



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년10월28일
(11) 등록번호 10-1077801
(24) 등록일자 2011년10월24일

(51) Int. Cl.

C07K 5/08 (2006.01) *A61K 38/06* (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01) *A61P 9/12* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7000078(분할)

(22) 출원일자(국제출원일자) 2004년03월17일

심사청구일자 2011년01월03일

(85) 번역문제출일자 2011년01월03일

(65) 공개번호 10-2011-0015674

(43) 공개일자 2011년02월16일

(62) 원출원 특허 10-2005-7017447

원출원일자(국제출원일자) 2004년03월17일

심사청구일자 2009년03월13일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2004/003588

(87) 국제공개번호 WO 2004/082709

국제공개일자 2004년09월30일

(30) 우선권주장

JP-P-2003-074488 2003년03월18일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문현

EP1092724 A

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 이효진

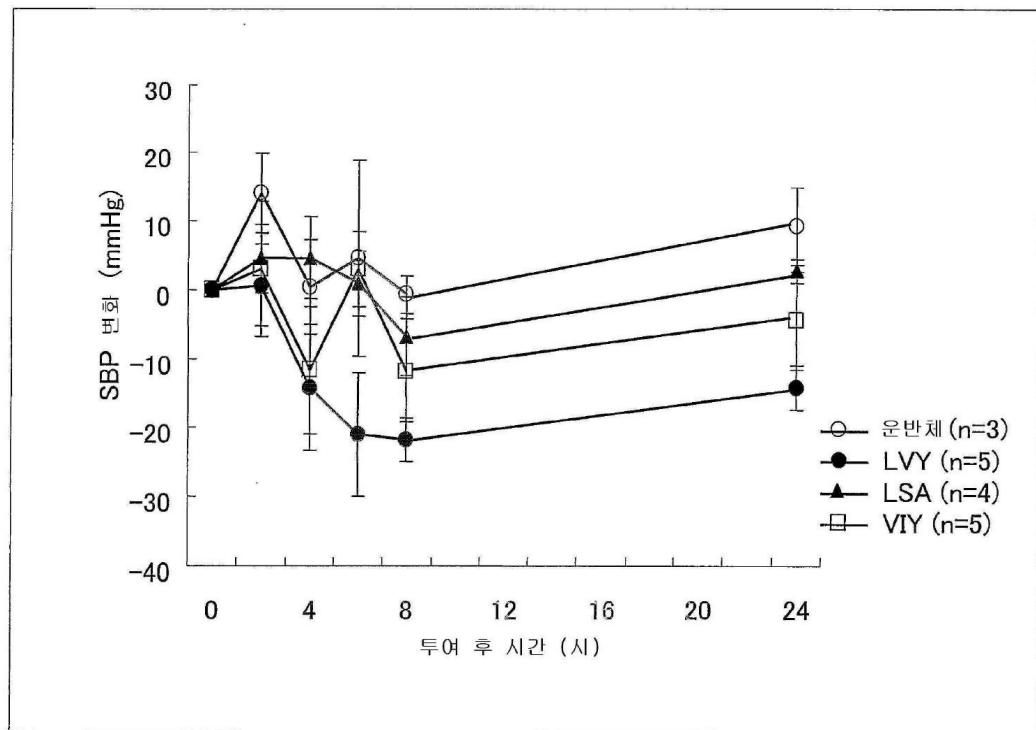
(54) 안지오텐신-전환 효소 저해 웨პ티드

(57) 요 약

경구 섭취 후 소화 효소에 의해 쉽게 소화되지 않고, 그리하여 생체 내에서 이들의 ACE 저해 활성을 잃는 경향이 더 적은 ACE 저해 트리펩티드를 제공하는 것이 의도된다.

더 명확하게는, ACE 저해 활성을 가지고 동물 실험에서 혈압 강하 효과를 나타내는 세 트리펩티드가 참깨의 서물리신 소화 생성물로부터 발견되었다. 이러한 트리펩티드는 각각 아미노산 서열 Leu-Ser-Ala, Val-Ile-Tyr 및 Leu-Val-Tyr 을 가지고, 안지오텐신 전환 효소 저해 활성을 나타낸다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

Leu-Ser-Ala 의 아미노산 서열을 가지는 트리펩티드.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 안지오텐신 전환 효소 저해 활성을 가지는 트리펩티드.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 혈압 강하 효과를 가지는 트리펩티드.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 혈압 상승 억제 효과를 가지는 트리펩티드.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 트리펩티드를 함유하는 식용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 트리펩티드를 단일 섭취량으로 0.001 mg 내지 100 mg 함유하는 식용 조성물.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 건강 식품 또는 건강 음료인 식용 조성물.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 고혈압 예방을 위한 식용 조성물.

청구항 9

Leu-Ser-Ala 의 아미노산 서열을 가지는 트리펩티드를 함유하는 안지오텐신 전환 효소 저해제.

청구항 10

Leu-Ser-Ala 의 아미노산 서열을 가지는 트리펩티드를 함유하는 혈압 강하제.

청구항 11

Leu-Ser-Ala 의 아미노산 서열을 가지는 트리펩티드를 함유하는 고혈압 예방제.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 트리펩티드를 단일 복용량으로 0.001 mg 내지 100 mg 함유하는 안지오텐신 전환 효소 저해제.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 상기 트리펩티드를 단일 복용량으로 0.001 mg 내지 100 mg 함유하는 혈압 강하제.

청구항 14

제 11 항에 있어서, 상기 트리펩티드를 단일 복용량으로 0.001 mg 내지 100 mg 함유하는 고혈압 예방제.

청구항 15

Leu-Ser-Ala 의 아미노산 서열을 가지는 트리펩티드를 함유하는 고혈압 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 경구 투여용 약학 조성물.

청구항 17

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 안지오텐신 전환 효소 저해 활성을 가지는 약학 조성물.

청구항 18

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 혈압 강하 효과를 가지는 약학 조성물.

청구항 19

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 혈압 상승 억제 효과를 가지는 약학 조성물.

청구항 20

제 15 항 또는 제 16 항에 있어서, 상기 트리펩티드를 단일 복용량으로 0.001 mg 내지 100 mg 함유하는 약학 조성물.

명세서**기술 분야**

[0001]

본 발명은 안지오텐신 전환 효소를 저해하고, 그리하여 혈압 강하 효과를 가지는 건강 식품, 약물 등의 성분으로서 유용한 펩티드에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

수많은, 생활-양식 관련 질환의 전형적인 예인 고혈압 환자가 해마다 증가하고 있다. 고혈압은 다양한 합병증 예컨대 뇌출혈, 지주막하 출혈, 뇌경색, 심근경색, 협심증, 신경화증 등을 유발한다고 알려져 있다. 따라서, 고혈압의 발병 메카니즘에 대한 다양한 연구가 행해지고 있다.

[0003]

혈압-조절 시스템으로서, 혈압 상승과 관련된 레닌-안지오텐신 시스템 및 혈압 감소와 관련된 칼리크레인-카닌 시스템이 중요한 역할을 한다. 레닌-안지오텐신 시스템에서, 간에서 분비된 안지오텐시노겐은 신장에서 생성된 레닌에 의해서 안지오텐신 I로 전환된다. 안지오텐신 I은 안지오텐신 전환 효소 (ACE)에 의해서 안지오텐신 II로 추가로 전환된다. 안지오텐신 II는 혈관 평활근의 수축을 유발하고, 그리하여 혈압을 상승시킨다. 한편, 혈압 강하 시스템에서 칼리크레인은 키니노겐에 작용하고, 그리하여 브래디키닌을 생성한다. 브래디키닌은 혈관 확장 효과를 가지며 혈압을 저하시킨다. 그러나, ACE는 브래디키닌 분해 효과를 가진다. 즉, ACE는 상기 기술한 두 가지 효과, 즉, 혈관 수축 펩티드인 안지오텐신 II를 생성하고, 혈압 강하 펩티드인 브래디키닌을 비활성화시키는 효과를 통해서 혈압 상승에 관여한다고 알려져 있다. 따라서, ACE의 효소 활성을 억제시킴으로써 혈압 상승을 감소시키는 것이 가능할 것이다. ACE 저해제로서 개발된 프롤린 유도체 예컨대 캡토프릴 및 에날라프릴이 고혈압을 치료하는데 널리 사용되고 있다.

[0004]

최근, 효소로 음식물을 소화시킴으로써 수득한 펩티드가 ACE 저해 활성을 가진다는 것이 보고되었다. 예를 들어, 다수의 이같은 소화 생성물, 예를 들어, 젤라틴의 콜라제나제 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 52-148631), 카세인의 트립신 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 58-109425, 일본 특허 공개 SHO 59-44323, 일본 특허 공개 SHO 60-23086, 일본 특허 공개 SHO 60-23087, 일본 특허 공개 SHO 61-36226 및 일본 특허 공개 SHO 61-36227), γ -제인의 서몰리신 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 2-32127), 정어리 근육의 펩신 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 3-11097), 건조 가다랑어의 서몰리신 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 4-144696), 참깨 단백질의 서몰리신 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 8-231588), κ -카세인의 펩신 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 8-269088) 등이 보고되어 있다.

[0005]

식품 유래의 이러한 ACE 저해 펩티드는 상당한 유리한 점을 가지는데, 즉, 이들은 안정성 문제 (즉, 부작용, 독성 등)를 거의 지니지 않고, 통상의 식품과 같이 석용이다. 그러나, 상기 기술한 펩티드 생성물은 주로 아미노산이 5개 이상인 펩티드를 함유한다고 보고되어 있다 (일본 특허 공개 SHO 52-148631, 일본 특허 공개 SHO 58-109425, 일본 특허 공개 SHO 59-44323, 일본 특허 공개 SHO 60-23086, 일본 특허 공개 SHO 61-36226 및 일본 특허 공개 SHO 61-36227), 정어리 근육의 펩신 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 3-11097), 건조 가다랑어의 서몰리신 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 4-144696), 참깨 단백질의 서몰리신 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 8-231588), κ -카세인의 펩신 소화 생성물 (일본 특허 공개 SHO 8-269088) 등이 보고되어 있다.

개 공보 SHO 61-36226, 일본 특허 공개 공보 SHO 61-36227, 일본 특허 공개 공보 HEI 3-11097, 일본 특허 제 3135812 호 및 일본 특허 공개 공보 HEI 8-269088). 긴 아미노산 사슬로 구성된 웨티드는, 아마도 이들이 체내에서 소화 효소에 의해 소화되기 쉽고, 그리하여 ACE 저해 활성을 잃고, 또는 이들이 소화되지 않고 남는다 하더라도, 이들은 이들의 커다란 문자 구조 때문에 쉽게 흡수되지 않기 때문에, 시험관 내에서 강한 ACE 저해 활성을 근거로 한 기대 수준의 혈압 강하 효과를 달성할 수 없다는 것이 지적되었다.

[0006] 발명의 개요

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 경구 섭취시 소화 효소에 의해 쉽게 소화되지 않고, 그리하여 생체 내에서 이들의 ACE 저해 활성을 잃는 경향이 더 적은 ACE 저해 트리펩티드를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명에서, 상기 기술한 트리펩티드를 하나 이상 함유하는 식용 (식품/음료) 조성물, 안지오텐신 전환 효소 저해제 및 혈압 강하제를 제공하는 것이 또한 의도된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은, 음식물의 서몰리신 소화 생성물이 상기 기술한 문제의 극복이 가능한 웨티드를 함유한다고 가정 하여, 3 개 이하의 아미노산으로 구성된 ACE 저해 웨티드를 탐구하였다. 그 결과, 이들은 참깨의 서몰리신 소화 생성물 중 세 개의 트리펩티드를 발견하는데 성공했고, 상기 트리펩티드는 ACE 저해 활성을 가지고, 동물 실험에서 혈압 강하 효과를 나타내었다. 본 발명은 이러한 결과들을 기초로 완성되었다.

[0010] 따라서, 본 발명은 각각 아미노산 서열 Leu-Ser-Ala, Val-Ile-Tyr 및 Leu-Val-Tyr 을 가지고, 안지오텐신 전환 효소 저해 활성을 나타내는 트리펩티드를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 상기 기술한 트리펩티드를 하나 이상 함유하는 식용 조성물, 안지오텐신 전환 효소 저해제 및 혈압 강하제를 추가로 제공한다.

[0012] 본 발명에 따른 트리펩티드는 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. 그러나, 트리펩티드를 식품, 음료 또는 경구용 약물에 첨가하여 이들의 ACE 저해 활성을 활용하는, 본 발명의 구현예에 있어서, 참깨 등에서 유래한 식물성 단백질을 서몰리신으로 소화시키고 이것을 추가로 정제시킴으로써, 상기 기술한 세 트리펩티드 중 적어도 하나가 풍부한 식용 조성물을 제조하는 것이 바람직하다.

[0013] 식물성 단백질 공급원으로서, 단백질-풍부 식물 조직 (바람직하게는 종자), 예를 들어, 곡류 예컨대 쌀, 밀, 보리, 귀리 및 옥수수, 또는 콩류 예컨대 강낭콩, 잡두, 대두 및 녹두, 및 참깨를 사용할 수 있다.

[0014] 본 발명에 따른 웨티드가, 서몰리신으로 소화시켜 수득되는 경우, 그 출발 재료의 성질에 따라 처리 절차가 달라진다. 전처리로서, 그 재료를 우선, 예를 들어, 용매 예컨대 알콜, 아세톤, 헥산 등으로 지방을 짜내거나 추출함으로써 즙을 제거하여 탈지시킨다. 출발 재료의, 서몰리신으로의 소화 효율을 향상시키기 위하여, 출발 재료를 미세하게 분쇄한 후, 교반 하에 물에 혼탁시키는 것이 또한 바람직하다. 난용성 단백질의 경우, 또 다른 전처리를 사용하여, 예컨대 수산화나트륨을 첨가하거나 가열하여, 단백질을 균일하게 용해 또는 혼탁시키는 것이 또한 가능하다. 이어서, 서몰리신을 적당한 양, 바람직하게는 단백질 g 당 500 내지 50000 PU 로 거기에 첨가하고, pH 5 내지 9 에서, 10 내지 80 °C 의 온도에서, 0.5 내지 48 시간 동안 정지상으로 또는 교반 하에 단백질 소화 반응을 수행한다. ("PU" 는 "프로테아제 단위" 를 의미하고, 1 PU 는 pH 7.2 및 35 °C 에서 기질로서 우유 카세인을 사용하여, 분 당 티로신 1 µg 에 상응하는 비-단백질 폴린 (Folin) 색을 증가시키는 효소의 양으로서 정의된다). 반응의 충분한 진전 (즉, 반응이 목적하는 트리펩티드를 수득하기에 충분함) 여부를 조사하기 위해서, "액체 반응 혼합물에 ODS 칼럼을 사용하는 고성능 액체 크로마토그래피를 행하고, 210 nm 에서 흡광도를 측정함으로써 용리 패턴을 결정함" 을 포함하는 방법을 사용할 수 있다. 반응은 예를 들어, 염산을 첨가함으로써 종결된다. 대안적으로는, 가열시킴으로써 서몰리신을 비활성화시킬 수 있다. 염산 첨가 및 가열 둘 다에 의해 반응을 종결시키는 것이 또한 가능하다. 액체 반응 혼합물에 원심분리, 여과 등을 행하고, 침전물을 제거한다. 이와 같이 수득한 여과액을 수산화나트륨 또는 염산으로 중화시킨 후, 농축시킨다. 추가로, 필요하다면 활성화 속으로 처리함으로써 이상취 (off-flavor) (쓴맛, 까슬까슬함, 불쾌한 냄새 등) 를 제거할 수 있다. 이와 같이 수득한 참깨 웨티드는 Leu-Ser-Ala, Val-Ile-Tyr 및 Leu-

Val-Tyr 각각을 0.001 중량% 내지 0.1 중량%의 양으로 함유한다.

[0015] 상기 기술한 방식으로 수득한 서몰리신 소화 생성물을, 이온 교환 수지, 고-다공성 중합체 수지 등으로 추가로 처리하거나 처리하지 않고, 고분자량 단백질을 제거하여, 본 발명의 트리펩티드가 풍부한 부분 정제 생성물을 제공하는 본 발명의 트리펩티드 조성물로서 사용할 수 있다. 이러한 소화 생성물 및 일반적으로 부분 정제 생성물을, 이하에서 때때로 "트리펩티드-풍부 조성물"로 칭할 것이다. 이같은 조성물을, 필요하다면, 사용하기 전에, 활성화 속으로 추가로 처리하여 이상취 (예를 들어, 쓴맛, 까슬까슬함, 불쾌한 냄새 등)를 제거할 수 있다.

[0016] 본 발명의 펩티드의 정제 조제물을 수득하기 위해서, 상기 기술한 농축물에 겔 여과 칼럼 크로마토그래피, 이온 교환 수지 또는 고-다공성 중합체 수지를 사용하는 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피 등을 행하고, ACE 저해 활성을 가지는 본 발명의 펩티드 분획을 수합한다. 다음으로, 수합한 활성 분획을, 펩티드를 정제하는데 흔히 사용하는 방법, 예를 들어, 역상 칼럼 예컨대 ODS 칼럼 또는 C30 칼럼을 사용하는 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 정제시켜, 실질적으로 순수한 상태인 단일 형태의 펩티드를 제공할 수 있다. 본 발명의 트리펩티드는 참깨 (예를 들어, *Sesamum indicum* L.) 뿐만 아니라 곡류 예컨대 쌀 (예를 들어, *Oryza sativa* L.), 밀 (예를 들어, *Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf., *T. turgidum* L., *T. pyramidale* (Delile) Perciv. non Delile ex Schult., *T. abyssinicum* Vavilov, 및 *T. carthlicum* Nevski), 보리 (예를 들어, *Hordeum vulgare* L.), 귀리 (예를 들어, *Avena sativa* L.) 또는 옥수수 (예를 들어, *Zea mays* L.), 또는 콩류 예컨대 강낭콩 (예를 들어, *Phaseolus vulgaris* L.), 잡두 (예를 들어, *Vicia faba* L.), 대두 (예를 들어, *Glycine max* (L.) Merrill) 또는 녹두 (예를 들어, *Vigna radiata* (L.) R. Wilcz)로부터 상기 기술한 바와 같은 방법에 의해 수득할 수 있다. 상기 트리펩티드 또는 트리펩티드-풍부 조성물의 ACE 저해 활성은, 예를 들어, 이하의 실시예에서 기술한 시험관 내 시험법 및/또는 생체 내 시험법에 의해 측정할 수 있다.

[0017] 본 발명의 각각의 펩티드를 화학적 합성에 의해 제조하는 경우, 펩티드의 합성에 통상적으로 사용하는 임의의 고체상 방법 및 액체상 방법에 의해 합성을 수행할 수 있다. 합성에 의해 수득한 본 발명의 펩티드는 흔히 사용하는 정제 절차, 예를 들어, 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 이온 교환 수지 또는 고-다공성 중합체 수지를 사용하는 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피 등에 의해 정제될 수 있다.

[0018] 이와 같이 수득한 트리펩티드 및 상기 트리펩티드가 풍부한 조성물은 강한 ACE 저해 활성을 가지고, 이들이 경구로 섭취된 경우 강한 ACE 저해 효과를 나타낸다. 따라서, 이들은 고도로 강력한 ACE 저해제로서 유용하다. 게다가, 이들은 위장관을 통해 쉽게 흡수되고, 열에 비교적 안정하다. 이러한 특징에 기인하여, 이들은 또한 다양한 형태의 식품, 음료 및 약용 제제에 적용가능하다.

[0019] 따라서, 본 발명은 상기 기술한 트리펩티드를 하나 이상 함유하고 안지오텐신 전환 효소 저해 효과를 가지는 것으로 기대되는 식용 조성물, 상기 기술한 트리펩티드를 하나 이상 함유하는 안지오텐신 전환 효소 저해제 및 혈압 강하제를 제공한다.

[0020] 본 발명의 트리펩티드의 하나 이상을 식품, 음료, 약물 등에 사용하는 경우, 참깨 등의 단백질 분획의 서몰리신 소화 생성물로부터 충분히 정제된 트리펩티드를 사용할 수 있고, 또는 화학적으로 합성된 생성물을 사용할 수 있다. 대안적으로는, 본 발명의 트리펩티드가 고 안정성 및 강한 ACE 저해 활성을 가지기 때문에, 트리펩티드-풍부 조성물로서는 상기 기술한 부분 정제 생성물, 또는 서몰리신 소화 생성물 또는 이의 부분 정제 생성물을 상기와 같이 사용할 수 있고; 또한 그러한 경우, 충분한 ACE 저해 활성이 수득될 것이고, 따라서, 이것은 본 발명의 바람직한 구현예이다.

[0021] 본 발명에 따른 식용 조성물은 상기 기술한 트리펩티드의 하나 이상을 단일 섭취량으로 0.001 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.01 mg 내지 20 mg, 더 바람직하게는 0.1 mg 내지 10 mg의 양으로 첨가함으로써 제조된다. 본 발명의 트리펩티드는 쉽게 다를 수 있고 고도로 수용성인 고형물 또는 분말의 형태이다. 또한, 상기 트리펩티드는 위장관을 통해서 잘 흡수될 수 있다. 따라서, 상기 트리펩티드는 특별한 제한 없이 임의의 방법에 의해서 임의의 단계에서 식품에 첨가될 수 있다. 즉, 상기 트리펩티드는 식품 산업 분야에서 흔히 사용하는 방법을 사용함으로써 식품 제조 공정의 시작 단계, 중간 단계 또는 최종 단계에서 분말, 용액, 혼탁액 등의 형태로 첨가될 수 있다. 본 발명의 트리펩티드를 함유하는 식용 조성물의 일시적, 간헐적, 지속적 또는 일상적 섭취는 안지오텐신 전환 효소의 저해 및 예를 들어, 혈압 강하 효과의 수득을 가능하게 한다. 식품 및 음료는 예를 들어 고형물, 반유동물 또는 유동물의 형태일 수 있다. 고형 식품의 예로는 비스킷, 시트, 알약 예컨대 정제 및 캡슐, 과립, 분말 등의 형태의 일반 식품 및 건강 식품이 포함된다. 반유동 식품의 예로는 페이스트, 젤리, 겔 등의 형태의 제품이 포함된다. 유동 식품의 예로는 주스, 냉 음료, 차 음료, 강장

음료 등의 형태의 일반 음료 제품 및 건강 음료가 포함된다. 이같은 식품 또는 음료는 우리에게 본 발명의 트리펩티드를 지속적으로 섭취하여 혈압 상승의 위험을 억제할 수 있게 하는 조미료 또는 영양 공급 음료의 형태로 공급될 수 있다.

[0022] 본 발명의 약용 조성물은 상기 기술한 바와 같은 식용 조성물과 유사한 양으로 본 발명의 트리펩티드를 함유한다. 본 발명의 약용 조성물은 고혈압 환자에게 일시적으로 투여되어 체내의 안지오텐신 전환 효소를 억제하여 혈압 강하 효과를 수득할 수 있다. 대안적으로는, 본 발명의 약용 조성물은, 그 활성 성분이 천연 재료에서 유래하기 때문에, 안전하게 지속적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 약용 조성물에 의해 치료 및/또는 예방될 수 있는 질환의 예로서, 고혈압을 언급할 수 있다. 약용 조성물이 경구 제제 예컨대 정제, 캡슐, 가루, 과립 또는 시럽의 형태인 것이 바람직하다. 비경구 투여용 제제의 예로는 정맥내, 동맥내, 피하, 근육내 또는 비강내 투여되는 무균 용액이 포함된다. 이같은 용액은 사용하기 전에 용해시킬 수 있는 건식 고형물의 형태일 수 있다. 유효량의 트리펩티드를 생리식염수에 용해시키고, 주사 제제 제조에 흔히 사용하는 바와 같이 무균 조건 하에서 처리함으로써 주사 제제를 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명자들은, 음식물의 서몰리신 소화 생성물이 상기 기술한 문제의 극복이 가능한 웨프티드를 함유한다고 가정하여, 3 개 이하의 아미노산으로 구성된 ACE 저해 웨프티드를 탐구하였다. 그 결과, 이들은 참깨의 서몰리신 소화 생성물 중 세 개의 트리펩티드를 발견하는데 성공했고, 상기 트리펩티드는 ACE 저해 활성을 가지고, 동물 실험에서 혈압 강하 효과를 나타내었다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1 은 자발적 저혈압 래트를 사용하여, 본 발명에 따른 웨프티드의 혈압 강하 효과에 대한 조사의 결과를 나타내는 그라프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이제, 본 발명을 하기 실시예를 참고로 더욱 상세하게 기술할 것이다.

[0026] ACE 저해 활성 측정 방법

[0027] 본 발명에서, ACE 저해 활성 (IC_{50}) 을 하기 방법에 따라 측정하였다.

[0028] 완충액: 0.1 M HEPES, 0.3 M NaCl, 0.01 % Triton-X (pH 8.3).

[0029] 효소: 토끼 폐로부터의 ACE (Sigma).

[0030] 상기 완충액에 용해시키고 1 mU/50 μ l 농도로 조절하였다.

[0031] 기질: Bz-Gly-His-Leu · H₂O (Peptide Institute Inc.).

[0032] 기질 8.95 mg 을 디메틸 셀록시드 1 μ l 에 용해시키고, 추가로 물로 5-배 희석시켰다 (최종 농도: 4 mM).

[0033] 본 발명의 웨프티드를 함유하는 샘플 5 μ l 를 피펫으로 96-웰 마이크로플레이트에 옮겼다. 완충액 25 μ l 및 효소 10 μ l 를 첨가한 후, 혼합물을 완전히 교반하고 37 °C 에서 5 분 동안 배양시켰다. 기질 10 μ l 를 첨가한 후, 혼합물을 37 °C 에서 30 분 동안 반응시켰다. 이어서, 0.1 N NaOH 40 μ l 를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 1 % o-프탈알데히드의 메탄을 용액 20 μ l 를 첨가하고 실온에서 10 분 동안 방치시킨 후, 0.1 N HCl 100 μ l 를 첨가하고 생성된 혼합물을 37 °C 에서 30 분 동안 배양시켰다. 이어서, ACE 에 의해 가수분해되어 형성된 His-Leu 의 양을, 히스티딘 잔기의 아미노기와 o-프탈알데히드 사이의 반응에 의해 형성된 형광물질을 여기 (355 nm) 시키고 460 nm 에서 형광발광 파장을 측정함으로써 결정하였다. 이어서, 본 발명의 웨프티드에 의한 저해 백분율을 하기 식에 따라 결정하고, ACE 저해 활성 (IC_{50}) 을 계산하였다.

[0034] 저해 백분율 = $\{1-(A-a)/(B-b)\} \times 100$

[0035] A: 샘플을 첨가한 경우, 형광발광의 측정치.

[0036] a: 샘플을 첨가하고 효소를 대신하여 완충액을 첨가한 경우, 형광발광의 측정치.

- [0037] B: 샘플을 대신하여 중류수를 첨가한 경우, 형광발광의 측정치.
- [0038] b: 샘플을 대신하여 중류수를 첨가하고 효소를 대신하여 완충액을 첨가한 경우, 형광발광의 측정치.
- [0039] 실시예 1: 펩티드의 제조 및 정제
- [0040] 물 2 L 를 탈지 참깨 100 g 에 첨가하고, 생성된 혼합물의 pH 값을 NaOH 를 첨가하여 12.0 내지 12.5 로 조절하였다. 55 °C 에서 1 시간 동안 교반한 후, 혼합물을 여과하여 단백질 추출물을 제공하였다. 단백질 추출물에 HCl 을 첨가하여 pH 값을 4.0 으로 조절하였다. 원심분리 후, 참깨 단백질 (건조 성분 중량: 19.8 g) 을 수득하였다.
- [0041] 수득한 참깨 단백질 10 g 에, 물 300 mL 를 첨가하고, 혼합물의 pH 값을 NaOH 로 7.5 로 조절하였다. 이어서, 서몰리신 10 mg (Nacalai Tesque, 7000 PU/mg) 을 거기에 첨가하고, 65 °C 에서 6 시간 동안 부드럽게 교반하면서 혼합물을 반응시켰다. 반응이 완료된 후, HCl 을 반응 혼합물에 첨가하여 pH 4.0 으로 조절하고, 90 °C 로 10 분 동안 가열함으로써 서몰리신을 비활성화시켰다. 가열 후, 이와 같이 형성된 침전물을 원심분리에 의해 제거하고, 상청액을 종이 필터 (Toyo, No. 2) 를 통해 여과시켰다. 여과액을 동결-건조시켜 펩티드 분말 5.9 g 을 제공하였다.
- [0042] 이 펩티드 분말 80 mg 을 10 % 에탄올 용액 2 mL 에 용해시키고, 겔 여과 칼럼 크로마토그래피하였다. 사용한 조건은 하기와 같았다.
- [0043] 칼럼: Bio-Gel P-2 (15 mm ID × 820 mm L, Bio-Rad).
- [0044] 용리액: 10 % 에탄올.
- [0045] 유속: 0.15 mL/분.
- [0046] 검출: UV 210 nm.
- [0047] 칼럼으로부터의 용출액을 분획 수집기를 사용하여, 15 분 간격으로 분획으로 수집하였다. 각각의 분획의 ACE 저해 활성을 상기 기술한 방법에 따라 측정하였다. 그 결과, 상기 조건 하의 주 ACE 저해 활성이 분획 32 내지 38 에서 관찰되었다. 이러한 분획들을 수합하고 동결-건조시켰다. 이 절차를 3 회 반복하여 펩티드를 총 37.5 mg 수득하였다.
- [0048] 다음으로, Bio-Gel P-2 겔 여과 칼럼 크로마토그래피에 의해 수득한 ACE 저해 활성 펩티드 37.5 mg 을 순수 2 mL 에 용해시키고, ODS 칼럼을 사용하는 고성능 액체 크로마토그래피를 행하여 펩티드를 분류하였다. 사용한 조건은 하기와 같았다.
- [0049] 칼럼: Develosil ODS-10 (20 mm ID × 250 mm L, Nomura Chemical).
- [0050] 이동상: 완충액 A: 5 % CH₃CN, 0.1 % TFA.
- [0051] 완충액 B: 40 % CH₃CN, 0.1 % TFA.
- [0052] 기울기: 0 내지 20 분: 0 % 완충액 B
- [0053] 20 내지 80 분: 0 내지 100 % 완충액 B.
- [0054] 유속: 10 mL/분.
- [0055] 검출: UV 210 nm.
- [0056] 상기 조건 하에서, 용출액을 분획 수집기를 사용하여 1 분 간격으로 분획으로 수집하였다. 각각의 분획 5 μL 부분을 피펫으로 96-웰 마이크로플레이트에 옮기고 감압 하에 중발건조시켰다. 다음으로, 잔류물을 순수 5 μL 에 용해시켜 ACE 저해 활성 측정용 샘플을 제공하였다. 이어서, 각각의 분획의 ACE 저해 활성을 상기 기술한 방법에 따라 측정하였다. 그 결과, 분획 39, 52 및 54 가 강한 ACE 저해 활성을 나타내었다. 상기 세 분획을 동결-건조시켜 각각의 분획으로부터 소량의 펩티드를 수득하였다.
- [0057] 분획 39 의 ACE 저해 펩티드의 정제
- [0058] 분획 39 의 동결-건조 펩티드를 순수 200 μL 에 용해시키고 C30 칼럼을 사용하는 고성능 액체 크로마토그래피를 행하여 펩티드를 분류하였다. 사용한 조건은 하기와 같았다.

- [0059] 칼럼: Develosil C30-UG-5 (10 mm ID × 250 mm L, Nomura Chemical).
- [0060] 이동상: 완충액: 10 % CH₃CN, 0.1 % TFA.
- [0061] 유속: 4 ml/분.
- [0062] 검출: UV 210 nm.
- [0063] 상기 조건 하에서, 용출액을 분획 수집기를 사용하여 15 초 간격으로 분획으로 수집하였다. 각각의 분획 5 μ l 부분을 피펫으로 96-웰 마이크로플레이트에 옮기고 감압 하에 증발건조시켰다. 다음으로, 잔류물을 순수 5 μ l 에 용해시켜 ACE 저해 활성 측정용 샘플을 제공하였다. 이어서, 각각의 분획의 ACE 저해 활성을 상기 기술한 방법에 따라 측정하였다. 그 결과, 분획 44 및 45 가 강한 ACE 저해 활성을 나타내었다. 상기 두 분획을 별도로 동결-건조시켜 각각의 분획으로부터 소량의 펩티드를 수득하였다. 다음으로, 이러한 분획에 아미노산 분석 및 TOF MS/MS 분석을 행하였다. 그 결과, 분획 44 및 45 의 펩티드가 Leu-Ser-Ala 인 것을 발견하였다.
- [0064] 분획 52 의 ACE 저해 펩티드의 정제
- [0065] 분획 52 의 동결-건조 펩티드를 순수 200 μ l 에 용해시키고 C30 칼럼을 사용하는 고성능 액체 크로마토그래피를 행하여 펩티드를 분류하였다. 사용한 조건은 하기와 같았다.
- [0066] 칼럼: Develosil C30-UG-5 (10 mm ID × 250 mm L).
- [0067] 이동상: 완충액: 14 % CH₃CN, 0.1 % TFA.
- [0068] 유속: 4 ml/분.
- [0069] 검출: UV 210 nm.
- [0070] 상기 조건 하에서, 용출액을 분획 수집기를 사용하여 15 초 간격으로 분획으로 수집하였다. 각각의 분획 5 μ l 부분을 피펫으로 96-웰 마이크로플레이트에 옮기고 감압 하에 증발건조시켰다. 다음으로, 잔류물을 순수 5 μ l 에 용해시켜 ACE 저해 활성 측정용 샘플을 제공하였다. 이어서, 각각의 분획의 ACE 저해 활성을 상기 기술한 방법에 따라 측정하였다. 그 결과, 분획 89 및 90, 및 분획 96 및 97 이 강한 ACE 저해 활성을 나타내었다. 상기 네 분획을 별도로 동결-건조시켜 각각의 분획으로부터 소량의 펩티드를 수득하였다. 다음으로, 이러한 분획에 아미노산 분석 및 TOF MS/MS 분석을 행하였다. 그 결과, 분획 89 및 90 의 펩티드가 Ile-Val-Tyr 인 반면, 분획 96 및 97 의 펩티드는 Val-Ile-Tyr 인 것을 발견하였다.
- [0071] 분획 54 의 ACE 저해 펩티드의 정제
- [0072] 분획 54 의 동결-건조 펩티드를 순수 200 μ l 에 용해시키고 C30 칼럼을 사용하는 고성능 액체 크로마토그래피를 행하여 펩티드를 분류하였다. 사용한 조건은 하기와 같았다.
- [0073] 칼럼: Develosil C30-UG-5 (10 mm ID × 250 mm L, Nomura Chemical).
- [0074] 이동상: 완충액: 17 % CH₃CN, 0.1 % TFA.
- [0075] 유속: 4 ml/분.
- [0076] 검출: UV 210 nm.
- [0077] 상기 조건 하에서, 용출액을 분획 수집기를 사용하여 15 초 간격으로 분획으로 수집하였다. 각각의 분획 5 μ l 부분을 피펫으로 96-웰 마이크로플레이트에 옮기고 감압 하에 증발건조시켰다. 다음으로, 잔류물을 순수 5 μ l 에 용해시켜 ACE 저해 활성 측정용 샘플을 제공하였다. 이어서, 각각의 분획의 ACE 저해 활성을 상기 기술한 방법에 따라 측정하였다. 그 결과, 분획 69 내지 73 이 강한 ACE 저해 활성을 나타내었다. 상기 다섯 분획을 별도로 동결-건조시켜 각각의 분획으로부터 소량의 펩티드를 수득하였다. 다음으로, 이들 종 분획 69, 70, 72 및 73 에 아미노산 분석 및 TOF MS/MS 분석을 행하였다. 그 결과, 이러한 분획 각각의 펩티드가 Leu-Val-Tyr 인 것을 발견하였다.
- [0078] 실시예 2: 화학적 합성에 의한 펩티드의 제조

- [0079] Applied Biosystems 에 의해 제조된 자동 펩티드 합성기 (Model ABI 430) 를 사용하여, C-말단으로부터 출발하고 상기 프로그램에 따른 BOC 방법에 의해 연속적으로 펩티드 사슬을 확장시킴으로써, 목적하는 보호된 펩티드 수지를 합성하였다.
- [0080] 수지 상에 펩티드를 구성하는 것을 완료한 후, 보호된 펩티드 수지를 건조시켰다. 이와 같이 수득한 보호된 펩티드를 탈보호시키고, 이것을 무수 불화수소로 처리함으로써 (HF/p-크레졸 8:2 v/v, 60 분) 수지 지지체로부터 상기 펩티드를 제거하였다. 이와 같이 수득한 미정제 펩티드를 90 % 아세트산으로 추출한 후, 동결-건조시켜 분말 고형물을 제공하였다. 이와 같이 수득한 미정제 펩티드를 ODS 칼럼을 사용하는 고성능 액체 크로마토그래피로 추가로 정제하여 목적하는 펩티드를 수득하였다.
- [0081] 칼럼: YMC-Pack ODS-2 (30 mm ID × 250 mm L, YMC).
- [0082] 이동상: 완충액 A: 5 % CH₃CN, 0.1 % TFA.
- [0083] 완충액 B: 40 % CH₃CN, 0.1 % TFA.
- [0084] 기울기: 0 내지 10 분: 0 % 완충액 B
- [0085] 10 내지 90 분: 0 내지 100 % 완충액 B.
- [0086] 유속: 20 mL/분.
- [0087] 검출: UV 220 nm.
- [0088] 이와 같이 정제한 펩티드의 순도를 ODS 칼럼을 사용하는 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 조사하였다.
- [0089] 칼럼: Zorbax 300SB-C18 (4.6 mm ID × 150 mm L, Agilent Technologies).
- [0090] 이동상: 완충액 A: 1 % CH₃CN, 0.1 % TFA.
- [0091] 완충액 B: 60 % CH₃CN, 0.1 % TFA.
- [0092] 기울기: 0 내지 25 분: 0 % 내지 100 % 완충액 B.
- [0093] 유속: 1 mL/분.
- [0094] 검출: UV 220 nm.
- [0095] Leu-Ser-Ala 의 합성
- [0096] 출발 아미노산 수지 지지체로서 Boc-Ala (BrZ) 수지 (0.5 mmol) 를 사용하여, 아미노산 유도체 Boc-Ser 및 Boc-Leu 2 mM 부분을 사용하여 펩티드 사슬을 확장시켰다. 이어서, 실시예 2 에서 상기 기술한 정제 방법에 의해 정제된 Leu-Ser-Ala 을 수득하였다. 실시예 2 에서 상기 기술한 방법에 의해 측정한, 정제 생성물의 순도는 99.0 % 였다.
- [0097] Val-Ile-Tyr 의 합성
- [0098] 출발 아미노산 수지 지지체로서 Boc-Tyr (BrZ) 수지 (0.5 mmol) 를 사용하여, 아미노산 유도체 Boc-Ile 및 Boc-Val 2 mM 부분을 사용하여 펩티드 사슬을 확장시켰다. 이어서, 실시예 2 에서 상기 기술한 정제 방법에 의해 정제된 Val-Ile-Tyr 을 수득하였다. 실시예 2 에서 상기 기술한 방법에 의해 측정한, 정제 생성물의 순도는 98.8 % 였다.
- [0099] Leu-Val-Tyr 의 합성
- [0100] 출발 아미노산 수지 지지체로서 Boc-Tyr (BrZ) 수지 (0.5 mmol) 를 사용하여, 아미노산 유도체 Boc-Val 및 Boc-Leu 2 mM 부분을 사용하여 펩티드 사슬을 확장시켰다. 이어서, 실시예 2 에서 상기 기술한 정제 방법에 의해 정제된 Leu-Val-Tyr 을 수득하였다. 실시예 2 에서 상기 기술한 방법에 의해 측정한, 정제 생성물의 순도는 99.2 % 였다.
- [0101] 실시예 3: 펩티드의 ACE 저해 활성의 측정

[0102] 실시예 2에서 수득한 세 펩티드의 ACE 저해 활성을 상기 기술한 방법에 따라 측정하고, IC_{50} 값을 결정하였다. 표 1에 그 결과를 나타낸다. 대조군으로서, 실시예 1에서 수득한 참깨 펩티드 분말의 ACE 저해 활성을 또한 측정하고, 그것의 IC_{50} 값을 결정하였다.

표 1

펩티드	저해 활성 (IC_{50})	
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	μM
Leu-Ser-Ala	2.4	8.4
Val-Ile-Tyr	1.6	4.2
Leu-Val-Tyr	0.84	2.1
펩티드 분말	-	50.3

[0104] 실시예 4: 자발적 고혈압 래트에 대한 펩티드의 혈압 강하 효과

[0105] 17 내지 22 주령의 SHR 래트를 하룻밤 동안 금식시켰다. 이어서, 실시예 2에서 수득한 세 펩티드 각각을 1 mg/kg 의 복용량으로 경구 투여하였다. 대조군에는, 비교를 위해서 동일한 양의 물을 경구 투여하였다. 투여 전, 및 24 시간 후까지의, 심장 수축시 혈압의 변화를 측정하였다 (BP-98A, SOFTRON). 도 1에 그 결과를 나타낸다.

[0106] 실시예 5

[0107] 실시예 2의 합성 생성물을 사용하여, 하기 성분으로부터 곡류 차 음료를 제조하였다.

[0108] 조성:

[0109] 볶은 보리 60 g

[0110] 온수 2000 mL

[0111] 실시예 2의 펩티드

[0112] Leu-Ser-Ala 19 mg

[0113] Val-Ile-Tyr 18 mg

[0114] Leu-Val-Tyr 18 mg

[0115] 제조 방법:

[0116] 볶은 보리에 온수를 첨가하고 90 °C로 5 분 동안 가열하였다. 40 °C로 냉각시킨 후, 혼합물을 여과하였다. 이어서, 추출물에 물을 첨가하여 부피를 2000 mL로 조절하였다. 다음으로, 상기 펩티드를 첨가하고 교반에 의해 용해시켜 곡류 차 음료를 제공하였다.

[0117] 실시예 6: 프로테이나아제 처리 식물 종자로부터의 Leu-Val-Tyr의 단리 및 정량

[0118] 쌀 및 귀리 날알을 각각 25 g으로 중량을 쟁 후, 이것을 갈아서 분말을 제공하였다. 헥산 50 mL를 각각의 화 (華: flower)에 첨가하고, 여과지 (Whatman, No. 1)를 통해 용매를 제거하였다. 동일한 헥산 처리를 총 4회 반복하였다. 여과지 상의 잔류물로부터 헥산을 제거하여 탈지 쌀 분말 18.8 g 및 탈지 귀리 분말 15.9 g을 각각 제공하였다.

[0119] 각각의 탈지 분 (flour)을 10 g으로 중량을 재고, 0.01 N NaOH 200 mL에 혼탁시키고 55 °C에서 1시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼탁액을 여과지 (Whatman, No. 1)를 통해 여과시켰다. 0.1 N HCl을 첨가하여 여과액을 pH 4.0으로 조절하였다. 이와 같이 형성된 침전물을 원심분리에 의해 수집하고, 동결-건조시켜 쌀 및 귀리 미정제 단백질 분말 0.38 g 및 0.57 g을 각각 수득하였다.

[0120] 수득한 분말을 0.2 g으로 중량을 재고, 0.1 mM CaCl_2 10 mL에 혼탁시켰다. 혼탁액을 pH 7.5로 조절하고, 거기에 서몰리신 0.2 mg (7,000 PU/mg, Nacalai Tesque)을 첨가하여, 65 °C에서 6시간 동안 부드럽게 혼합하면서 효소 반응시켰다. 반응 후, 1 N HCl에 의해 pH를 4.0으로 조절하고, 혼합물을 90 °C에서 10분 동안 가열함으로써 서몰리신을 비활성화시켰다. 가열에 의해 형성된 침전물을 30분 동안 3,000 rpm으로

원심분리에 의해 제거하였다. 상청액을 동결건조시켜 쌀 28.6 mg 및 귀리 87.8 mg 펩티드 분말을 제공하였다.

[0121] 상기 수득한 쌀 및 귀리 펩티드 분말로부터, 본 발명의 펩티드 중 하나인 Leu-Val-Tyr 의 단리 및 정량을 하기와 같이 수행하였다.

[0122] i) PD-10 칼럼 상에서의 전처리

[0123] 쌀 및 귀리 펩티드 분말 각각을 20 mg 으로 중량을 재고, 5 mg/ml 가 되도록 0.1 N 아세트산에 용해시키고, 마이크로-필터 (Millipore-HV, 구멍 크기 0.45 μm , 필터 직경 13 mm, Millipore Corporation) 를 통해 여과시켜 불용성 성분을 제거하였다. 여과액 2.5 ml 부분을 0.1 N 아세트산으로 평형을 유지시킨 PD-10 칼럼 (탈염 칼럼, Amersham Biosciences) 으로 주입시켰다. 0.1 N 아세트산 추가량 3.5 ml 로 칼럼을 세척하였다. 이어서, 0.1 N 아세트산 추가량 3.0 ml 로 용리시킨 분획을 수집하고, 증발건조시키고, 물 0.5 ml 에 용해시킨 후, 동결-건조시켰다.

[0124] ii) TSK-GEL G2000SWXL 을 사용하는 겔 여과 HPLC

[0125] PD-10 칼럼 상에서의 전처리에 의해 제조한 견본을 45 % CH₃CN, 0.1 % TFA 250 μl 에 용해시켜 5 분 동안 2,000 rpm 으로 원심분리시켰다. 여과액을 마이크로-필터 (Millipore-HV, 구멍 크기 0.45 μm , 필터 직경 13 mm, Millipore Corporation) 를 통해 여과하여 불용성 성분을 제거하였다.

[0126] 45 % CH₃CN, 0.1 % TFA 로 평형을 유지시킨 TSK-GEL G2000SWXL 의 칼럼 (7.8 \times 300 mm, Tosoh Corporation) 에 여과액 50 μl 부분을 충전시키고, 45 % CH₃CN, 0.1 % TFA 로 HPLC 를 수행하였다 (유속 0.7 ml/분, 검출 파장 280 nm). 체류 시간 30 초 전후의 1 분 동안의 용출액을 수집하고, 증발건조시키고, 물 0.5 ml 에 용해시키고 동결-건조시켰다. 동일한 조건 하에서 합성 Leu-Val-Tyr 에 별도로 HPLC 를 행하여 Leu-Val-Tyr 의 체류 시간을 미리 결정하였다.

[0127] iii) Develosil C30-UG-5 상에서의 역 HPLC (Leu-Val-Tyr 의 정량)

[0128] 겔 여과로부터의 활성 펩티드 분획의 Leu-Val-Tyr 을 Develosil C30-UG-5 칼럼 (3 \times 150 mm, Nomura Chemical Co., Ltd.) 상에서의 역 HPLC 에 의해 정량적으로 분석하였다. TSK-GEL G2000SWXL 상에서의 겔 여과 HPLC 로부터의 분획을 5 % CH₃CN, 0.1 % TFA 250 μl 에 용해시키고, 5 분 동안 2,000 rpm 으로 원심분리시키고, 마이크로-필터 (Millipore-HV, 구멍 크기 0.45 μm , 필터 직경 13 mm, Millipore Corporation) 를 통해서 상청액을 여과하여 불용성 성분을 제거하였다. 여과액 50 μl 부분을 5 % CH₃CN, 0.1 % TFA 로 평형을 유지시킨 Develosil C30-UG-5 칼럼에 충전시켜, 하기 조건 하에 크로마토그래피를 수행하였다:

[0129] 용리 용매

[0130] 0-5 분: 5 % CH₃CN, 0.1 % TFA

[0131] 5-10 분: 5-14% CH₃CN, 0.1 % TFA

[0132] 10-35 분: 14 % CH₃CN, 0.1 % TFA

[0133] 유속: 0.4 ml

[0134] 검출 파장: 280 nm

[0135] Develosil C30-UG-5 칼럼 크로마토그래피에서, 체류 시간이 펩티드의 진정 Leu-Val-Tyr 의 것에 해당하는, 쌀 및 귀리 각각의 펩티드의 피크를 수집하였다. 상기 분획에 TOF MS 분석 및 TOF MS/MS 분석을 행하여 상기 분획이 Leu-Val-Tyr 임을 확인하였다.

[0136] 상기 기술한 바와 동일한 조건 하에 동일한 Develosil C30-UG-5 칼럼에 상이한 양의 진정 Leu-Val-Tyr 을 충전시키고, 충전량에 대하여 피크 면적을 좌표상에 점찍어 검정 곡선을 작성하였다.

[0137] 검정 곡선 Y = 249197X - 2150.6 (R² = 0.9991)

[0138] Y: 피크 면적, X: Leu-Val-Tyr 의 양 (μg)

[0139] 쌀 및 귀리의 Develosil C30-UG-5 크로마토그래피로부터의 Leu-Val-Tyr 분획의 피크 면적을 검정 곡선에 적용시

졌다. 그 결과, 쌀 및 귀리로부터의 펩티드 1 mg 중 Leu-Val-Tyr 의 양이 각각 $0.71 \mu\text{g}$ 및 $1.05 \mu\text{g}$ 인 것으로 결정되었다.

도면

도면1

