



(12) PATENT

(19) NO

(11) 325836

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 5/103 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19975360	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.06.10 PCT/JP96/01570
(22)	Inng.dag	1997.11.21	(85)	Videreføringdag	1997.11.21
(24)	Løpedag	1996.06.10	(30)	Prioritet	1996.03.22, JP, 66916/96
(41)	Alm.tilgj	1998.01.21			
(45)	Meddelt	2008.07.28			
(73)	Innehaver	MG Pharma Inc, 180, Furuecho, Ikeda-shi, Osaka 563-0015, JP			
(72)	Oppfinner	Kyoichi Kagawa, Ikeda-shi, Osaka, JP Hisako Matsutaka, Ikeda-shi, Osaka, JP Chizuko Fukuhama, Ikeda-shi, Osaka, JP Hiroaki Fujino, Ikeda-shi, Osaka, JP Masahiro Numata, c/o Itoham Foods Inc., Central Research Ins. 2-1, Kubogaoka, 1-chome, 302-0104 MORIYA-SHI, IBARAKI, JP Kazuzhisa Honda, Kitasoma-gun, Ibaraki, JP Toyoo Nakamura, Kitasoma-gun, Ibaraki, JP			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			

(54)	Benevnelse	Peptid som inhiberer forhøyede triglyseridnivåer i blod, samt anvendelse derav			
(56)	Anførte publikasjoner	Patent abstract of Japan JP 07188284 A Patent abstract of Japan JP 03120224 A			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives et peptid som har en aminosyresekvens av Val-Val-Tyr-Pro så vel som et middel for å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod, en matvare for spesifisert helseanvendelse (den såkalte funksjonelle matvare) og et fôr som omfatter ovennevnte peptid som aktiv komponent. Det beskrives oppnåelse av et peptid som inhiberer økninger i triglyseridnivåer i blod så vel som et middel for å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod, en fysiologisk funksjonell matvare og et fôr, som alle omfatter peptidet som en aktiv komponent. Med disse produkter i henhold til oppfinnelsen blir det mulig å forhindre eller behandle kvalme og hyperlipemi hos mennesker og dyr så vel som kretsløpssystemsykdommer, for eksempel hypertensjon og arteriosklerose som er assosiert med dette. Videre gjør materialene i henhold til oppfinnelsen det mulig å forbedre kjøttkvaliteten hos levende dyr og oppdrettsfisk.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et nytt peptid som inhiberer økninger i triglyseridnivåer i blod, samt anvendelse derav.

Overdrevent inntak av fett og sukker er kjent for å forårsake fedme, hyperlipemi og lignende. Økninger i triglyserid (heretter av og til kalt «TG»)-nivåer i blod i hyperlipemi sies å bli en årsak som bringer forstyrrelser slik som hypertensjon (forhøyet blodtrykk) og arteriosklerose. Det er så gjort en rekke forsøk på å inhibere økninger i TG-nivåer i blod for å forbedre fedme og hyperlipemi.

For tiden utføres det, for å inhibere økninger i TG-nivåer i blod, kostrestriksjon, inntak av diettmat (f.eks lavkaloridiett (LCD) eller sterkt lavkaloridiett (VLCD)) og administrering av diverse farmasøytika. Som slike farmasøytika anvendes f.eks dekstransulfat som forsterker lipoprotein-lipase-aktivitet i blod, nicomol som inhiberer lipidabsorpsjon, clofibrat og pravastatin som er lipidmetabolismeforbedrende midler, og lignende.

Imidlertid gir kostrestriksjoner lidelser til dem som praktiserer det, og bivirkninger forårsaket av administrering av det ovennevnte farmasøytika sees også. Derfor ønskes det å utvikle et middel for å inhibere økninger i blod-TG-nivåer som har en sterkere effekt med hensyn til å inhibere økninger i blod-TG-nivåer, og hvor det ikke merkes noe som forårsaker bivirkninger.

På den annen side gis høykalorifôr til buskap og oppdrettsfisk for å påskynde deres vekst. Resultatet av dette er at det inntreffer abnormaliteter i fettmetabolismen også hos buskap og fisk, og TG-nivåer i blodet deres har tendens til å øke. På grunn av disse økninger i TG-nivåer i blod blir fettinnholdet hos buskap og oppdrettsfisk for store. Derfor fører fortæring av slike dyr eller fisk til overdreven fettinntak. Videre har slike dyr og fisk gradvis sviktet med hensyn til å treffe forbrukerens smak. I tillegg er økningen i fettinnhold som beskrevet ovenfor et alvorlig spørsmål som vedrører et problem som gjelder ødsling av fôr og vedrører også et problem med hensyn til å benytte fettene som er festet til slakt. Derfor er inhibering av økninger i TG-nivåer i blod blitt et påtrengende behov, spesielt i kjøttavlsindustrien og fiskeindustrien i Japan.

Nylig er det innlevert en patentsøknad som gjelder et oligopeptidholdig materiale som er utviklet av noen forskere, blant dem en av de her nevnte oppfinnere (internasjonal publisert søknad nr. WO420979A1; japansk patentpublikasjon nr. 5-87052), og en teknologi lik denne åpenbares i japansk, ikke-gransket patentpublikasjon nr. 2-154693. Det er også gjort klart at spesifikke

oligopeptider har lipidmetabolismeforbedrende effekter inklusive inhibering av økninger i TG-nivåer i blod (Kyoichi Kagawa, Food Chemical Monthly, 6:80 (1990); Chizuko Fukuhama et al., FOLIA PHARMACOLOGICA JAPONICA, 97:38 (1991)).

Det oligopeptidholdige materialet som beskrives i ovennevnte patent-
5 publikasjon etc er en blanding av proteolysater, og derfor er en aminosyresekvens for dets virkelige aktive komponent (dvs et peptid som dets aktive komponent) ikke enda blitt oppklart.

Dette antyder at det ovennevnte peptidholdige materialet er av lav renhet som farmasøytisk middel. Videre, når dette materialet kombineres med en
10 matvare, er det vanskelig å bestemme materialet kvantitativt separat fra andre peptider som inneholdes i matvaren, og derfor er det et problem med kvalitetskontroll. Derfor er det nødvendig å sikre at den virkelige aktive komponent i det ovennevnte peptidholdige materialet, dvs de peptidinhiberende økninger i TG-nivåer i blod som en aktiv komponent.

15 Selv om japansk, ikke-gransket patentpublikasjon nr. 7-188284 åpenbarer et peptid som inhiberer økninger i triglyseridnivåer i blod, og et middel for å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod som omfatter ovennevnte peptid, er effekten av å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod produsert av peptidet eller middelet fremdeles utilstrekkelig.

20 Det er et formål med foreliggende oppfinnelse å analysere aminosyresekvensen for det ovenfor beskrevne peptid som har høy aktivitet som en aktiv komponent.

Som et resultat av intens og grundig forskning mot løsningen av ovenstående oppgave har vi funnet at oppgaven kan løses ved oppfinnelsen som
25 er beskrevet nedenunder.

Foreliggende oppfinnelsen vedrører et peptid som har den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1.

Oppfinnelsen vedrører også anvendelse av et peptid ifølge krav 1 for å fremstille et preparat som omfatter som en aktiv komponent, et peptid som har
30 den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1 for å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod.

Det er videre beskrevet anvendelse av et peptid ifølge krav 1 for å fremstille en matvare som, som en aktiv komponent, omfatter peptidet som har

aminosyresekvensen som er vist i SEQ ID NO: 1 for spesifisert helseanvendelse med en funksjon av å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod.

Foreliggende oppfinnelse angår også anvendelse av et peptid ifølge krav 1, for å fremstille et fôr som, som en aktiv komponent, omfatter peptidet som har
5 aminosyresekvensen som er vist i SEQ ID NO: 1 med en funksjon for å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod.

Det er også beskrevet anvendelse av et peptid som har den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1, for fremstilling av et middel for å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod.

10 Oppfinnelsen vedrører videre anvendelse av et peptid som har den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1, for fremstilling av et middel for å forhindre eller inhibere fedme eller for å forhindre eller behandle hyperlipemi.

Nedenunder vil oppfinnelsen bli beskrevet i detalj.

Peptidet i henhold til oppfinnelsen har den aminosyresekvens som er vist i
15 SEQ ID NO: 1. Dette peptid kan separeres og renses fra et protein som opptrer i naturen. Alternativt kan det bli syntetisert kjemisk direkte ved kjente metoder. Det er også mulig å fremstille peptidet i henhold til oppfinnelsen ved gensløyd på et gen som har en basesekvens som tilsvarer ovenstående peptidsekvens, og innfelle genet i en passende ekspresjonsvektor og å uttrykke genet i en passende
20 vert.

Ved å anvende peptidet i henhold til oppfinnelsen er det mulig å forhindre eller inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod. En slik forhindring eller inhibering gjør det mulig å forhindre eller behandle fedme hos mennesker eller dyr og også hyperlipemi så vel som kardiovaskulære sykdommer, f.eks høyt blodtrykk og
25 arteriosklerose som er assosiert med dette. Videre er det med peptidet i henhold til oppfinnelsen mulig å forbedre kjøttkvaliteten på buskap og oppdrettsfisk.

Peptidet i henhold til oppfinnelsen kan anvendes som et middel for inhibering av økninger i triglyseridnivåer i blod, et middel for å forhindre eller inhibere fedme, et middel for å forhindre eller behandle hyperlipemi og lignende.

30

A. Fremgangsmåte for fremstilling av peptidet i henhold til oppfinnelsen

Peptidet i henhold til oppfinnelsen kan f.eks oppnås ved de metoder som er beskrevet nedenunder.

A-1. Fremgangsmåte for separering og rensning av peptidet i henhold til oppfinnelsen fra et protein som forekommer i naturen

Som råmateriale for å fremstille peptidet i henhold til oppfinnelsen kan det
5 bredt anvendes et dyreprotein, f.eks fiskekjøttprotein, fiskepulver, globin osv, eller
et planteprotein, f.eks maisprotein (zein), soyabønneprotein osv. Blant disse
proteiner er globinproteiner, f.eks hemoglobin og myoglobin spesielt foretrukket
ved det at de sterkt kan produsere den ønskede effekt med hensyn til å inhibere
økninger i TG-nivåer i blod. Dyresort som kilde for dette globinprotein er ikke
10 spesielt begrenset. Blod fra storfe, svin, får, mennesker, hest etc kan anvendes
innen vide grenser.

I den hensikt å oppnå peptidet i henhold til oppfinnelsen hydrolyseres først
det ovennevnte protein. Arbeidsmåter for denne hydrolyse kan foretas i henhold
til den metode som er beskrevet i WO89/06970 *supra*. Under denne hydrolyse
15 kan en eller flere hydrolaser valgt blant f.eks syreproteaser, nøytrale proteaser og
alkaliske proteaser, bli anvendt.

For å hydrolysere et globinprotein f.eks dispergeres et globinproteinholdig
materiale i vann slik at man får et faststoffinnhold på 5-30 vekt%. Deretter gjøres
denne blanding sur eller basisk slik at man får en optimal pH-verdi for protease(r).
20 Deretter blir protease(r) satt til denne blanding, alt på en gang eller gradvis, og blir
omsatt ved 20-70°C i 3-48 timer.

Det resulterende proteolysat tørkes og kakedannes som det er eller etter
tilsetning av en passende mengde fyllstoff, f.eks karboksymetylcellulose eller
dekstrin. Således kan et proteolysat som har en inhiberende effekt på økninger i
25 TG-nivåer i blod oppnås. Dette proteolysat inneholder peptidet i henhold til
oppfinnelsen i minst 0,3 vekt%.

Etterpå renses det således oppnådde proteolysat. For denne renseprosess
kan en kjent renseprosess anvendes. For eksempel kan ionebytting,
ultrafiltrering, omvendt fasekromatografi osv bli kombinert på passende måte for å
30 rense de fraksjoner som inneholder peptidet i henhold til oppfinnelsen. Selv om
operasjoner ved hjelp av ionebytting eller ultrafiltrering ikke nødvendigvis er
essensielle, er det å foretrekke å inkorporere dem i separasjons- og
renseprosessen ut fra det synspunkt at de kan forbedre graden av separasjon og

rensning. Med hensyn til reversert fasekromatografi er det å foretrekke å kombinere reversert fasekromatografi under sure og nøytrale betingelser.

Mengden av protein i en fraksjon kan bestemmes ved kjente metoder for proteinbestemmelse, f.eks ninhydrinmetoden. Aminosyresekvensene for de utvalgte fraksjoner kan identifiseres ved kjente metoder, og derved kan nærværet av peptidet i henhold til oppfinnelsen bli bekreftet.

Peptidet i henhold til oppfinnelsen som stammer fra den såldes separerte fraksjon, kan anvendes som en aktiv komponent i et middel for inhibering av økninger i TG-nivåer i blod. Dessuten kan fraksjonen selv bli anvendt direkte som en aktiv komponent i ovennevnte middel.

A-2. Fremgangsmåte for fremstilling av peptidet i henhold til oppfinnelsen ved kjemisk syntese

Peptidet i henhold til oppfinnelsen kan også bli syntetisert kjemisk ved kjente peptidsyntesemetoder. Som eksempler kan nevnes azidmetoden, syrekloridmetoden, syreanhydridmetoden, blandet-syreanhydridmetoden, DCC-metoden, aktiv-estermetoden, karboimidazolmetoden, oksydasjons-reduksjonsmetoden, DCC-additivmetoden (HOMB, HOBt, HOSu)-metoden (se f.eks Schröder & Lückhe, The Peptide, vol. 1 (1966), Academic Press, New York, USA; eller Izumiya et al., Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd. (1975)) og lignende. Disse peptidsyntesemetoder kan utføres enten i fast fase eller flytende fase.

I peptidsyntesemetoden som er beskrevet ovenfor, blir aminosyrer som har en sidekjede-funksjonell gruppe, f.eks tyrosin og treonin, fortrinnsvis beskyttet i sine sidekjedefunksjonelle grupper. Som en beskyttende gruppe kan det anvendes kjente beskyttende grupper, f.eks en benzyloksykarbonylgruppe (Cbz-), t-butoksykarbonylgruppe (Boc-), benzylgruppe (Bz-) etc. Denne beskyttende gruppe kan fjernes ved kjente metoder i prosessen for syntetisering av peptidet i henhold til oppfinnelsen.

B. Et middel for inhibering av økninger i TG-nivåer i blod

Et middel for å inhibere økninger i TG-nivåer i blod kan fremstilles ved anvendelse av peptidet i henhold til oppfinnelsen eller den fraksjon som inneholder peptidet (se A-1. ovenfor) som en aktiv komponent.

Som bærer for middelet for inhibering av økninger i TG-nivåer i blod anvendes konvensjonelt slike eksipienter (f.eks fyllstoffer, ekstendere, bindemidler, fuktighetsgivende midler, disintegreringsmidler, overflateaktive midler) eller fortynningsmidler ved fremstilling av preparater, avhengig av den form
5 for anvendelse som er aktuell. Formen på et preparat er ikke spesielt begrenset når bare preparatet effektivt inneholder peptidet i henhold til oppfinnelsen. For eksempel kan preparatet være i form av et fast middel, f.eks tabletter, pulver, granulater, piller; eller i form av et injeksjonsmiddel, f.eks som løsninger, suspensjoner og emulsjoner. Alternativt kan middelet ha form av et tørt produkt
10 som kan lages opp til flytende form ved tilsetning av en passende bærer før bruk. Hvilket som helst av disse former kan fremstilles ved konvensjonelle metoder.

Dosen av det således oppnådde middel for å inhibere økninger i TG-nivåer i blod blir passende valgt avhengig av metoden og formen av administrering av preparatet, tilstanden til pasienten som får preparatet osv. Generelt fremstilles et
15 preparat som inneholder peptidet i henhold til oppfinnelsen i et forhold av ca 0,001 til 80 vekt%, og fortrinnsvis administreres preparatet slik at mengden av peptidet i henhold til oppfinnelsen administreres med ca 0,1-10 mg for en voksen pr dag. Administreringen blir ikke nødvendigvis utført en gang pr dag. Det kan foretas 3-4 ganger pr dag.

20 De farmasøytiske preparater med varierende former som beskrevet ovenfor, kan administreres på egnet måte avhengig av formen. For eksempel kan preparatet i form av et injeksjonsmiddel administreres intravenøst, intramuskulært, subkutant, intrakutant eller intraperitonealt osv, og det farmasøytiske preparat i en form av et fast middel kan administreres oralt osv.

25

C. En spesifikk helsematvare

En matvare for spesifisert helseanvendelse (den såkalte fysiologisk funksjonelle matvare) med en funksjon som går ut på å inhibere økninger i TG-nivåer i blod, kan fremstilles ved å anvende peptidet i henhold til oppfinnelsen eller
30 den fraksjon som inneholder peptidet (se A-1. ovenfor) som en aktiv komponent. Peptidet i henhold til oppfinnelsen kan dessuten anvendes som et matvareadditiv i generell mat.

Typene av ovennevnte matvare er ikke særlig begrenset. Den fysiologisk funksjonelle matvare kan anvendes på melk, pudding, karrirøtter, stuing, kjøttsaus,

skinke, kaker, sjokolade og lignende. Særlig foretrekkes melk, da det kan lette opptaket av peptidet i henhold til oppfinnelsen, da dette kan være vanskelig for barn å ta direkte på grunn av smaken. Dessuten er tilsetning av peptidet i henhold til oppfinnelsen til slike matvarer som kaker og sjokolade som i alt
5 vesentlig fremkaller fedme, ønskelig ut fra det synspunkt at fedme forårsaket av inntak av de ovennevnte matvarer kan forhindres.

Mengden av peptidet i henhold til oppfinnelsen som settes til den fysiologisk funksjonelle matvare blir på passende måte valgt etter typen av matvare, hensikten med tilsetning av peptidet i henhold til oppfinnelsen, den effekt
10 som forventes å blir produsert ved inntak av maten osv. Generelt foretrekkes det å tillate matvaren å innholde peptidet i henhold til oppfinnelsen slik at ca 0,5-5 mg av peptidet kan tas pr måltid.

D. Et fôrprodukt

15 Et fôrprodukt med en funksjon av å inhibere økninger i TG-nivåer i blod hos levende dyr osv kan fremstilles ved å kombinere, i et fôrprodukt, peptidet i henhold til oppfinnelsen eller den fraksjon som inneholder peptidet (se A-1. ovenfor) som en aktiv komponent.

Det fôrprodukt som peptidet i henhold til oppfinnelsen kombineres i, kan
20 enten være fôr for levende dyr, f.eks kveg, griser, høns osv, eller et fôr for oppdrettsfisk, f.eks flekkpagell, unge gulhaler etc; typen av fôr er ikke særlig begrenset. Mengden av peptidet i henhold til oppfinnelsen som kombineres i et fôr blir passende valgt i avhengighet av typen av fôr, den effekt som ventes å bli produsert ved inntak av fôret osv. Generelt foretrekkes det at peptidet i henhold til
25 oppfinnelsen kombineres i et fôrprodukt i forholdet 0,01-0,5 vekt%.

Siden middelet for inhibering av økninger i TG-nivåer i blod, matvaren for spesifisert helseanvendelse og fôrproduktet som er beskrevet ovenfor, har en innvirkning med hensyn til å rense lipid i blod, kan administrering av det forhindre eller behandle fedme og hyperlipidemi hos mennesker eller dyr, og kretsløps-
30 forstyrrelser, f.eks forhøyet blodtrykk og arteriosklerose som er assosiert med de ovennevnte tilstander. Videre gjør administrering av middelet osv det mulig å forbedre kjøttkvaliteten hos levende dyr og oppdrettsfisk.

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 er et gelkromatogram av et globinproteolysat.

Fig. 2 er et reversert fase (surt)-kromatogram i eksempel 1.

Fig. 3 er et reversert fase (nøytralt)-kromatogram i eksempel 1.

5 Fig. 4 er reverserte fasekromatogrammer av VVYP, VYP og VTL før behandling med mavesaft, etter behandlingen med mavesaft og etter behandlingen med mavesaft/pankreasvæske.

Beste utførelse av oppfinnelsen

10 Oppfinnelsen vil bli beskrevet mer spesifikt nedenunder med henvisning til de følgende eksempler.

Referanse-eksempel**Fremstilling av et globinproteolysat**

15 En fremgangsmåte for fremstilling av et globinproteolysat ved anvendelse av storfe-erythrocytter vil bli beskrevet nedenunder i detalj.

Til 100 kg friske bovin-erythrocytter ble det tilsatt 250 l vann for å tillate tilstrekkelig hemolyse. Etter justering av pH-verdien til 2,8 med fosforsyre ble $2,6 \times 10^7$ enheter syreprotease fra *Aspergillus niger* tilsatt i løsningen og omsatt ved
20 50°C i 3 timer.

Etter reaksjonen ble reaksjonsløsningen oppvarmet ved 80°C i 30 min for å avslutte reaksjonen. Deretter ble en vandig suspensjon av kalsiumhydroksyd satt til reaksjonsløsningen for å justere pH-verdien til 6,5. Så ble 6,5 kg diatoméjord tilsatt og filtrert med en filterpresse. Det resulterende filtrat ble forstøvningstørket
25 for derved å gi 23 kg av et globinproteolysat i pulverform. Molekylvektfordelingen av det resulterende globinproteolysat ble undersøkt ved gelfiltreringskromatografi, som ble utført under de følgende betingelser.

Utstyr: Høy-ytelse væskechromatograf (SHIMAZU CORP.; Model LC-6A)
30 Kolonne: PolyHYDROXYETHYL A, 5µm, 9,4 x 200 mm (PolyC Inc.)
Mobil fase: 50 mM maursyre
Strømningshastighet: 0,5 ml/min
Påvisning: UV-absorpsjon ved 221 nm.

Gelkromatogrammet fra globinproteolysatet som ble oppnådd ved den ovenfor beskrevne gelfiltreringskromatografi er vist i fig. 1.

Eksempel 1

5 Fraksjonering og rensning av et peptid som inhiberer økninger i TG-nivåer i blod.

Peptidet i henhold til oppfinnelsen som stammer fra protein ble oppnådd ved de fremgangsmåter som er beskrevet nedenunder, dvs (1) ionebytting, (2) ultrafiltrering, (3) separering ved reversert fasekromatografi under sure betingelser, og (4) separeringen ved reversert fasekromatografi under nøytrale
10 betingelser.

(1) Ionebytting.

En 10 vekt% vandig løsning av 13,7 g av det globinproteolysat som ble oppnådd i referanse-eksempelen ble satt til en svakt sur kationbytteharpiks
15 (Amberlite IRC₅₀, H⁺ form; JAPAN ORGANO CO., LTD.) og omrørt i 1 time slik at det ble adsorpsjon. Deretter ble den uadsorberte fraksjon oppnådd.

(2) Ultrafiltrering.

Den uadsorberte fraksjon som ble oppnådd ved ionebyttebehandlingen ble
20 underkastet ultrafiltrering ved anvendelse av ultrafiltreringsutstyr av røretype (Advantec; Model UHP 90K) og en ultrafiltreringsmembran (Advantec; UIIH-1; fraksjonsmolekylvekt: 1000), og den gjenværende løsning ble oppsamlet.

Den resulterende fraksjon ble bestemt kvantitativt ved å utføre ninhydrinmetoden etter syrehydrolyse. Syrehydrolysen ble utført ved å anbringe 1 ml av 6
25 N HCl ved den endelige konsentrasjon mot 3-5 mg protein i et reagensrør, forsegle røret under atmosfæretrykk og oppvarme det ved 110°C i 22 timer. Ninhydrinmetoden ble utført som følger. Prøvens pH-verdi etter hydrolysen ble justert til 5,0 med natriumhydroksyd, og deretter ble prøven omsatt med et ninhydrinreagens oppløst i 0,2 M citratbuffer (pH 5,0) ved 100°C i 15 min.
30 Absorbans ved 570 nm ble målt. Separat ble vandige L-leucin-løsninger (0,75, 150, 225, 300 nmol/ml) underkastet en ninhydrinreaksjon som standardløsninger. Kalibreringskurver ble oppnådd fra den målte absorbans, og mengden av aminogru-
per i prøven som var ekvivalent med L-leucin ble beregnet.

Resultatene fra bestemmelsen er vist i tabell I. Utbyttet mot globinproteolysatet som ble anvendt som råmateriale, er også vist i tabell I.

(3) Reversert fase(sur)-kromatografi.

5 Den gjenværende løsning som ble oppnådd ved ultrafiltreringen ble underkastet reversert fase(sur)-kromatografi under de følgende betingelser.

Utstyr: Høy-ytelse væskechromatograf (SHIMAZU CORP.; Model LC-6A)

Kolonne: SuperPac Pep-S, 15µm, 22,5 x 250 mm (PHARMACIA K.K)

10 Mobil fase: Vandig acetonitrilløsning inneholdende 0,1% trifluoreddiksyre

Gradient: Lineær konsentrasjonsgradient av 2-35% acetonitril
Acetonitril-konsentrasjonsendring 1%/min.

Strømningshastighet: 5 ml/min

Temperatur: 40°C

15 Påvisning: UV-absorpsjon ved 220 nm

Tillagingstid: 53,8-54,5 min (fraksjon A)

Gelkromatogrammet som ble oppnådd ved den ovenfor beskrevne reverserte fase(sur)-kromatografi er vist i fig. 1.

20 Den resulterende fraksjon ble bestemt kvantitativt ved aminosyreanalyse etter syrehydrolyse. Syrehydrolysen ble utført ved å anbringe 1 ml av 6 N HCl ved sluttkonsentrasjonen mot 3-5 mg protein i et reagensglass, forsegle reagensglasset under nedsatt trykk og oppvarme det ved 110°C i 22 timer. Aminosyreanalysen ble utført som følger under de betingelser som er nevnt
25 nedenunder.

Utstyr: Høy-ytelse væskechromatograf (SHIMAZU CORP.; Model LC-6A)

Kolonne: Shim-pack ISC-07/S1504 Na, 7 µm, 4,0 x 150 mm (SHIMAZU CORP).

Mobil fase: Amino Acid Mobile Phase Kit (Na type) fra SHIMAZU CORP.

30 Strømningshastighet: 0,3 ml/min

Temperatur: 55°C

Reaksjonsløsning 1: Analysesett OPA Reagent fra SHIMAZU CORP.

Påvisning: Fluorescensabsorpsjon (Ex 348 nm, Em 450 nm).

Den syrehydrolyserte løsning ble konsentrert, tørket og kakedannet ved hjelp av en roterende inndamper og tørket videre under nedsatt trykk i mer enn 12 timer for derved å fjerne HCl fullstendig. Deretter blir den resulterende kake oppløst i 0,2 M citratbuffer (pH 2,20) slik at innholdet av hver aminosyre blir ca
5 100 nmol/ml. Denne løsning ble filtrert gjennom et 0,45 µm filter, og 10 µl av filtratet ble påført kolonnen. På den annen side, som en standard løsning, ble blandet aminosyrestandardløsning som inkluderte 18 komponenter H-type (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) fortynnet til 25-ganger med 0,2 M citratbuffer (pH 2,20), og 10 µl av denne fortynning ble påført kolonnen (hver aminosyre: 1
10 nmol/10 µl).

Det beregnede toppareal av en aminosyre ble analysert ved hjelp av Chromatopac C-R4A (SHIMAZU CORP.), og mengden av aminosyren ble beregnet ut fra topparealområdet mellom prøven og standardløsningen. Resultatene er vist i tabell 1. Utbyttet mot globinproteolysatet er også vist i tabell 1.

15

(4) Reversert fase(nøytral)-kromatografi.

Fraksjonene som ble eluert og fremstilt i den reverserte fase(sure)-kromatografi ble videre underkastet reversert fase(nøytral)-kromatografi under de følgende betingelser.

20

Utstyr: Høy-ytelse væskechromatograf (SHIMAZU CORP.; Model LC-6A)
Kolonne: SuperPac Pep-S, 15µm, 22,5 x 250 mm (PHARMACIA K.K.)
Mobil fase: Vandig acetonitrilløsning inneholdende 20 mM ammoniumacetat buffer (pH 6,5)
25 Gradient: Lineær konsentrasjonsgradient av 0-25% acetonitril
Acetonitril-konsentrasjonsendring 0,5%/min.
Strømningshastighet: 5 ml/min
Temperatur: 40°C
Tillagingstid: 41,7-43,2 min (fraksjon B)
30 45,8-51,0 min (fraksjon C)

Gelkromatogrammet som ble oppnådd ved den ovenfor beskrevne reverserte fase(nøytral)-kromatografi er vist i fig. 3.

De resulterende fraksjoner ble bestemt kvantitativt på samme måte som beskrevet i (3) ovenfor og identifisert. Aminosyresammensetningen ble beregnet ut fra forholdet av hvert aminosyreinnhold mot summen av aminosyreinnhold. Som resultat ble fraksjon B og fraksjon C funnet å være VTL (Val-Thr-Leu) og VVYP (Val-Val-Tyr-Pro) henholdsvis. Etter å ha sjekket disse sekvenser med aminosyresekvensen av hemoglobin, ble det fastslått at begge sekvenser er tilstede i hemoglobinsekvensen.

Resultatene av den kvantitative bestemmelse er vist i tabell 1 sammen med utbyttet mot globinproteolysatet.

10

Tabell 1

Peptid	Vekt av protein (g)	Utbytte (%)
Globinproteolysat	13,7	100
15 loneytting + ultrafiltrering	4,24	30,9
Reversert fasekromatografi		
[fraksjon A]	0,39	0,28
[fraksjon B] VTL	0,009	0,06
[fraksjon C] VVYP	0,006	0,04

20

Eksempel 2

Syntese av et peptid med den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1

Val-Val-Tyr-Pro ble syntetisert med en SAM2 peptid-syntetisator (Biosearch) i henhold til bruksanvisningen for denne syntetisator. Kort sagt ble 2 g acyloksymetylharpiks som var forbundet med 0,3 mmol av den 4. beskyttende aminosyre Boc-Pro-OH pr gram anbragt i reaktoren til ovennevnte peptid-syntetisator og bragt i kontakt med en avblokkingsløsning som inneholdt 45 vol% trifluoereddiksyre (TFA), 2,5 vol% anisol og 52,5 vol% metylenklorid (DCM) i 20 min for derved å fjerne Boc-grupper. Etter vasking med DCM ble harpiksen nøytralisert med DCM som inneholdt 10 vol% diisopropyletylenamin og ytterligere vasket med DCM. Deretter ble harpiksen omsatt i en blandet løsning av 20 ml DCM som inneholdt 4,0 mmol diisopropylkarbodiimid (6,7 ganger hver av teoretisk ekvivalent) og dimetylformamid (DMF) i 2 timer ved romtemperatur. Deretter ble

30

harpiksen vasket med DMF og DCM etter tur for derved å oppnå BOC-Tyr(BrZ)-Pro-PAM harpiks.

I henhold til en lignende prosess ble Boc-Val-OH koplet to ganger. Den således koplede beskyttede peptidharpiks ble omsatt i vannfritt hydrogenfluorid som inneholdt 10 vol% anisol ved 0°C i 1 time. Deretter ble hydrogenfluorid fjernet, og harpiksen ble vasket med eter. Fra den resulterende blanding av peptider og harpiks ble peptider ekstrahert med 50% eddiksyre og lyofilisert slik at det ble oppnådd ca 250 mg råpeptider.

Råpeptidene ble oppløst i 0,1% TFA og deretter utviklet i en oktadecylsilisiumdioksyd (ODS)-kolonne (Cosmosil 5C₁₈, 250 x 20 mm: NACALAI TEAQUE INC.) med en lineær konsentrasjonsgradient av acetonitril som inneholdt 0,1% TFA (20-70%/50 min, 10 ml/min). Peptidet av interesse ble eluert ved en acetonitrilkonsentrasjon på ca 50%.

15 **Testeksempel 1**

Effekt (*in vivo*) av det kjemisk syntetiserte peptid som inhiberer økninger i TG-nivåer i blod.

Først ble serum-TG-økningssinhiberende virkning undersøkt som beskrevet nedenunder, på globinproteolysatet (GD) som ble oppnådd i referanse-eksempelet og den fraksjon som ble oppnådd ved ionebytting og ultrafiltrering i henhold til eksempel 1.

Olivenoljen (10 g/kg kroppsvekt) og en vandig peptidløsning (0,3 ml/mus) ble blandet i en injektor for å danne en lett emulsjon, som ble administrert oralt til ICR-hannmus (6 uker gamle, kroppsvekt: 25-28 g) som hadde gjennomgått en faste natten over. To timer deretter ble blod tatt fra vena cava inferior under Nembutal anestesi, og serum-TG-nivåer ble bestemt (Triglyceride G Testwaco; Waco Pure Chemical Industries, Ltd.). En dose-respons-kurve ble oppnådd fra dosen av peptidet og inhiberingsraten for TG, og den 50% inhiberingsdose ID₅₀ ble beregnet. Deretter ble dette sammenlignet med aktiviteten til globinproteolysatet (GD) som var bestemt på samme måte. Resultatene er vist i tabell 2.

Tabell 2

Peptid	ID ₅₀ ^{*1} (mg protein/mus)	Spesifikk aktivitet
5 Globinproteolysat	26	1
Ionebytting + ultrafiltrering	13	2

*1 Dose som inhiberer 50% av serum-TG-økninger *in vivo*.

10

Av tabell 2 ser man at den serum-TG-økningssinhiberende aktivitet av GD blir forsterket hvis GD blir behandlet med ionebytteharpiks fulgt av ultrafiltrering for å fjerne frie aminosyrer.

Etterpå ble serum-TG-økningssinhiberende virkning undersøkt som beskrevet nedenunder på det peptid (VVYP) som har den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO:1 syntetisert i eksempel 2, peptider Val-Tyr-Pro (VYP) og Val-Thr-Leu (VTL) syntetisert på samme måte som beskrevet i eksempel 2, og det globinproteolysat (GD) som ble oppnådd i referanse-eksempelet.

Olivenolje (18 g/kg kroppsvekt) ble administrert oralt til ICR-hannmus (6 uker gamle, kroppsvekt: 25-28 g) som fastet natten over. En timer deretter ble en vandig løsning av ovennevnte peptid (0,3 ml/mus) administrert oralt. En ytterligere time deretter ble blod tatt fra vena cava inferior under Nembutal anestesi, og deretter ble serum-TG-nivåer bestemt (Triglyceride G Testwako; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). En dose-respons-kurve ble oppnådd fra dosen av peptidet og inhiberingsraten for TG, og 50%-inhiberingsdosen ID₅₀ ble beregnet. Deretter ble aktiviteten til individuelle peptider sammenlignet med hverandre. Resultatene er vist i tabell 3.

Tabell 3

Serum-TG-økningsinhiberende virkning i globinproteolysat og syntetiske peptider

5	Peptid	Peptidinnhold		ID ₅₀ ^{*1} (mg protein/mus)	Spesifikk aktivitet
		Målt (%)	Teoretisk (%) ^{*2}		
	Globinproteolysat	-	100	26	1
	VTL	-	0,51	0,05	448
10	VYP	-	0,58	0,02	1130
	VVYP	0,37 ^{*3}	0,74	0	6500

*¹ Dose som inhiberer *in vivo* 50% av serum-TG-økninger.

*² Vektforhold beregnet ut fra aminosyresekvensen for hemoglobin.

15 *³ Verdien av Val-Val-Tyr-Pro i GD bestemt ut fra HPLC topparealet.

Som vist i tabell 3, er spesifikk aktivitet (forhold til mg protein) 6500 i VVYP, 1130 i VYP og 448 i VTL. Således blir det observert en bemerkelsesverdig sterkere aktivitet enn for GD i alle disse tre peptider. Blant alle ble VVYP funnet å ha en høy aktivitet, 6500 ganger så stor som aktiviteten for GD.

Av de resultater som er beskrevet ovenfor, ble det antydnet at den aktive komponent i fettabsorpsjons-inhiberende virkning i globinproteolysat sannsynligvis vil være tetrapeptidet VVYP.

25 Testeksempel 2

Stabilitet (*in vitro*) for kjemisk syntetiserte peptider som inhiberer økninger i TG-nivåer i blod mot fordøyelsesenzymer.

In vitro-stabilitetstest mot fordøyelsesenzymer ble utført på det peptid (VVYP) som har den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1 syntetisert i eksempel 2 og peptidene (Val-Tyr-Pro (VYP) og Val-Thr-Leu (VTL) syntetisert på samme måte som beskrevet i eksempel 2.

Kort sagt ble det til 127,5 ml av 0,1 N HCl løsning av ovennevnte VVYP, VYP eller VTL, tilsatt 22,5 ml av 0,67 mg/ml pepsin (kunstig mavesaft) oppløst i

0,1 N HCl og omsatt ved 37°C i 4 timer. Deretter ble 75 ml av 0,53 mg/ml pankreatin (kunstig pankreasvæske) oppløst i 30 ml av 0,5 N boratbuffer (pH 8,0) tilsatt og omsatt ved 37°C i 2 timer. Prøver før fordøyning med kunstig mavesaft, etter fordøyning med kunstig mavesaft og etter fordøyning med kunstig
 5 pankreasvæske ble analysert under de følgende betingelser.

Anvendt utstyr: HPLC (Waters; LC Module)

Kolonne: SuperPac Pep-S, 5µm (PHARMACIA K.K)

Mobil fase A: 0,1% trifluoreddiksyre

10 B: Acetonitril-water (50:50, inneholdende 0,1% trifluoreddiksyre)

Strømningshastighet: 0,8 ml/min (VYP, VTL), 0,4 ml/min (VVYP)

Påvisningsbølgelengde: 220 nm

Temperatur: Romtemperatur

Anvendt mengde: 20 µl av 50 gangers fortykning.

15

Det reverserte fasekromatogram som ble oppnådd ved ovennevnte HPLC er vist i fig. 4. Retensjonstiden og topparealet for fordøyingen er vist i tabell 4.

Tabell 4

20 Effekter av gastrointestinal fordøyelse på peptidene

Be-handling	Anv. mengde (mg)	VTL			VYP			VVYP		
		t _r	Areal	Gjen-vinnings-forhold	t _r	Areal	Gjen-vinnings-forhold	t _r	Areal	Gjen-vinnings-forhold
Før be-handling	1,02	30,44	110	100	27,02	1049	100	66,62	2828	100
Mave-saft	1,02	nd	-	-	27,68	1133	108	66,28	3058	108
Mave-saft/pankreas-væske	0,60	nd	-	-	27,76	671	109	66,39	1675	101

Strømningshastighet for den mobile fase i HPLC: VVYP 0,4 ml/min; VYP & VTL 0,8 ml/min

t_r: Retensjonstid (min). Areal: Toppareal (mV·sec). nd: Ikke påvist.

5 Som det er klart fra fig. 4 og tabell 4, forsvant toppen for VTL etter fordøyelsen med kunstig mavesaft, men toppene for VYP og VVYP forble etter fordøyelsene med kunstige pankreasvæsker. Av disse resultater er det antydning en mulighet for at peptidet VVYP i henhold til foreliggende oppfinnelse beveger seg ikke bare mot fordøyelsestrakt-hulrom, men også til små tarm-slimceller og 10 sirkulasjonen for å manifestere sin effekt uten å gjennomgå nedbrytning ved hjelp av fordøyelsesenzymmer i fordøyelseskanalen.

Testeksempel 3

Toksikologisk studium av peptidet i henhold til oppfinnelsen.

15 Peptidet (VVYP) som hadde den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1 syntetisert i eksempel 2, ble administrert oralt til ICR-hann- og hunn i en mengde av 10 g/kg kroppsvekt eller mer (maksimalt mulig dose). Som resultat inntraff ingen dødsfall.

20 Eksempel 3

Fremstilling av matvarer som inneholder peptidet i henhold til oppfinnelsen.

(1) Fremstilling av melkepulver

Til 100 g melkepulver for spebarn ble 10 mg av peptidet (VVYP) som hadde den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1 syntetisert i eksempel 2, tilsatt 25 for derved å frembringe et melkepulver med en funksjon som gikk ut på å inhibere økninger i TG-nivåer i blod.

(2) Fremstilling av sjokolade

Til 100 g sjokolade ble det tilsatt 50 mg av peptidet (VVYP) med den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1 syntetisert i eksempel 2, for derved 30 å frembringe en sjokolade med en funksjon av å inhibere økninger i TG-nivåer i blod.

Eksempel 4

Fremstilling av en matvare som inneholder peptidet i henhold til oppfinnelsen

Til en premiks omfattende vitaminer, mineraler osv ble peptidet (VVYP) med den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1 syntetisert i eksempel 2, kombinert i en rate av 0,1 vekt%. Den resulterende blanding ble tilsatt i et kommersielt fôr for oppdrettsfisk i en rate av 10 vekt% for derved å frembringe et fôr for oppdrettsfisk som har en funksjon av å inhibere økninger i TG-nivåer i blod.

Industriell anvendelighet

10

I henhold til foreliggende oppfinnelse oppnås et peptid som inhiberer økninger i triglyseridnivåer i blod; et middel for inhibering av økninger i triglyseridnivåer i blod som omfatter peptidet som en aktiv komponent; en matvare for spesifisert helseanvendelse (den såkalte fysiologisk funksjonelle matvare) med en funksjon som går ut på å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod; og en matvare med en funksjon som går ut på å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod. Med disse materialer blir det mulig å forhindre eller behandle fedme og hyperlipemi hos mennesker eller dyr, og kretsløpssykdommer som f.eks hypertensjon og arteriosklerose som er assosiert dermed. Videre blir det mulig å forbedre kjøttkvaliteten hos levende dyr og oppdrettsfisk.

20

Sekvenslisting

SEQ ID NO:1

25

Sekvenslengde: 4

Sekvenstype: Aminosyre

Topologi: Lineær

Molekyltype: Peptid

Sekvensbeskrivelse:

30

Val Val Tyr Pro

1

P a t e n t k r a v

1. **Peptid, karakterisert ved at det har den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1.**
2. **Anvendelse av et peptid ifølge krav 1 for å fremstille et preparat som omfatter som en aktiv komponent, et peptid som har den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1 for å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod.**
3. **Anvendelse av et peptid ifølge krav 1 for å fremstille en matvare som, som en aktiv komponent, omfatter peptidet som har aminosyresekvensen som er vist i SEQ ID NO: 1 for spesifisert helseanvendelse med en funksjon av å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod.**
4. **Anvendelse av et peptid ifølge krav 1, for å fremstille et fôr som, som en aktiv komponent, omfatter peptidet som har aminosyresekvensen som er vist i SEQ ID NO: 1 med en funksjon for å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod.**
5. **Anvendelse av et peptid som har den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1, for fremstilling av et middel for å inhibere økninger i triglyseridnivåer i blod.**
6. **Anvendelse av et peptid som har den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1, for fremstilling av et middel for å forhindre eller inhibere fedme.**
7. **Anvendelse av et peptid som har den aminosyresekvens som er vist i SEQ ID NO: 1, for fremstilling av et middel for å forhindre eller behandle hyperlipemi.**

FIG.1

Gelkromatogram for globinproteolysat

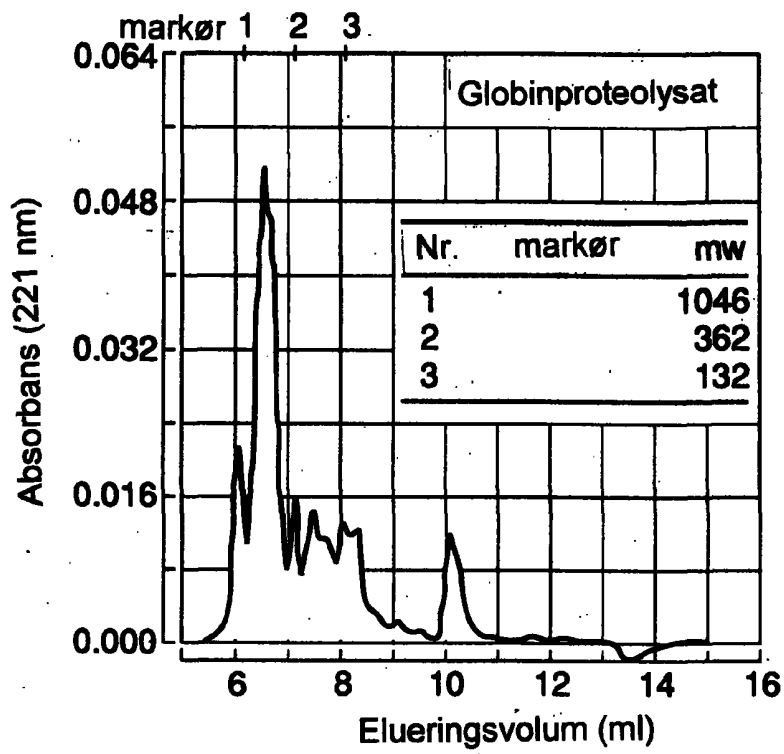


FIG.2

Reversert fasekromatogram (surt) for GD

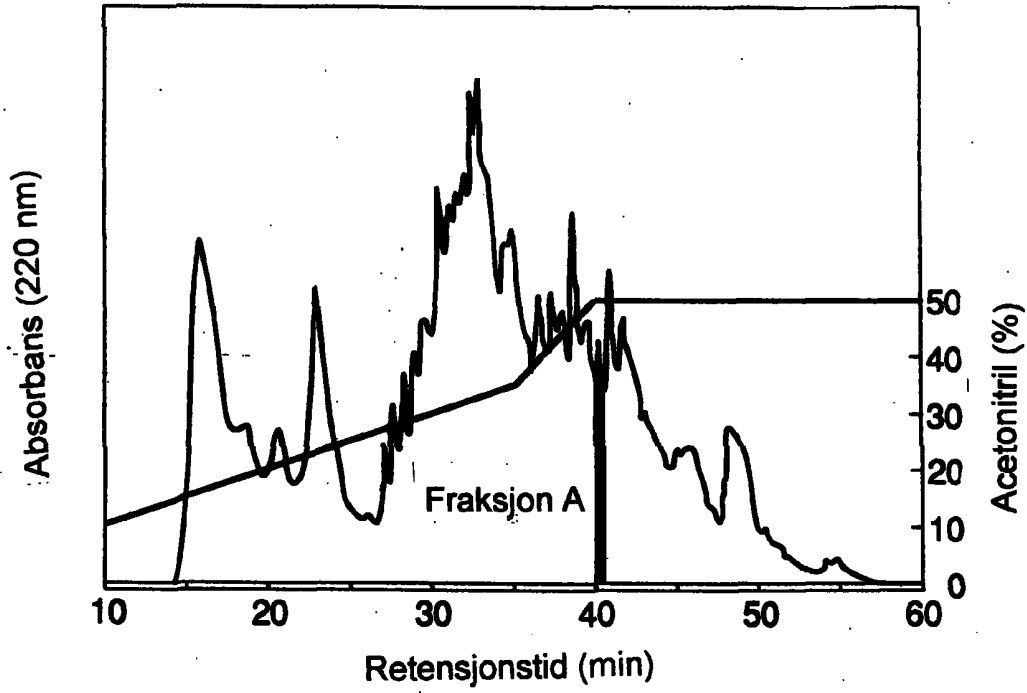


FIG.3

Reversert fasekromatogram (nøytralt) for GD

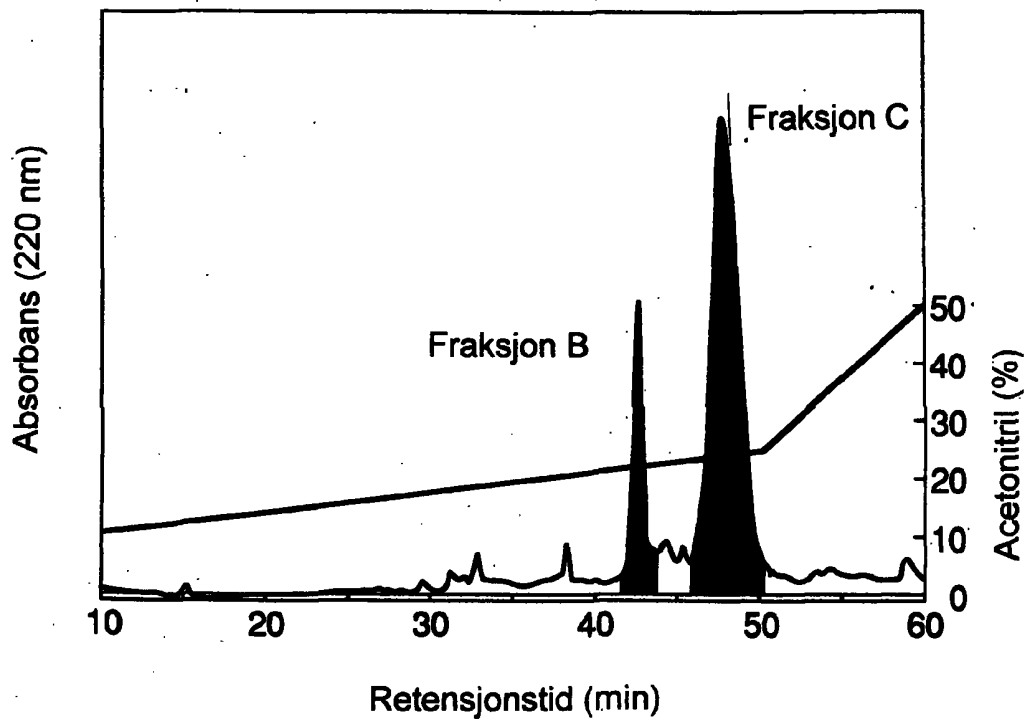


FIG.4

Reversert fasekromatogram for VTL, VYP og VVYP

