, 또는 당뇨병 망막증이 있을 경우, 당뇨병이라고 판단할 수 있다. 본 발명이 표적으로 하는 당뇨병 환자에게는, 그 전(前) 단계, 즉 경계영역에 있는 환자(경계형 당뇨병 환자)도 포함된다. 한편, 공복시 혈당값이 110~125 mg/dL 사이, 또는 포도당 부하 시험 후 2시간-로드값이 140~199 mg/dL 사이에 있을 경우, 경계형 당뇨병이라고 판단할 수 있다.

[0087] 또한, 당뇨병 합병증은 당뇨병(바람직하게는 인슐린 비의존성의 II형 당뇨병)에 의해 직접 또는 간접적으로 발병하는 전신성 혹은 국소성의 질환이며, 구체적으로는, 당뇨병 아시도시스(acidosis), 당뇨병성 황색종, 당뇨병성 근위축증, 당뇨병성 케토시스, 당뇨병성 혼수, 당뇨병성 위장해, 당오줌성 괴저, 당뇨병성 궤양, 당뇨병성 합병증, 당뇨병성 실사증, 당뇨병성 미세혈관병증, 당뇨병성 자궁체 경화증, 당뇨병성 심근증, 당뇨병성 신경병증, 당뇨병성 신장증, 당뇨병성 수포증, 당뇨병성 백내장, 당뇨병성 피부장해, 당뇨병성 부종성 경화증, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 유지방성 괴사생성증, 당뇨병성 혈액순환 장애 등을 예시할 수 있다.

[0088] 실시예

[0089] 이하, 본 발명의 제조에 및 실험예를 더욱 상세히 설명한다. 단, 이러한 실험예에 의해 본 발명을 한정하는 것은 아니다. 한편, 하기의 실험예에 있어서, 특별히 언급하지 않는 한, %는 중량%를 의미한다.

[0090] 제조예 1 글로빈 단백질분해물의 제조

[0091] 소 적혈구를 사용한 글로빈 단백질분해물의 제조법을 하기에 상세히 설명한다.

[0092] 신선한 소 적혈구 100 kg에 물 250 ℓ를 첨가하여 충분히 용혈시키고, 인산을 첨가하여 pH를 2.8에 조정후, 아스페르길루스 니거(*aspergillus niger*)의 산성 프로테아제 2.6×10^7 유닛을 첨가하여, 50℃에서 3시간 반응시켰다.

[0093] 반응 후, 상기 반응액을 80℃에서 30분간 가열하여 반응을 정지시킨 후, 수산화칼슘의 물현탁액을 첨가하여 pH를 6.5에 조정하고, 규조토 10 kg을 첨가하고, 필터 프레스를 이용해서 여과하고, 수득한 여과액을 분무 건조하

여 글로빈 단백분해물의 분말 23 kg을 얻었다. 이렇게 하여 얻은 글로빈 단백분해물의 분자량 분포를, 하기 조건하에서, 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 조사하였다.

[0094] <겔 여과 크로마토그래피>

[0095] 장치: 고속 액체크로마토그래프(chromatograph)((주) Shimadzu Corporation, 모델 "LC-6A")

[0096] 컬럼: PolyHYDROXYETHYL A, 5 μ m, 9.4 $\times$ 200 mm, PolyC Inc. 제조

[0097] 용출용매: 50 mM 포름산

[0098] 유속: 0.5 ml/분

[0099] 검출: 221 nm에서 자외선 흡수

[0100] 상기 겔 여과 크로마토그래피법에 의한 글로빈 단백분해물 겔 여과 크로마토그램을 도 1에 나타냈다.

[0101] 제조예 2 혈압강하 펩티드의 분획 및 정제

[0102] 본 발명의 펩티드(VVYP)는, 제조예 1로 제조한 글로빈 단백분해물을, (1)이온교환, (2)한외여과, (3)산성조건하에서 역상 컬럼 크로마토그래피에 의한 분리, 및 (4)중성조건하에서 역상 크로마토그래피에 의한 분리의 순서로 처리하여 수득할 수 있었다.

[0103] (1)이온교환

[0104] 제조예 1에서 수득한 글로빈 단백분해물 13.7 g의 10% 수용액을, 약산성mg 양 이온 교환 수지(Amberlite IRC₅₀, H⁺ 형태, Organo Co., Ltd)에 가하여, 1시간 교반하여 흡착시킨 후, 미흡착 분획물을 얻었다.

[0105] (2)한외여과

[0106] 상기 이온교환 처리에 의해 수득한 미흡착 분획물에 대하여, 교반형 한외여과 장치(Advantec 제조, "UHP 90K") 및 한외여과 막(Advantec 제조, "UIIH-1", 분획분자량 1000)을 이용하여 한외여과를 실시하였고, 한외여과 막 위에 남은 액체(잔액)를 채취하였다. 수득한 분획물은, 산 가수분해한 후 닐하이드린법에 의해 정량하였다. 산가수분해는, 단백질량 3~5 mg에 대하여, 최종농도 6N의 염산 1 ml를 시험관에 넣어, 상기 시험관을 대기압하에서 밀봉하여, 110℃에서 22시간 동안 가열하여 실시하였다. 또한, 상기 닐하이드린법은 하기와 같이 실시하였다. 즉, 가수분해 후의 검체를 수산화나트륨으로 pH5.0에 조정하고, 0.2M 구연산완충액(pH5.0)을 함유한 닐하이드린 시약을 이용하여 100℃에서 15분간 반응시켜, 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 별도로, 표준용액으로서 L-류신(leucine) 수용액(75, 150, 225, 300 nmol/ml)에 대해서 닐하이드린 반응을 수행하였고, 측정된 흡광도로부터 검량선을 구하였고, 검체의 L-류신(leucine)에 해당하는 아미노기의 양을 산출하였다. 상기 정량 결과를 표 2에 나타냈다.

[0107] (3) 역상(산성)크로마토그래피

[0108] 상기 한외여과로 수득한 잔액에 대하여, 하기의 조건으로 역상(산성)크로마토그래피를 실시하였다.

[0109] <역상(산성)크로마토그래피>

[0110] 장치: 고속 액체크로마토그래프(chromatograph)((주) Shimadzu Corporation, 모델 "LC-10A")

[0111] 컬럼: SuperPac Pep-S, 15 μ m, 22.5 $\times$ 250 mm, Pharmacia(주)제조

- [0112] 용출용매: 0.1용량%의 트리플루오르아세트산 함유 아세토니트릴 수용액
- [0113] 농도구배: 아세토니트릴 농도 2용량% 내지 35용량%의 직선적 농도구배(비탈)
- [0114] 아세토니트릴 농도변화: 1용량% 증가/분
- [0115] 유속: 5 ml/분
- [0116] 온도: 40℃
- [0117] 검출: 220 nm에서 자외선 흡수
- [0118] 분획 시간: 53.8~54.5분(분획물 A).
- [0119] 상기 역상(산성)크로마토그래피에 의한 크로마토그램을 도 2에 나타냈다.
- [0120] 이와 같이 수득한 분획물은, 산 가수분해한 후, 아미노산 분석에 의해 정량하였다. 산가수분해는, 단백질량 3~5 mg에 대하여, 염산(최종농도 6N) 1 ml를 시험관에 넣어, 상기 시험관을 압력을 감소시키면서 밀봉하여, 110℃에서 22시간 동안 가열하였다. 또한, 아미노산 분석은 하기의 조건으로 다음과 같이 실시하였다.
- [0121] <아미노산분석>
- [0122] 장치: 고속액체 크로마토그래프(chromatograph)((주) Shimadzu Corporation, 모델 "LC-6A")
- [0123] 컬럼: Shim-pack ISC-07/S1504 Na, 7 μ m, 4.0 $\times$ 150 mm, Shimadzu Corporation제조
- [0124] 용출용매: Shimadzu Corporation에서 제조한 아미노산 이동상 키트(Na형)
- [0125] 유속: 0.3 ml/분
- [0126] 온도: 55℃
- [0127] 반응액 1: Shimadzu Corporation에서 제조한 분석 키트 OPA 시약
- [0128] 검출: 형광 흡수(Ex 348 nm, Em 450 nm).
- [0129]
- [0130] 산 가수분해한 용액을 회전 농축기(Rotary Evaporator)로 농축하여, 추가적으로 압력을 감소하면서 12시간 이상 건조시켜, 염산을 완전히 제거하였다. 그런 다음, 각 아미노산 함량이 100 nmol/ml 정도가 되도록 0.2 M 구연산완충액(pH2.2)에 용해하였고, 이 용액을 0.45 μ m 필터에 여과하여 여과액 10 μ l를 컬럼에 주입하였다. 한편, 표준용액으로는, 아미노산 혼합 표준액 18 성분 H형(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)을 0.2 M 구연산완충액(pH2.2)으로 25배 희석한 후, 10 μ l를 주입하였다(각 아미노산 1 nmol/10 μ l). 아미노산의 피크 면적 산출은 chromatopac C-R4A(Shimadzu Corporation 제조)로 분석하였고, 표준용액과의 피크 면적비로 아미노산량을 산출하였다.
- [0131] (4) 역상(중성)크로마토그래피
- [0132] 상기 역상(산성)크로마토그래피로 용출하고, 분획한 분획물에 대하여, 추가적으로 이하의 조건으로 역상(중성)크로마토그래피를 실시하였다.
- [0133] <역상(중성)크로마토그래피>
- [0134] 장치: 고속액체 크로마토그래프(chromatograph)((주) Shimadzu Corporation, 모델 "LC-10A")
- [0135] 컬럼: SuperPac Pep-S, 15 μ m, 22.5 $\times$ 250 mm(Pharmacia(주)제조)
- [0136] 용출용매: 20 mM 초산암모늄 완충액(pH6.5) 함유 아세토니트릴 수용액

[0137] 농도구배: 아세토니트릴 농도 0용량% 내지 25용량%의 직선적 농도구배(비탈)

[0138] 아세토니트릴 농도변화: 0.5용량%/분

[0139] 유속: 5 ml/분

[0140] 온도: 40℃

[0141] 검출: 220 nm에서 자외선 흡수

[0142] 분획시간: 45.8분~51.0분(분획물 B).

[0143]

[0144] 상기 역상(중성)크로마토그래피에 의한 크로마토그램을 도 3에 나타냈다.

[0145] 상기 수득한 분획물은, 상기 (3)과 같이 정량하였고, 추가적으로 동정하였다. 아미노산 조성은, 수득한 아미노산 함량의 합계에 대한 각 아미노산량의 비율로 산출하였다. 그 결과, 분획물 B는 VVYP(Val-Val-Tyr-Pro)인 것을 확인하였다. 이러한 펩티드를 헤모글로빈의 아미노산 서열과 대조한 결과, 모든 상기 펩티드의 서열이 헤모글로빈에 존재하는 것으로 확인되었다. 상기 정량 결과를 표 2에 나타냈다.

표 2

[0146]

펩티드	단백질량 (g)
글로빈 단백질분해물	13.70
이온교환 + 한외여과 역상크로마토그래피	4.24
[분획물 A]	0.39
[분획물 B]	0.006

[0147] 제조예 3 혈압강하 펩티드의 분획 및 정제

[0148] 제조예 1에서 제조한 글로빈 단백질분해물 100 g을 포함하는 10% 수용액을, 역상 수지(YSM ODS AQ120 S50)를 충전한 오픈 컬럼($\Phi 100 \text{ mm} \times 400 \text{ mm}$)에 흡착시켜, 용출액으로서 수화 에탄올을 이용하였고, 에탄올 농도를 5~15용량%의 범위로 5용량%에 의해 순차적으로 증가시켜 용출시켰다. 그런 다음에, 에탄올 5용량% 용출 분획물 및 15용량% 용출 분획물을 각각 하기 조건으로 역상(산성)크로마토그래피를 실시하였다.

[0149] <역상(산성)크로마토그래피>

[0150] 장치: 고속액체 크로마토그래프(chromatograph){Waters Alliance 2695-2996(Waters Corporation 제조)}

[0151] 컬럼: Nucleosil 5C18120Å $\Phi 4.0 \times 250 \text{ mm}$ (Chemco Scientific Co., Ltd 제조)

[0152] 용출용매: 0.1용량% 트리플루오로아세트산 함유 아세토니트릴 수용액

[0153] 농도구배: 0분~5분: 아세토니트릴 농도 5용량%, 5분~30분: 아세토니트릴 농도 5~30용량%의 직선적 농도구배(비탈)(아세토니트릴 농도 변화 1용량%/분)

[0154] 유속: 0.8 ml/분

[0155] 온도: 40℃

[0156] 검출: 210 nm에서 자외선 흡수

[0157] 주입량: 20 μl .

[0158] 에탄올 5용량% 용출 분획물 및 15용량% 용출 분획물의 역상 크로마토그램을 각각 도 4 및 도 5에 나타냈다.

[0159]

[0160] 각 크로마토그램으로부터 얻은 각 피크를 분획하였고, 제조예 2에 기재한 방법에 따라, 산 가수분해한 후에 아

미노산 분석을 실시한 결과, 5용량% 용출 분획물의 역상 크로마토그램(도 4)에 있어서 보유시간 12.55분의 용출 피크는, 아미노산 서열 Phe-Glu-Ser(서열번호 6)으로 이루어진 펩티드(펩티드(FES))에 상응하는 피크이며, 또한 15용량% 용출 분획물의 역상 크로마토그램(도 5)에 있어서 보유시간 18.16분 및 19.53분의 용출 피크는, 각각 아미노산 서열 Ala-Ala-Trp-Gly-Lys으로 이루어진 펩티드(펩티드(AAWGK)) 및 Trp-Gly-Lys-Val-Asn으로 이루어진 펩티드(펩티드(WGKVN))에 상응하는 피크인 것으로 밝혀졌다.

[0161]

[0162] 실험예 1

[0163] 자연발증 고혈압 래트(rat)(SHR/Izm, 수컷, 9주령, 체중 266 g, 일본 SLC, Inc.)(6 마리)에, 제조예 2에서 제조한 펩티드(VVYP)를, 10 mg/kg의 투여량으로 단회 경구투여하였다. 투여 시작으로부터 2시간째 및 6시간째에, 비가열 비침습식 혈압계(Muromachi Kikai Co., Ltd. 제조, "MK-2000")를 사용하여 무마취하에서 Tail-cuff법에 의해 수축기혈압을 측정하였다(-○-). 대조군으로서 SHR 래트(6 마리)에 용매(증류수)를 단회 경구투여하였고, 같은 방법으로 수축기혈압을 측정하였다(-●-). 그 결과를 도 6에 나타냈다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 펩티드(VVYP)는 혈압하강 작용이 있는 것으로 확인되었다.

[0164]

[0165] 실험예 2

[0166] 자연발증 고혈압 래트(rat)(SHR/Izm, 웅성, 14주령, 투여 시작시 체중범위 309 g~359 g, 일본 SLC, Inc.)(8 마리)에, 제조예 1에서 제조한 펩티드(VVYP)를 함유하는 글로빈 단백분해물을, 1 g/kg의 투여량으로 10주간 경구 투여하였다. 투여 시작으로부터 2주마다, 비가열 비침습식 혈압계(Muromachi Kikai Co., Ltd. 제조, "MK-2000")를 사용하여 무마취하에서 Tail-cuff법에 의해 수축기혈압을 측정하였다(-○-). 대조군으로서 SHR 래트(8 마리)에 용매(증류수)를 10주간 경구투여하였고, 같이 방법으로 수축기혈압을 측정하였다(-●-). 그 결과를 도 7에 나타냈다.

[0167] 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 펩티드(VVYP)를 포함하는 글로빈 단백분해물은, 혈압상승을 억제하는 작용이 있는 것을 알 수 있다.

[0168] 실험예 3

[0169] 경증고혈압 환자(수축기혈압:140~159 mmHg 또는 이완기혈압:90~99 mmHg) 89명을 무작위로 2 그룹(44명 및 45명)으로 나누고, 실험군(45명)에게는 제조예 1에서 제조한 펩티드(VVYP)를 함유하는 글로빈 단백분해물 500 mg을, 1일 3회, 10주에 걸쳐 경구투여하였다. 한편, 대조군(44명) 환자에게는 동량의 유당을 투여하였다. 투여 시작으로부터 3주째, 6주째, 및 10주째에 혈압(수축기혈압, 이완기혈압)을 측정하였고, 혈압의 변화를 평가하였다.

[0170]

[0171] 그 결과를 도 8에 나타냈다. 도 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 글로빈 단백분해물의 경구투여에 의해, 수축기혈압은 저하하는 경향을 나타냈고, 이완기혈압은 투여로부터 6주째 이후에 유의적인 차이로 저하했다(-○-). 한편, 투여로부터 10주째에 있어서의 실험군과 대조군(-●-) 간의 차이는, 수축기혈압이 약 5 mmHg, 이완기혈압이 약 8 mmHg이었다. 상기의 결과로, 펩티드(VVYP)를 포함하는 글로빈 단백분해물은, 인간에 대한 혈압하강 작용이 있는 것을 알 수 있다.

[0172] 실험예 4

[0173] 제조예 3에서, 글로빈 단백분해물로 분리 동정된 펩티드의 아미노산 서열을 바탕으로, 하기의 펩티드를 공지의 방법에 따라 합성하였다. 덧붙이자면, (3)의 펩티드(WGKV) 및 (4)의 펩티드(WGK)는, (2)의 펩티드(WGKVN)의 아미노산 서열로부터 C 말단의 아미노산을 1개씩 제거한 펩티드에 상응한다.

[0174] (2) Trp-Gly-Lys-Val-Asn (서열번호 2)

- [0175] (3) Trp-Gly-Lys-Val (서열번호 3)
- [0176] (4) Trp-Gly-Lys (서열번호 4)
- [0177] (5) Ala-Ala-Trp-Gly-Lys (서열번호 5)
- [0178] (6) Phe-Glu-Ser (서열번호 6).

[0179] 자연발증 고혈압 래트(SHR/Izm, 수컷, 12주령, 체중 285 g, 일본 SLC, Inc.)에, 상기에서 제조한 각 합성 펩티드((2) ~ (6))를, 50 mg/kg의 투여량으로 단회 경구투여하였다. 투여 시작으로부터 2시간째, 4시간째 및 6시간째에, 비가열 비침습식 혈압계(Muromachi Kikai Co., Ltd. 제조, "MK-2000")를 사용하여 무마취하에서 Tail-cuff법에 의해 수축기혈압을 측정하였다. 대조군으로서 자연발증 고혈압 래트에, 용매(증류수)를 단회 경구투여하였고, 같은 방법으로 수축기혈압을 측정하였다. 그 결과를 표 3에 나타냈다. 표 3에 나타낸 바와 같이, 상기 펩티드는 모두 혈압하강 작용이 있는 것으로 밝혀졌다.

표 3

아미노산 서열	n	혈압하강 (mmHg)		
		투여 후 2시간	투여 후 4시간	투여 후 4시간
WGKVN	11	-16±4**	-12±4*	-14±3**
WGKV	8	-9±3	-4±4	-3±3
WGK	4	-3±7	-23±8**	-15±8
AAWGK	4	-7±4	-8±12	-4±8
FES	4	-15±4*	-13±8	-15±6

[0181] * p<0.05, ** p<0.01

[0182] 실험예 5 안전성 시험

[0183] 암컷 및 수컷의 ICR계 마우스에, 제조예 2에서 제조한 펩티드(VVYP)를 체중당 10 g/kg 이상(투여가능한 최대량)으로 경구투여 하였으나, 사망한 예는 없었다. 이로부터, 상기 펩티드의 안전성이 확인되었다.

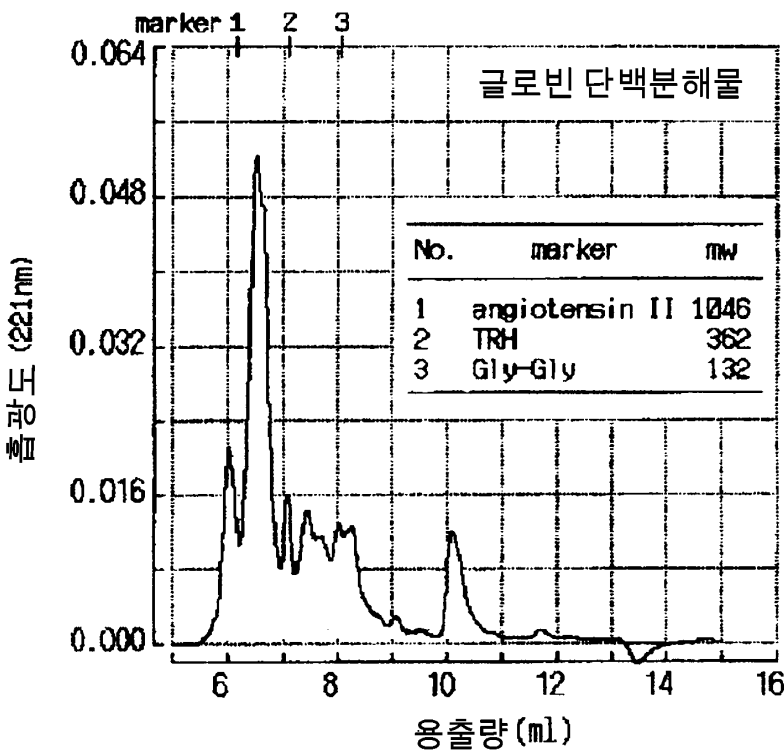
[0184] 서열 목록 프리 텍스트

[0185] 서열번호 1 ~ 6은, 글로빈 단백질의 가수분해물(글로빈 단백질분해물)에 포함되는 펩티드의 아미노산 서열을 나타낸다.

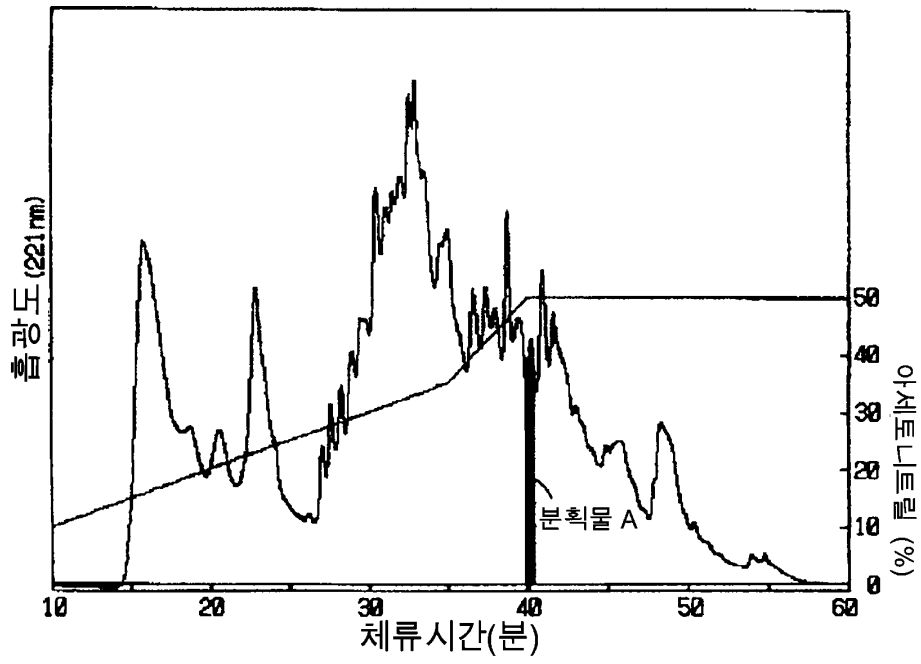
[0186] 서열번호 7은, 흰자위의 효소 가수분해물에 포함되는 펩티드의 아미노산 사열을 나타낸다.

도면

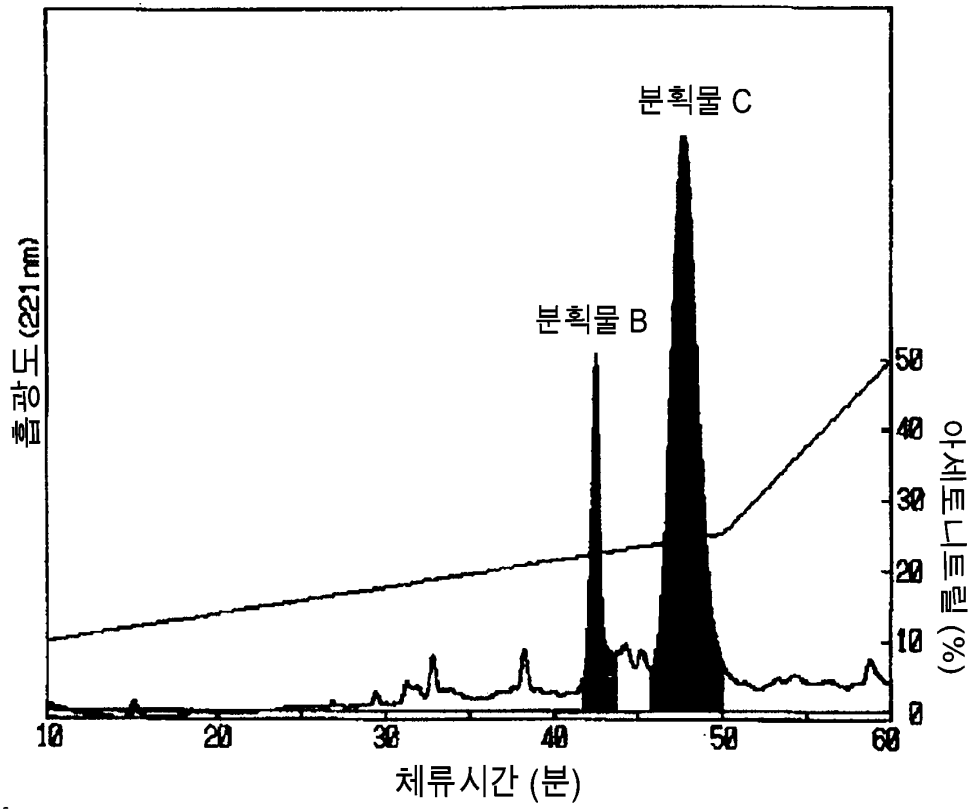
도면1



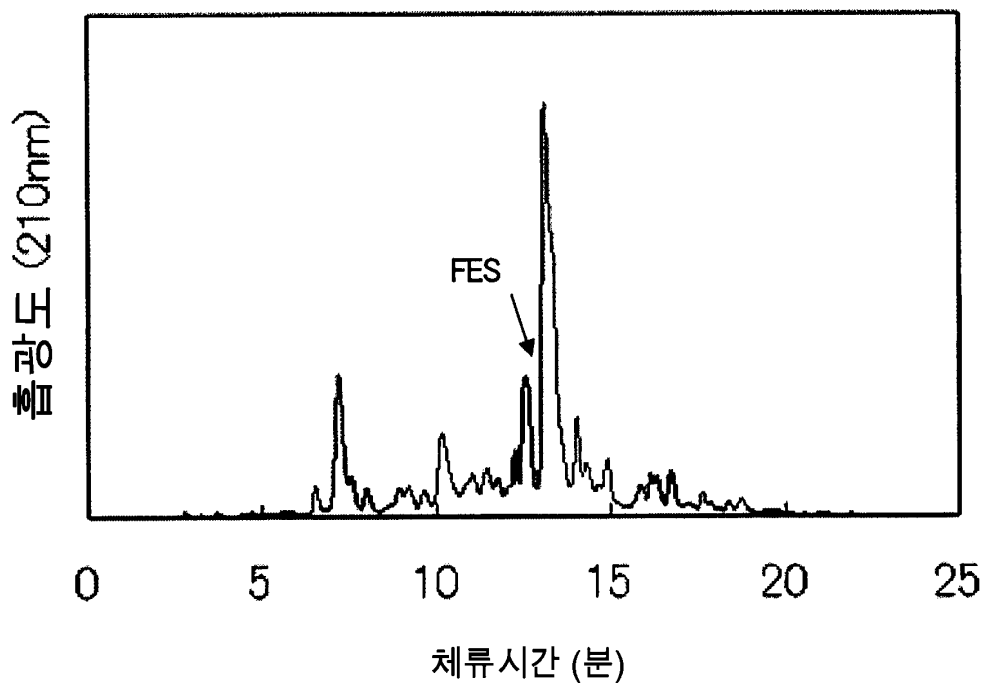
도면2



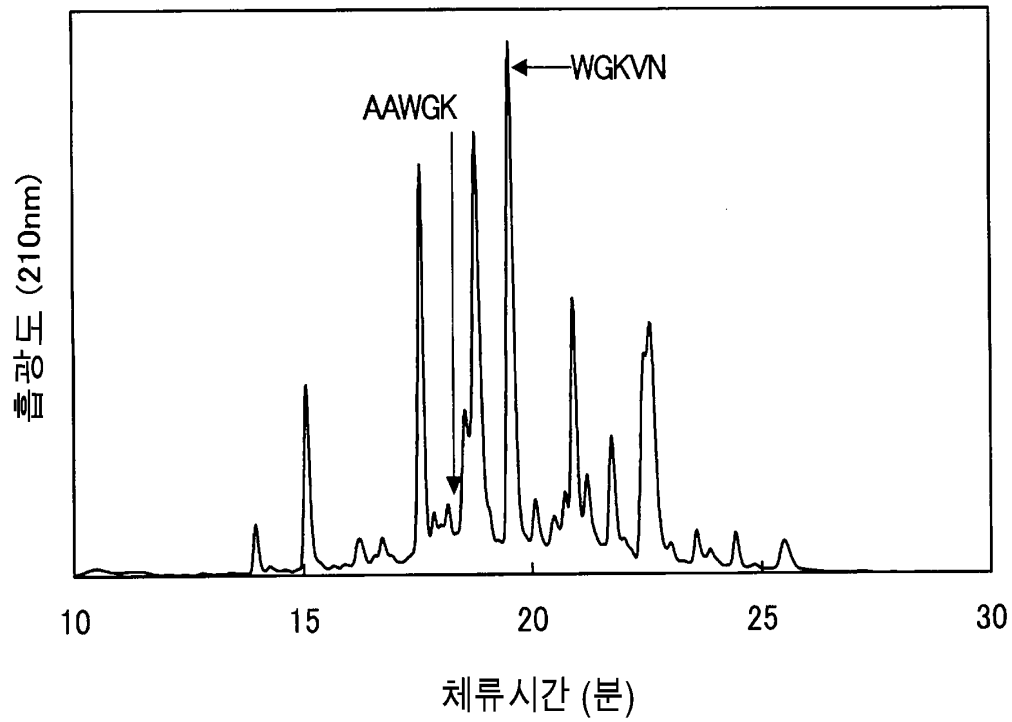
도면3



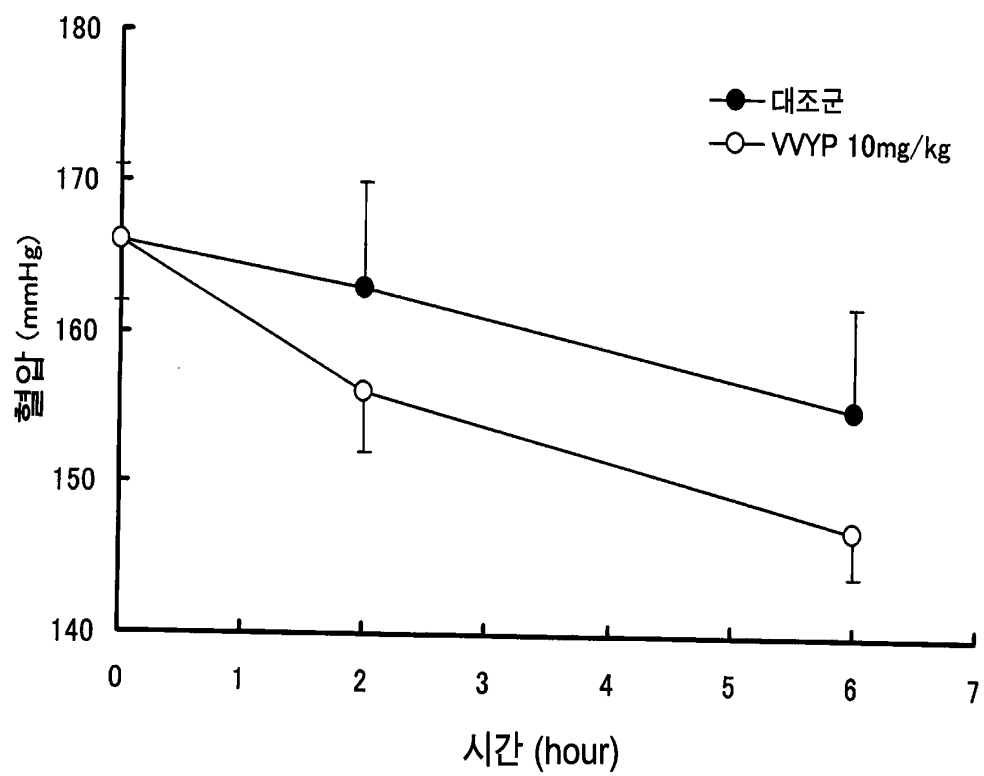
도면4



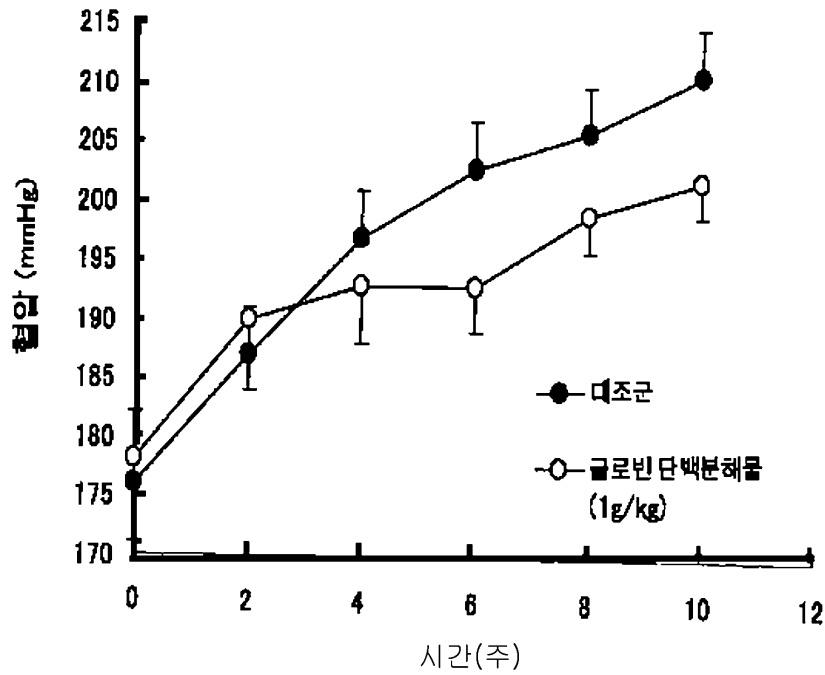
도면5



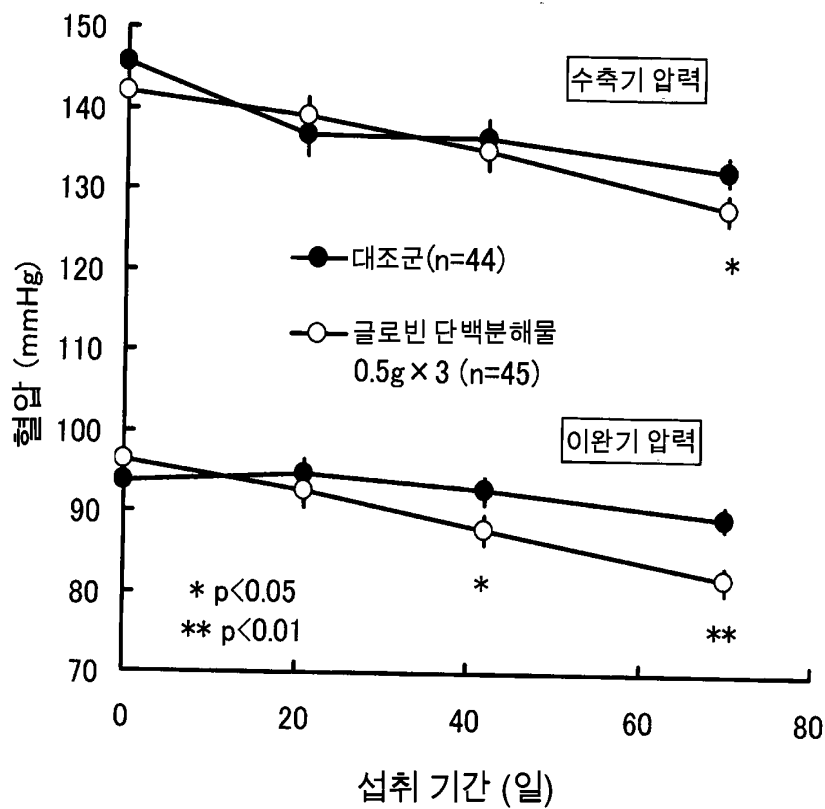
도면6



도면7



도면8



<110> MG PHARMA Inc.
 <120> ANTI-HYPERTENSIVE AGENT
 <130> 10fpi-01-12
 <150> JP2007-204929
 <151> 2007-08-07
 <150> PCT/JP2008/064247
 <151> 2007-08-07
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Peptide found in globin hydrolysate
 <400> 1
 Val Val Tyr Pro
 1
 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Peptide found in globin hydrolysate
 <400> 2
 Trp Gly Lys Val Asn
 1 5
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Peptide found in globin hydrolysate
 <400> 3
 Trp Gly Lys Val
 1
 <210> 4
 <211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide found in globin hydrolysate

<400> 4

Trp Gly Lys

13

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide found in globin hydrolysate

<400> 5

Ala Ala Trp Gly Lys

1 5

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide found in globin hydrolysate

<400> 6

Phe Glu Ser

13

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide found in egg white. Xaa represents His, Lys or Arg.

<400> 7

Arg Pro Leu Xaa Pro Trp

1 5