(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-520274
(P2010-520274A)
(43)公表日　平成22年6月10日(2010.6.10)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 7/06	(2006.01)	C07K 7/06		4B018
C07K 5/117	(2006.01)	C07K 5/117	ZNA	4B064
C12P 21/06	(2006.01)	C12P 21/06		4C084
A23L 1/305	(2006.01)	A23L 1/305		4C087
A61K 38/00	(2006.01)	A61K 37/02		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 29 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-552615 (P2009-552615)
(86)(22)出願日　平成20年3月6日 (2008.3.6)
(85)翻訳文提出日　平成21年11月4日 (2009.11.4)
(86)国際出願番号　PCT/NL2008/050131
(87)国際公開番号　WO2008/108649
(87)国際公開日　平成20年9月12日 (2008.9.12)
(31)優先権主張番号　07103545.5
(32)優先日　平成19年3月6日 (2007.3.6)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　507058203
フリーズランド　ブランズ　ビー．ブイ．
オランダ国，７９４３　ピーイー　メッペル，ブランケンスタイン　１４２
(74)代理人　100085545
弁理士　松井　光夫
(72)発明者　ボンテ，アルフレッド　ウィリー
オランダ国，７１６１　イーエヌ　ネーデ，ロッゲストラート　９
(72)発明者　グールツ，ヨハネス　マリエ　ウィルヘルムス
オランダ国，７５５９　エヌエヌ　ヘンゲロ，ブリュッセルストラート　５５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ホエーからのＡＣＥ抑制ペプチド及び同物を提供する方法

(57)【要約】
本発明は、抗高血圧効果を有する化合物を提供する方法に関する。より特には、本発明は、ホエータンパク質から酵素的に放出されうるＡＣＥ（アンジオテンシンＩ変換酵素）抑制ペプチドに関する。ＡＣＥ抑制活性を有するタンパク質加水分解物を提供する方法であって、ホエータンパク質含有基質をバクテリアの熱不安定性中性プロテアーゼにより処理して第１の加水分解物を作ること及び該第１の加水分解物をサーモリシンにより処理して第２の加水分解物を作ることを含む上記方法が提供される。また、該方法により得られる加水分解物及び分離されたペプチド並びに、哺乳類におけるＡＣＥ活性を抑制する為；血圧を低下させる為；及び／又は高血圧の発生を予防する為の医薬の調製の為にそれらを使用する方法も提供される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記ペプチド

VAGTWYS, VAGTWYSL, WYSL,
IAEKTKIPAV, AASDISL, VAGTW, ASDISL, VYVEE, LKALPM, LIVTQT,
IIVTQT, DAQSAPL, VLDTDY, LVLDTDYKKY, DTDYKKY, LKPTPEG,

及び、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）抑制活性を有するそれらの機能的ペプチド類似体からなる群から選ばれるＡＣＥ抑制ペプチド。
【請求項２】
請求項１に記載のペプチドを含むタンパク質加水分解物を提供する方法であって、
ホエータンパク質含有基質をバクテリアの熱不安定性中性プロテアーゼにより処理して第１の加水分解物を作ること；及び
該第１の加水分解物をサーモリシンにより処理して第２の加水分解物を作ること
を含む上記方法。
【請求項３】
該中性プロテアーゼが、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ又はＢａｃｉｌｌｕｓ　ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓに由来するものである、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
該中性プロテアーゼが、商品名Ｎｅｕｔｒａｓｅ（Ｒ）下で販売される中性プロテアーゼ又は同様の特性を有する酵素である、請求項２又は３に記載の方法。
【請求項５】
該サーモリシンが、Ｂ．ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ（Ｂ．ｔｈｅｒｍｏｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃｕｓ変異体Ｒｏｋｋｏ）に由来する、バクテリアの中性熱安定性メタロプロテイナーゼ（ＥＣ　３．４．２４．４又はＥＣ　３．４．２４．２７）又は同様の特性を有するサーモリシンである、請求項２～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
該第１の加水分解物をサーモリシンにより処理する前に、バクテリアの熱不安定性中性プロテアーゼを不活性化する工程を含む、請求項２～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
該第１及び／又は第２の加水分解の反応混合物における酵素対基質比（Ｅ／Ｓ）が、１／２０～１／２５０、好ましくは１／５０～１／１００である、請求項２～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
該基質が、ホエータンパク質濃厚物（ＷＰＣ）、好ましくはβ－ラクトグロブリン（ＢＬＧ）に富んだＷＰＣである、請求項２～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
該ホエータンパク質含有基質が、該基質の合計重量に対し、少なくとも２５％、好ましくは少なくとも３５％、より好ましくは少なくとも６０％のＢＬＧを含む、請求項２～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
該第１及び／又は第２の加水分解物のホエータンパク質濃度が、１００ｍｌ当たり約１～約５０ｍｇ、好ましくは約２～約１５ｍｇ／ｍｌである、請求項２～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
第１の反応工程が、約１０の加水分解度（ＤＨ）、好ましくは約３～７％が達せられるまで、より好ましくはＤＨが約３～５％になるまで実施される、請求項２～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】

該中性プロテアーゼによる処理が、約５０℃で且つ約７のｐＨで、好ましくは約３～４時間、実施される、請求項２～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
該サーモリシンによる処理が、約５０～６０℃で且つ約８のｐＨで、好ましくは少なくとも８時間、より好ましくは少なくとも１２時間、実施される、請求項２～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
第２の加水分解物を１以上のペプチドを含む個々の画分に分画すること及びＡＣＥ抑制活性を有する少なくとも１のペプチドのアミノ酸配列を同定することをさらに含む、請求項２～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
請求項２～１３のいずれか１項に記載の方法により得られる、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）抑制活性を有するホエー加水分解物。
【請求項１６】
請求項１４に記載の方法により得られるＡＣＥ抑制ペプチド。
【請求項１７】
請求項１５に記載の加水分解物及び／又は請求項１又は１６に記載の少なくとも１のペプチド、並びに適当なキャリアを含む組成物。
【請求項１８】
該組成物が、医薬組成物又は食品若しくは嗜好食品である、請求項１７に記載の組成物。
【請求項１９】
該組成物が、液体の製品、例えば乳製品若しくは果物ジュースなど、又は固体の製品、例えば粉などである、請求項１７又は１８に記載の組成物。
【請求項２０】
哺乳類においてＡＣＥ活性を抑制する為、血圧を低下させる為、及び／又は高血圧の発生を防ぐ為の医薬の調製の為に、請求項１５に記載の加水分解物又は請求項１若しくは１６に記載のペプチドを使用する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、抗高血圧効果を有する化合物及びそれらを提供する方法に関する。より特には、本発明は、ホエータンパク質からの放出性ＡＣＥ（アンジオテンシンＩを変換する酵素）抑制ペプチドに関する。さらに、本発明は、ＡＣＥ抑制活性を有するホエー加水分解物及びホエーに由来する分離されたペプチド；そのようなホエー加水分解物及び／又はペプチドを含む組成物；並びに、例えば哺乳類においてＡＣＥ活性を抑制する医薬の調製の為に、そのような加水分解物及び／又はペプチドを使用する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
診断及び治療における大きな前進にもかかわらず、心臓血管疾患（ＣＶＤ）は西洋工業化社会において主な死亡原因のままであった。高血圧（高い血圧）は、心臓血管に関連する疾患（梗塞、卒中発作、心不全及び／又は腎疾患）の発症にとって最も重要な危険因子である。
【０００３】
有効な抗高血圧治療が、ＣＶＤの死亡率における減少に大きな寄与をしてきた。レニン－アンジオテンシン－アルドステロン系（ＲＡＡＳ）の構成成分を抑制し又は拮抗する薬剤は、高血圧を患っている人において、得られた血圧を減少することに対する大きな効果を有した。ＲＡＡＳにおいて活性な酵素の一つはアンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）である。この酵素はカルボキシジペプチダーゼであり、及び、それはアンジオテンシンＩの、生理活性ペプチドであるアンジオテンシンＩＩへの変換を触媒する。さらに、生理活性ペプチドブラジキニンが非機能的ペプチドへと加水分解される。アンジオテンシンＩＩ及び

ブラジキニンの主な生物学的機能性は、腎臓及び肺のような重要な臓器を通る体血圧及び血流の制御に関連する。血圧を低めるであろう治療法の重要な群は実際にＡＣＥ酵素を標的にしている。例えばカプトプリル及びリシノプリルなどのような医薬は、ＡＣＥ酵素の活性を抑制する。これらのＡＣＥインヒビターの共通の特徴は、該医薬の構造がジペプチド又はトリペプチドとの大きな類似性を有することである。カプトプリルはジペプチド（Ｃｙｓ－Ｐｒｏ）であり且つ非常に強力なＡＣＥインヒビターである。

【０００４】

食品産業は、健康を増進する食品成分、いわゆる機能性食品又は栄養補助食品、を開発する新たな機会を探している。該産業は、高血圧の消費者における血圧の減少を、関心のある主要な領域と割り当てた。

【０００５】

バルク量で入手できるタンパク質（カゼイン、ホエータンパク質、大豆及び魚のタンパク質）に由来する特定のペプチドがＡＣＥ酵素を抑制することができ、そして結果として、血圧を下げることができ且つそれ故にＣＶＤ関連疾患のリスクを低めることができることが仮定される。或るタンパク質加水分解物がｉｎ ｖｉｔｒｏでＡＣＥ活性を抑制することができることが示されている。該加水分解物は、プロテアーゼ処理又は発酵活性のいずれかにより得られる。ラットにおけるｉｎ ｖｉｖｏでの血圧に対する効果に関して利用可能なデータがある。これは血圧を低める活性を測定する為の一般的に用いられ且つ認められた手順である。

【０００６】

この主題についての健康増進性食品は今市場に進出している。例えば、Ｖａｌｉｏ及びＣａｌｐｉｓは、乳タンパク質の微生物的発酵により得られる製品を市場に持ち込む。さらに、ＤＭＶは強力なＡＣＥ抑制活性を有するペプチドを含む、カゼインの加水分解物を有する。最も多くの消費者製品は、乳に基づく製品（乳又はヨーグルト）として商品化されている。

【０００７】

ＡＣＥ抑制ペプチドがどのような構造的特徴を満たすべきかは正確には知られていないが、ＡＣＥインヒビターであると判明しているペプチドの間にはいくつかの類似性がある。これらは一般的には、Ｃ末端に疎水性アミノ酸を有する短いペプチド（２～４アミノ酸）である。また、次に該ペプチドの末端に、通常はＣ末端に存在する該アミノ酸プロリンがしばしば言及される。

【０００８】

日本の会社であるカルピス株式会社は、発酵を通じてＡＣＥ抑制ペプチドを得た。これらは通常は、アミノ酸プロリンの存在及び高いＡＣＥ抑制活性により特徴付けられる小さなペプチドである。発酵により得られる該活性ペプチドは主として、それらの構造中にプロリンを有する配列からなる；すなわちＶａｌ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ又はＩｌｅ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ（Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｙ．ｅｔ ａｌ．（１９９６），Ｊ．Ｄａｉｒｙ Ｓｃｉ． ７８；７７７－７８３）。抗高血圧活性を有する他のペプチドが、とりわけ、農畜産業振興機構（Nouchikusangiyou）、雪印乳業株式会社、Ｓｙｍｂｉｃｏｍ ＡＢ及び日清製粉株式会社において記載される。

【０００９】

該活性ペプチド／加水分解物が十分なＡＣＥ抑制活性を有することが、測定可能な血圧低下にとって重要であることが明白である。ＡＣＥインヒビター、例えばペプチド又は加水分解物などのＡＣＥ抑制活性は、通常はＩＣ５０値として表される。この値は、ＡＣＥ活性を５０％だけ減少するのに必要なペプチド／加水分解物の濃度を示す。ＡＣＥインヒビターのＩＣ５０値が低ければ低いほど、ＡＣＥ抑制活性はより強力になる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１０】

本発明の目的は、十分なＡＣＥ抑制活性を有する加水分解物及びペプチドを提供すること

である。より特には、本発明は、ホエータンパク質、とりわけβ－ラクトグロブリンを出発物質として用いる、ＡＣＥ抑制の酵素的製造のための新規な方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【００１１】

本発明者らは驚くべきことに、２つの異なる細菌酵素（中性プロテアーゼ及びサーモリシン）によりホエータンパク質含有基質の段階的加水分解が１６μｇ／ｍｌと同じくらい低いＩＣ５０を有する加水分解物を産生することができることを発見した。従って、本発明は、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）抑制活性を有する少なくとも１つのペプチドを含むタンパク質加水分解物を提供する方法であって、

ホエータンパク質含有基質を細菌の熱不安定性中性プロテアーゼにより処理して第１の加水分解物を産生すること；及び、

該第１の加水分解物をサーモリシンにより処理して第２の加水分解物を産生することを含む上記方法に関する。すなわち、細菌の中性プロテアーゼ及びサーモリシン（ＥＣ３．４．２４．２７又はＥＣ３．４．２４．４）による段階的な様式でのホエータンパク質含有基質の処理を含む２段階加水分解方法が提供される。この方法により提供されうるペプチド、例えば

VAGTWYS, VAGTWYSL, WYSL, IAEKTKIPAV, AASDISL, VAGTW, ASDISL, VYVEE, LKALPM, LIVTQT, IIVTQT, DAQSAPL, VLDTDY, LVLDTDYKKY, DTDYKKY, LKPTPEG,

及び、ＡＣＥ抑制活性を有する、それらの機能的なペプチド類似体からなる群から選ばれるアンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）抑制ペプチドなど、も提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】Ｈｉｐｒｏｔａｌ　５３５のニュートラーゼ（Ｎｅｕｔｒａｓｅ）による典型的な加水分解パターンを示す図である。タンパク質濃度は１００ｍｇ／ｍｌであった。

【図２】第１の加水分解物のサモアーゼ（Ｔｈｅｒｍｏａｓｅ）による典型的な加水分解パターンを示す図である。ペプチド濃度＝４０ｍｇ／ｍｌ及びＥ／Ｓ＝０．０１。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

種々のバクテリアの株におけるプロテイナーゼ（この多くは発酵した乳製品の製造において用いられうる）が、乳タンパク質からのＡＣＥ抑制ペプチドを放出することができることが知られている（概説のために、Ｍｅｉｓｅｌ　ａｎｄ　Ｂｏｃｋｅｌｍａｎｎ（１９９９），Ａｎｔ．ｖａｎ　Ｌｅｅｕｗｅｎ．７６：２０７－２１５又はＧｏｂｂｅｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６６：３８９８－３９０４を参照されたい）。

【００１４】

例えば、国際公開第０３／１０２１９５号パンフレットは、１以上（１又は１より多い）のエンドプロテアーゼ、特にはプロリン特異的エンドプロテアーゼ、と１以上のトリペプチダーゼとの組み合わせの使用を開示する。例として、カゼイン加水分解物が、セリンプロテアーゼと接触され、続いてＥｎｄｏＰｒｏにより処理、及び最後にトリペプチダーゼＴＰＡＰ－Ａにより処理がされる。

【００１５】

国際公開第９９／６５３２６号パンフレットは、生理活性ペプチドを含むホエータンパク質加水分解物を調製する一段階方法であって、ホエータンパク質をプロテアーゼにより処理すること及び苦味を有するペプチドが産生される前に該加水分解を終了することを含む上記方法を開示する。

【００１６】

国際公開第０２／１９８３７号パンフレットは同様に、改善された風味、機能性及びＡＣＥ－Ｉ抑制特性を有するホエータンパク質加水分解物を調製する方法に関する。約１０％と同じくらいの加水分解が達せられるまでの、１以上の熱不安定性プロテアーゼによるホエータンパク質分離物の処理、続く酵素不活性化を含む一段階方法が開示される。好ましいプロテアーゼはプロテアーゼ６、プロテアーゼＡ、プロテアーゼＭ、ペプチダーゼ（Ｐｅｐｔｉｄａｓｅ）、ニュートラーゼ、Ｖａｌｉｄａｓｅ及びＡＦＰ　２０００である。

【００１７】

特開平０６－１２８２８７号公報は、微生物に由来する中性プロテアーゼ又はアルカリプロテアーゼによる乳タンパク質（例えば牛乳β－カゼイン）を加水分解すること及び次にオピオイド活性を有する画分を回収することによる、ＡＣＥ抑制活性を有するオピオイドペプチドの調製を開示する。

【００１８】

米国特許第６，９９８，２５９号明細書は、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）を抑制する組成物を調製する方法であって、

（ａ）イオン交換及びトリプシンにより製造されたホエータンパク質画分の水性溶液を調製すること；（ｂ）該溶液を、該ホエータンパク質画分を部分的に加水分解するのに有効な条件下に維持して、増加したＡＣＥ抑制活性を有する加水分解物を提供すること；（ｃ）加水分解度が５．５～６．５％の範囲内に達したときに該加水分解を止めること、ここで該加水分解物はＨＰＬＣにより測定されたときに特定の分子量プロファイルを有するペプチドの混合物を含む、を含む上記方法を開示する。米国特許第６，９９８，２５９号明細書において用いられた酵素は、トリプシンＶＩ、Ｐ　Ａｍａｎｏ　６及びＭｕｌｔｉｆｅｃｔ（非常に異なる特異性を有する）を含む。トリプシンは、Ａｒｇ及びＬｙｓの近傍のペプチド結合だけを開裂すると知られている一方で、他の２つの酵素ははるかにより広い特異性を有しそしてより多い数のより短いペプチドをもたらすであろう。

【００１９】

国際公開第０４／０９８３１０号パンフレットは、トリペプチドＶＰＰ、ＩＰＰ及び／又はＬＰＰを含む加水分解されたカゼイン産物の調製の方法を記載し、ここでカゼイン又はカゼイン断片を含む基質は、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓに由来する酵素にさらされる。好ましくは、該酵素は、４００Ｕ／ｋｇ以上のＸ－プロリルジペプチジルアミノペプチダーゼ活性を有する。

【００２０】

国際公開第２００６／０２５７３１号パンフレットは、ＡＣＥ抑制活性によりタンパク質加水分解物を酵素的に生産する方法であって、第１の反応工程における広域スペクトルのエンドプロテアーゼによるβ－ラクトグロブリン（ＢＬＧ）含有基質の処理、続く第２の反応工程におけるプロリン特異的エンドプロテアーゼによる処理により特徴付けられる上記方法を提供する。

【００２１】

国際公開第２００６／００５７５７号パンフレットは、タンパク質から産生されるＩＰＰ対ＶＰＰの重量比が少なくとも５：１、好ましくは少なくとも１０：１及びより好ましくは少なくとも２０：１であるところのタンパク質からのトリペプチドＩＰＰを含む組成物を生産する方法に関し、これは、プロリン特異的エンドプロテアーゼ活性又はプロリルオリゴペプチダーゼ活性を有する酵素活性及び－Ｉ－Ｐ－Ｐ－配列のアミノ末端側で該結合を加水分解することができる酵素活性の使用を含む。

【００２２】

国際公開第２００７／００４８７６号パンフレットは、乳タンパク質に由来するＡＣＥ－抑制ペプチドを製造する方法に関する。それは、逐次的な又は混合物として、酵素及び／又は微生物の組み合わせが、ＡＣＥ抑制活性を有するタンパク質加水分解物を提供する為に用いられうることを開示する。適当な酵素の長いリストが開示される。国際公開第２００７／００４８７６号パンフレットは、好ましくは第１のプロテアーゼが、ニュートラーゼ、プロテアーゼ　Ｐ６、プロテアーゼ　Ａ、Ｐｒｏｍｏｄ　２５Ｐ、Ｍｕｌｔｉｆｅｃ

ｔ Ｎｅｕｔｒａｌ及びＦｕｎｇａｌ Ｐｒｏｔｅａｓｅの群から選ばれること、及び、第２のプロテアーゼが好ましくはＦｌａｖｏｕｒｚｙｍｅ、Ｏｒｉｅｎｔａｓｅ ９ＯＮ又はＥｎｚｅｃｏ Ｆｕｎｇａｌ Ｐｒｏｔｅａｓｅであることを教示する。本発明において開示されるとおりの特定の酵素の組み合わせを用いる段階的加水分解を実施することの教示又は示唆しない。

【００２３】

国際公開第２００４／０５７９７６号パンフレットは、植物材料からの加水分解物を含むＡＣＥ抑制ペプチドを提供する方法を開示する。実施例９は、任意的にアルカラーゼ（Ａｌｃａｌｓｅ）との組み合わせにおける、サーモリシンの使用に関する。ホエータンパク質含有基質を、バクテリアの熱不安定性中性プロテアーゼ及びサーモリシンにより逐次的に処理することの開示はない。

【００２４】

Abubakarら（Tohoku Journal of Agricultural Research, Vol. 47, No. 1-2, 1996）は、７種の異なるプロテアーゼ（このうちサーモリシン）による、ホエータンパク質及びチーズホエーパウダーの１回処理を教示する。本明細書において開示されるように非常に強力なＡＣＥ抑制活性を有する加水分解物を提供する、ニュートラーゼ及びサーモリシンによる２段階処理を教示又は示唆しない。

【００２５】

すなわち、１以上の異なる酵素を用いる（乳）タンパク質の１段階又は多段階加水分解は知られているが、ＡＣＥ抑制ペプチドを放出する為の本明細書において開示されるとおりの特定の酵素の組み合わせによるホエータンパク質の処理は、以前に開示又は示唆されていない。

【００２６】

熱不安定性中性バクテリアプロテアーゼは当技術分野で知られている。熱不安定性により、当技術分野の当業者により認識されているだろうとおり、酵素が比較的穏やかな温度で不可逆的に不活性化しやすいことが意味される。Ｐ１＝Ｌｅｕ、Ｖａｌ又はＰｈｅとして定義される基質開裂特異性を有する酵素が用いられてよく、ここでＰ１は、切断されやすい結合のＮ末端側の残基である。適当な熱不安定性バクテリア中性プロテアーゼは、Ｂａｃｉｌｌｕｓ種、特にはＢａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ又はＢａｃｉｌｌｕｓ ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓから得られるものを包含する。特定の局面において、本発明の方法は、ＮｏｖｏＺｙｍｅｓにより商品名Ｎｅｕｔｒａｓｅ（Ｒ）下で販売される中性プロテアーゼ、特にはＮｅｕｔｒａｓｅ ０．５Ｌ、又は同様の特性を有する酵素の使用を含む。

【００２７】

サーモリシン（ＥＣ ３．４．２４．２７）は、バクテリアＢａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃｕｓから得られる熱安定性メタロプロテイナーゼであり、これはタンパク質中の疎水性アミノ酸、例えばＬｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ及びＰｈｅなど（Ｐ１’＝Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｖａｌ又はＰｈｅ）のＮ末端アミド結合を加水分解する。それは、約６５～７５℃に及ぶ、比較的高い最適温度を有する。特定の局面において、本発明は、Ｂ．ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ（Ｂ．ｔｈｅｒｍｏｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃｕｓ変異体Ｒｏｋｋｏ）により産生されるサーモリシン又は同様の特性を有するサーモリシンを用いて実施される。

【００２８】

当技術分野の当業者は、該酵素処理を実施するのに適当な条件を選択することができるであろう。熱不安定性中性プロテアーゼによる基質加水分解は典型的には、約３．５～約９．０のｐＨで、好ましくは約ｐＨ６．０～８．０で実施される。適当なインキュベーション温度は、約３０～６５℃、好ましくは約５０～６０℃である。

【００２９】

サーモリシンによるインキュベーションは、最大で約８０℃の温度で実施されうるが、最適な温度は６５～７０℃である。ｐＨは、約５～約９であってよく、最適ｐＨは７．０～

８．５である。サーモリシンは、カルシウムイオンにより保護され及びＥＤＴＡのようなキレート剤により抑制される。

【００３０】

本発明の方法において用いられる１又はそれより多い酵素は、不活性の支持体上に、例えばキトサン粒子上、カラギーナン粒子上、Ｅｕｐｅｒｇｉｔ上又は任意の他の適当な不活性支持体物質上などに固定化されうる。該酵素は、架橋により該支持体物質に付けられうる。

【００３１】

熱不安定性中性プロテアーゼによるホエータンパク質含有基質の処理は第１の加水分解物を結果し、これは好ましくは比較的低い加水分解度（ｄｅｇｒｅｅ ｏｆ ｈｙｄｒｏｌｙｓｉｓ：ＤＨ）を有し、すなわち、酵素の作用により開裂されたペプチド結合の百分率が好ましくは約１０％未満である。加水分解物のＤＨは、当技術分野で既知のやり方により測定されうる。好ましい局面において、中性プロテアーゼによる処理は、例えばニュートラーゼを用いて、実施されて、Ａｄｌｅｒ－Ｎｉｓｓｅｎの方法（Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. ISBN 0-85334-386-1, pg.115-124）により測定されたときに、約３～７％、例えば３～５％など、のＤＨを有する加水分解物を産出する。該方法は、以下の等式を用いる：$DH = B \times N_b \times 1 / \alpha \times 1 / MP \times 1 / H_{tot} \times 100\%$、ここで

Ｂ＝水酸化ナトリウム消費（ｍｌ）

Ｎｂ＝該水酸化ナトリウム溶液の規定度

α＝α－ＮＨ基の平均解離度

H_{tot}＝該タンパク質基質中のペプチド結合の合計数（ｍｅｑ／ｇタンパク質）

ＭＰ＝加水分解におけるタンパク質の質量（ｇ）

【００３２】

第１の反応段階において用いられる酵素は典型的には、第２の酵素に該第１の加水分解物が付される前に、とりわけ第１の酵素による第２の酵素の加水分解を回避する為に、不活性化される。第２の加水分解の完了の前に、第２の酵素（サモアーゼ）が不活性化されうる。不活性化は、可逆的又は不可逆的な不活性化を含みうる。酵素不活性化は、典型的には高温への短時間の曝露による、酵素の変性により容易に達成される。熱不活性化は例えば、約９５～１３０℃の温度で、数秒間～数分間、第１の酵素を含む第１の加水分解物を加熱することを含む。例えば、１２１度で約１０秒加熱するいわゆるＵＨＴ処理が用いられる。これは、微生物の制御も許す。もちろん、熱不安定性中性プロテアーゼの熱不活性化は、サーモリシンの熱不活性化と比較して、より低い温度を要求する。熱不安定性バクテリア中性プロテアーゼである第１の酵素の不活性化のために用いられうる適当な温度範囲は、約５５～７０℃程度、好ましくは約６５℃である。

【００３３】

代替的に、酵素は、該反応混合物からそれを簡単に除くことにより不活性化されうる。例えば、酵素が不活性支持体上に固定化されている場合、それはその後、第１の酵素活性の喪失を達成する為に、例えば膜ろ過により、第１の加水分解物から分離されうる。

【００３４】

また、加水分解が所望の水準に達すると、第１の酵素は、限外ろ過（ＵＦ）技術の使用により、好ましくは約１０～５００ｋＤａ、好ましくは約１０～２００ｋＤａの範囲の名目上の分画分子量（molecular weight cut-off）を有する限外ろ過膜を用いて、第１の加水分解物から分離されうる。

【００３５】

ホエータンパク質含有基質の任意のタイプが、出発物質として用いられうる。これらは、「ホエータンパク質分離物」（ＷＰＩ）又は「ホエータンパク質濃厚物」（ＷＰＣ）といわれる調製物を包含する。ＷＰＣは、典型的には、濃厚なホエーの限外ろ過により得られる。ホエーは、生産工程に入る乳の全体積の８０～９０％を構成し、及び、タンパク質、ラクトース、ビタミン及びミネラルなどの、最初の乳の栄養素の約５０％を含む。従来、

ホエーはチーズ産業の廃棄物と常に考えられてきたが、チーズホエーの排出は大きな環境問題を引き起こす。しかしながら、該タンパク質が良い機能的特性を有するので、現在は、それらの抽出のためのホエーの使用における関心が大きい。

【００３６】

一般的に言えば、ホエーの０．５５％だけがタンパク質からなる。乾燥物質に基づき、これは約１０％である。ホエータンパク質は均一な混合物であり、このうち主なタンパク質はβ－ラクトグロブリン（ＢＬＧ；約５５％）、α－ラクトグロブリン（ＡＬＡ；約１６％）、血清アルブミン（ＢＳＡ；約５％）及びイムノグロブリン（Ｉｇ；約１２％）である。ホエーの乾燥物質含有量を少なくとも約５０～６０％に増加することができるために、ホエーは濃厚にされ又は乾燥される。ホエータンパク質濃厚物（ＷＰＣ）は、限外ろ過によりホエーを分画し且つ濃厚にすることにより作られる。さらなる濃厚化が行われるにつれて、種々の水準のタンパク質がホエータンパク質濃厚物中に生じる。工業的に製造されたＷＰＣは、低タンパク質ＷＰＣ（タンパク質含有量２５～４０％）、中タンパク質ＷＰＣ（タンパク質含有量（４５～６０％）、及び高タンパク質ＷＰＣ（タンパク質含有量６８～８０％）のカテゴリーに分類される。

【００３７】

ホエータンパク質の完全スペクトルを含む通常のＷＰＣに加えて、１又はより多くの特定のホエータンパク質について富むＷＰＣ、例えばβ－ラクトグロブリン（ＢＬＧ）に富むＷＰＣ又はα－ラクトグロブリン（ＡＬＡ）に富むＷＰＣなどが用いられうる。１つの実施態様において、本発明の方法は、ＡＬＡに富むＷＰＣの段階的酵素的処理を含む。この製品は、通常のＷＰＣからＡＬＡの特定の沈殿後に得られる。遠心及び限外ろ過の後に、比較的高い水準のＡＬＡを有するＷＰＣが得られる。ＡＬＡに富むＷＰＣの例は、商品名Ｖｉｖｉｎａｌ　Ａｌｐｈａ（商標）下で販売される製品である。

【００３８】

β－ラクトグロブリン（ＢＬＧ）に富むホエータンパク質濃厚物は、本発明に従う方法において魅力的な出発物質である。この製品は、上記で記載されたようなＡＬＡに富むＷＰＣの製造の間に「副産物」として得られる。好ましくは、本発明に従う方法は、全タンパク質に基づき少なくとも２５重量％がＢＬＧであり、例えば３０重量％又は３５重量％がＢＬＧであり、好ましくは少なくとも４０重量％がＢＬＧであり、例えば４５重量％、５０重量％又は５５重量％がＢＬＧであり、より好ましくは少なくとも７０重量％がＢＬＧであり、例えば７５重量％又は９０重量％がＢＬＧである、タンパク質の混合物からなる基質について用いられる。また、（精製された）ＢＬＧが基質として用いられうる。しかしながら、より精製されたタンパク質基質が出発物質として用いられるにつれて、ＡＣＥ抑制加水分解物の製造コストがより高くなるであろうことは言うまでもない。

【００３９】

出発物質としての使用にとって適当な市販のＷＰＣは、Ｈｉｐｒｏｔａｌ　８７５；Ｈｉｐｒｏｔａｌ　８８０、Ｈｉｐｒｏｔａｌ　５３５及びＨｉｐｒｏｔａｌ　５８０を包含し、全てＦｒｉｅｓｌａｎｄ　Ｆｏｏｄｓ　Ｄｏｍｏ、ズウォレ、オランダ、から入手可能である。

【００４０】

ホエータンパク質含有基質が第１の酵素又は第２の酵素とインキュベートされるタンパク質濃度は、とりわけ用いられる酵素の種類及び量に依存して、変わりうる。タンパク質濃度は、第１及び第２のインキュベーション混合物について同じであってよく又は異なってよい。例えば、第１の加水分解物は、１００ｍｌ当たり約１～約５０ｍｇ、好ましくは約５～１５ｍｇ／ｍｌ、例えば１０ｍｇ／ｍｌなど、のタンパク質濃度で調製される。得られた第１の加水分解物は、それ自体として（すなわち同じタンパク質濃度で）第２の酵素により処理されてよく、又は、それは次に、第２の酵素にそれを接触させるのに先立ち、水又は任意の他の適当な水性の液体を用いて、例えば２倍～１０倍に、希釈されてよい。

【００４１】

特定の局面において、第１の加水分解物は、ニュートラーゼを用いる約１０ｇ／１００ｍ

ｌでホエータンパク質を含む溶液の処理、続くサーモリシンによる処理に先立つ約３～４ｇ／１００ｍｌへの希釈により調製される。

【００４２】

さらなる局面において、本発明は、本明細書上記で記載された方法により得られる、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）抑制活性を有するタンパク質加水分解物を提供する。この加水分解物は、強力なＡＣＥ抑制活性により特徴付けられ（以下の表１及び２を参照されたい）、そして、それ故に、哺乳類、例えばヒトなどにおいてＡＣＥ活性を抑制するために有利に用いられうる。加水分解物はまた、例えばネコ又はイヌにおける、獣医学の適用にとっても適当である。ＡＣＥの抑制はｉｎ　ｖｉｖｏでの抗高血圧効果を有するので、ＡＣＥ抑制加水分解物は、高血圧の処置のために用いられうる。

【００４３】

本発明に従う加水分解物は、種々の製品、例えば液体製品及び乾燥製品などへと加工されうる。もし望まれるならば、下流の処理が、例えば限外ろ過（ＵＦ）処理の形で、行われる。酵素は、ペプチドよりも非常に大きな分子量を有し、及び、ＵＦによりＡＣＥ抑制ペプチドから分離されうる。ＵＦ工程の追加の利点は、酵素により減成されていないタンパク質基質が、生物学的に活性な加水分解物から分離されることもできることである。

【００４４】

本発明に従うホエータンパク質を、個々のペプチド（ホエータンパク質断片）が分離される精製手順に付することにより入手可能な、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）抑制活性を有するホエー由来ペプチドも提供される。適当な方法は当技術分野で知られており、そして、典型的には、１以上の段階の逆相（ＲＰ－）ＨＰＬＣを含む。分離されたペプチドの構造は、種々の分析技術、例えばＮＭＲ又はマススペクトロメトリー（ＭＳ）などを用いて解明されうる。それ故に、本発明は、ホエータンパク質含有基質をバクテリア熱不安定性中性プロテアーゼにより処理して第１の加水分解物を製造すること、該第１の加水分解物をサーモリシンにより処理して本明細書上記に記載されたとおりの第２の加水分解物を製造することを含み、及び、該第２の分解物を１以上のペプチドを含む個々の画分に分画する工程及びＡＣＥ抑制活性を有する少なくとも１つのペプチドのアミノ酸配列を同定する工程をさらに含む方法により得られる、ＡＣＥ抑制活性を有するペプチドにも関する。

【００４５】

以下の実施例において例示されるように、いくつかのＡＣＥ抑制ペプチド画分が、本発明に従う段階的酵素処理に従い得られうる。１つの実施態様において、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＡＣＥアッセイにおいて３０％以上抑制することができる１以上のホエー由来ペプチドを含む画分が提供される。好ましくは、画分は、少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも５０％、最も好ましくは少なくとも６０％の抑制を示す。

【００４６】

抑制画分のいくつかに存在するペプチドの分析は、少なくとも以下のアミノ酸配列（全て標準的な１文字コードにより示される）の同定を明らかにした：

VAGTWYS, VAGTWYSL, WYSL,
IAEKTKIPAV, AASDISL, VAGTW, ASDISL, VYVEE, LKALPM, LIVTQT,
IIVTQT, DAQSAPL, VLDTDY, LVLDTDYKKY, DTDYKKY 及び LKPTPEG

【００４７】

それ故に、本発明は、

VAGTWYS, VAGTWYSL, WYSL,
IAEKTKIPAV, AASDISL, VAGTW, ASDISL, VYVEE, LKALPM, LIVTQT,
IIVTQT, DAQSAPL, VLDTDY, LVLDTDYKKY, DTDYKKY 及び LKPTPEG,

並びに、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＡＣＥ抑制活性を示すそれらの機能的ペプチド類似体からなる群から選ばれる、精製された、合成の又は分離されたペプチドを提供する。

【００４８】

好ましい実施態様において、

VAGTWYS, VAGTWYSL, WYSL, IAEKTKIPAV, AASDISL, VAGTW, ASDISL, VYVEE, LKALPM, LIVTQT, IIVTQT, DAQSAPL, VLDTDY, LVLDTDYKKY, DTDYKKY, LKPTPEG

及びｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＡＣＥ抑制活性を示すそれらの機能的ペプチド類似体からなる群から選ばれるペプチドが提供される。特定の局面において、該ペプチドは、

WYSL, IAEKTKIPAV, AASDISL, ASDISL, VYVEE, LKALPM, LIVTQT, IIVTQT, DAQSAPL, LKPTPEG,

及び、ｉｎ　ｖｉｔｒｏＡＣＥ抑制活性を示すそれらの機能的ペプチド類似体からなる群から選ばれる。

【００４９】

本明細書において用いられるときに、「精製された、合成の又は分離された」ペプチドは、天然の源から又は生物工学的な源から精製されたものであり、又はより好ましくは本明細書において記載されたとおりに合成される。

【００５０】

本明細書において用いられるときに、ペプチドの「機能的類似体」は好ましくは、それが由来するペプチドと同じサイズを有し、すなわち、アミノ酸の欠失又は追加よりもむしろアミノ酸置換及び／又は修飾により作られる。また、本明細書において用いられるときに、ペプチドの「機能的類似体」は、１つの側又は両側でより多くのアミノ酸により隣接されるＡＣＥ抑制ペプチドとして同定されたアミノ酸配列を含むだけのより大きなタンパク質又はペプチドを言わない。

【００５１】

例えば、ペプチド類似体は、１つの実施態様において、ＮＴ－ＶＡＧＴＷＹＳ－ＣＴであってよく、ここでＮ末端でのＮＴは、Ｈ－－、CH_3－－、アシル基、又は一般的な保護基の群から選ばれ；及び／又はＣ末端でのＣＴは、－－ＯＨ、－－OR^1、－－NH_2、－－NHR^1、－－NR^1R^2、又は－－$N(CH_2)_{1-6}NR^1R^2$の群から選ばれ、ここでR^1及びR^2は、存在する場合、Ｈ、アルキル、アリール、アルキル（アラルキル）から独立に選ばれ、且つR^1及びR^2は互いに環式に結合されてよい。

【００５２】

ペプチド類似体は、上記で開示された特定のアミノ酸配列と同じ又は等価な側鎖を有する等価化合物も包含し、及び該ペプチドと同じ順序で逐次的に配列されるが、非ペプチド結合、例えばアイソスターの結合により、例えばケトアイソスター、ヒドロキシアイソスター、ジケトアイソスター、又はケトジフルオロメチレンアイソスターなど、により一緒に結合されない。

【００５３】

許容できる塩の形にあるペプチドも提供される。本明細書において用いられるときに、「許容できる塩」は、ペプチド又は等価化合物の所望の活性を維持するが好ましくは該ペプチドを用いる系の該ペプチド又は他の成分の活性に悪影響を及ぼさない塩をいう。そのような塩の例は、無機酸、例えば塩化水素酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸及び同様物などにより形成された酸付加塩である。塩は、有機酸、例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パモン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、及び同様物などによっても形成されうる。塩は、多価金属カチオン、例えば亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル及び同様物などにより形

成されてよく、又は、Ｎ，Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミン又はエチレンジアミンから形成される有機的カチオンにより形成されてよく、又はそれらの組み合わせ（例えば、タンニン酸亜鉛塩）でありうる。

【００５４】

本発明に従うペプチド又は類似体は、そのような化合物にとって慣用的な様式で調製されうる。そのために、適当に、Ｎα保護された（及びもし反応性側鎖が存在するならば側鎖保護された）アミノ酸類似体又はペプチドが活性化され及び、溶液中又は固体支持体上のいずれかにおいて適当にカルボキシル保護されたアミノ酸又はペプチド誘導体に結合される。αアミノ官能基の保護は一般に、ウレタン官能基、例えば酸不安定性ターシャリー－ブチルオキシカルボニル基（「Ｂｏｃ」）、ベンジルオキシカルボニル（「Ｚ」）基及び置換された類似体又は塩基不安定性９－フルオレミル－メチルオキシカルボニル（「Ｆｍｏｃ」）などにより行われる。該Ｚ基は、触媒的水素化によって除去されうる。他の適当な保護基は、Ｎｐｓ、Ｂｍｖ、Ｂｐｏｃ、Ａｌｏｃ、ＭＳＣ等を包含する。アミノ保護基のよい概説が、The peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, E. Gross and J. Meienhofer, eds. (Academic Press, New York, 1981)において与えられる。カルボキシル基の保護は、エステル形成により行われてよく、例えば、メチル又はエチルのような塩基不安定性エステル、ターシャリーブチルのような酸不安定性エステル、若しくは、置換された、ベンジルエステルにより行われてよく又は水素化分解的に行われてよい。側鎖官能基、例えばリシン及びグルタミン酸又はアスパラギン酸のそれらなどの保護は、上述された基を用いて行われうる。チオールの保護、及び常に要求されないが、グアニジノ基、アルコール基及びイミダゾール基の保護は、種々の試薬、例えばThe Peptides, Analysis, Synthesis, Biology,（同上）又はPure and Applied Chemistry, 59(3), 331-344 (1987)において記載されたそれらなどを用いて行われうる。適当に保護されたアミノ酸又はペプチドのカルボキシル基の活性化は、アジド、混合無水物、活性エステル、又はカルボジイミド方法、特には１－Ｎ－Ｎ－ヒドロキシベンゾトリアゾール、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、３－ヒドロキシ－４－オキソ－３，４－ジヒドロ－１，２，３，－ベンゾトリアジン、Ｎ－ヒドロキシ－５　ノルボルネン－２，３－ジカルボキシイミドのような触媒的かつラセミ化抑制化合物の添加を伴う、により行われうる。また、リンに基づく酸の無水物が用いられうる。例えば、The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology,（上記参照）及びPure and Applied Chemistry, 59(3), 331-344(1987)を参照されたい。Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄの固相方法により該化合物を調製することも可能である。種々の固体支持体及び種々の戦略が知られており、例えば、The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol.2, E. Gross and J. Meienhofer, eds. (Acad. Press, New York, 1980)におけるBarany及びMerrifield；Kneib-Cordonier and Mullen, Int. J. Peptide Protein Res., 30, 705-739(1987)並びに、Fields and Noble, Int. J. Peptide Protein Res., 35, 161-214(1990)、を参照されたい。ペプチド結合がアイソスターにより置き換えられる化合物の合成は、一般に、前に記載された保護基及び活性化手順を用いて実施されうる。該修正されたアイソスターを合成する為の手順は、該文献において、例えば－－ＣＨ$_2$－－ＮＨ－－アイソスター及び－－ＣＯ－－ＣＨ$_2$－－アイソスターについて記載されている。

【００５５】

保護基の除去及び、固相ペプチド合成の場合、固体支持体からの開裂は、それらの保護基の性質及び該固体支持体へのリンカーの種類に依存して、種々の方法で行われることができる。通常は、脱保護は、酸性条件下で及びスカベンジャーの存在下で行われる。例えば、The Peptides Analysis, Synthesis, Biology（上記参照）のシリーズの第３、５及び９巻を参照されたい。

【００５６】

他の可能性は、そのような化合物の合成における酵素の適用である；概説のために、例えば、The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 9, S. Udenfriend and J. Meienhofer, eds. (Acad. Press, New York, 1987)におけるH.D. Jakubk

eを参照されたい。

【００５７】

経済的な観点から望ましくないかもしれないが、本発明に従うＡＣＥ抑制ペプチドは、組み換えＤＮＡ方法に従い作成されることもできるだろう。そのような方法は、宿主として適当な微生物において問題のペプチドの１以上をコードする組み換えポリヌクレオチド配列を発現することによるそれらの所望のペプチドの調製を含む。一般に、該方法は、クローニングビヒクル（例えばプラスミド、ファージＤＮＡ、又は宿主細胞において複製することができる他のＤＮＡ配列）へ、特定のペプチドをコードするＤＮＡ配列を導入すること、適当な真核宿主細胞又は原核宿主細胞への該クローニングビヒクルを導入すること、及び、このように形質転換された該宿主細胞を培養することを含む。真核宿主細胞が用いられるとき、該化合物はグリコプロテイン部分を含みうる。

【００５８】

本明細書で用いられるときに、ペプチドの「機能的類似体」は、配列の機能的特性が種類において本質的に同じである（量においては必ずしも同じでない）ように改変されたアミノ酸配列、又は他の配列モノマー、を含む。例えば、類似体は、Ｌ－アミノ酸残基のＤ－アミノ酸残基による置換により産生されうる。自然界において天然に生じないペプチドをもたらすこの置換は、アミノ酸配列の特性を改善しうる。例えば、レトロ反転形式（retro inversion format）で全てのＤ－アミノ酸の既知の活性のペプチド配列を提供することが有用であり、それにより維持された活性及び増加した半減期値を許す。元のアミノ酸配列の多くの位置的変異体を産生し及び特定の活性についてスクリーニングすることにより、そのようなＤ－アミノ酸を含む改善されたペプチド誘導体が、さらに改善された特徴を目指して設計されうる。１又は両方の末端でＤ－アミノ酸により保護されたペプチドは、Ｌ－アミノ酸だけからなるものよりも安定であることが分かったことが、当技術分野で示されている。他の種類の修飾は、栄養組成物又は医薬組成物におけるペプチドの使用についての有益な効果を有する為のペプチド薬開発の分野において既知のものを含む。これらの効果は、改善された有効性、変化した薬物動態、より長い貯蔵寿命を結果する安定性の増加及びより厳格でないコールドチェーンの取扱い要求を含みうる。

【００５９】

ペプチド又はその機能的類似体の機能性は、ｉｎ ｖｉｖｏ及び／又はｉｎ ｖｉｔｒｏでの試験を用いて決定されうる。ＡＣＥ抑制活性のｉｎ ｖｉｔｒｏでの試験が好ましい。１つの実施態様において、候補ペプチド類似体は、参照ペプチド又は対照ペプチド、例えばＬ－アミノ酸だけからなるペプチド類似体などを用いた比較試験に付される。適当な試験は、市販入手可能なＡＣＥによりヒプリル－Ｈｉｓ－Ｌｅｕの加水分解を抑制する候補ペプチドの能力を決定することを含む。

【００６０】

経口摂取後、本発明に従う加水分解物中に存在するペプチドは、無傷で又は実質的に無傷の形で腸管に行って、その後血流中に摂取されることが仮定されうる。任意的に、本発明に従う加水分解物又はペプチドは、１以上の他のＡＣＥインヒビターと一緒に用いられうる。本発明のさらなる局面において、該ＡＣＥ抑制加水分解物又は分離されたペプチドは、例えば高血圧の遺伝的傾向を有するヒトにおいて又は副作用として高血圧を引き起こす医薬が用いられるならば、高血圧を防ぐ為に予防的に用いられる。

【００６１】

高血圧に有効であることに加えて、ＡＣＥインヒビターは、心不全に有効であることも分かる。本発明に従う方法により得られるＡＣＥ抑制加水分解物、又は分離されたペプチド（類似体）は、それ故に、例えば冠動脈の後に再発を防ぐ為の、心臓障害に対しても用いられうる。

【００６２】

本発明は、任意的に１以上の追加の有益な栄養的又は治療的成分と一緒に、本発明に従うＡＣＥ抑制加水分解物及び／又はペプチドと適当なキャリアとを含む組成物も提供する。ＡＣＥ抑制／抗高血圧活性を有するそのような組成物は、例えば、医薬組成物又は食品若

しくは嗜好食品である。ＡＣＥ抑制組成物は、固体の又は液体の形態を有しうる。それは例えば粉又は錠剤である。好ましくは、本発明に従うＡＣＥ抑制組成物は液体の形態、例えば液体の乳製品、果物ジュース又は、とりわけ高血圧を予防し又は処置する為に用いられうる飲用製品の他のタイプなど、を有する。すなわち、本発明は、哺乳類においてＡＣＥ活性を抑制するための処置方法であって、本発明の方法により得られるＡＣＥ抑制加水分解物、ペプチド、ペプチド類似体、又は、任意の組み合わせでそれらのいずれか１つを含む組成物の、ＡＣＥ活性を抑制する為に十分であり又は増加したＡＣＥ活性に関連する１以上の症状を少なくとも軽減する量及び頻度での投与、好ましくは経口投与を含む上記方法も提供する。

【００６３】

本発明のさらなる他の局面は、哺乳類における高血圧の症状を減少する処置方法であって、本発明に従う加水分解物又は組成物の、高血圧の症状を抑制するのに十分な量及び頻度での投与、好ましくは経口投与を含む上記方法に関する。

【００６４】

最後に、本発明は、心臓及び血管の疾患を（予防的に）処置し又は防ぐ医薬の調製の為に、本発明に従う加水分解物及び／又はペプチド（類似体）を使用する方法に関する。特に、調製されるべき医薬は、哺乳類（例えばヒト又はペット）におけるＡＣＥ活性を抑制する為の医薬；血圧を低下させる為の医薬；及び／又は高血圧の発生を防ぐ為の（予防的）医薬である。

【００６５】

実験の部

【実施例１】

【００６６】

実施例１：ＡＣＥ抑制のｉｎ　ｖｉｔｒｏ測定

【００６７】

加水分解物のＡＣＥ抑制活性のｉｎ　ｖｉｔｒｏ測定が以下のとおりに実施された：

・ＡＣＥ活性の測定のために用いられた基質は、Ｓｉｇｍａ社からのヒプリル－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ（Ｈ－１６３５）である

・この製品（約４０ｍｇ）が、ｐＨ８．３で、０．１Ｍのボレート、０．３Ｍの塩化ナトリウムからなる１４ｍｌのアッセイバッファー中に溶解される

・最終アッセイ混合物は、２００μｌの基質溶液及び８００μｌのアッセイバッファーからなる。

【００６８】

アッセイは、３７℃で、Ｃａｒｒｙ　１００（Ｖａｒｉａｎ）分光光度計において実施される。インキュベーションの開始で、２０μｌのＡＣＥ（１Ｕ／ｍｌ；シグマ社）が添加される。ＡＣＥ酵素活性が２６０ｎｍの波長で監視される。得られたＡＣＥ活性は、インキュベーションの２～１１分の間で計算された。ＡＣＥ活性が、分インキュベーション当たりのＥ２６０ｎｍの増加として定義される。

【００６９】

ホエー加水分解物の該抑制効果の測定のために、バッファー体積の一部が、加水分解物の溶液により置き換えられる。

【００７０】

試験されるべき加水分解物の存在下において、この活性の抑制は、該酵素の活性を５０％だけ減少するのに必要とされる、産物の要求される量として測定され且つ表現される。この抑制は、測定されるべき産物の４つの異なる濃度について決定される。

【実施例２】

【００７１】

実施例２：ホエータンパク質含有基質

【００７２】

他に示されない限り、ホエータンパク質含有基質Ｈｉｐｒｏｔａｌ　５３５（Ｆｒｉｅｓ

ｌａｎｄ　Ｆｏｏｄｓ　Ｄｏｍｏ）が出発物質として用いられた。これは、β－ラクトグロブリンに富むホエータンパク質濃厚物である。それは、５６％のラクトース、３５％のタンパク質、３％のミネラル、２％の有機的ミルクソルト（organic milk salt）、０．５％の脂質及び３．５％の水分を含む。

【００７３】

ＲＰ－ＨＰＬＣによる該タンパク質の特徴付けは、以下の組成を明らかにした：

α－ラクトアルブミン	(RP-HPLC)	<0.01%
β－ラクトグロブリン	(RP-HPLC)	27.21%
カゼイノマクロペプチド	(RP-HPLC)	5.95% (主に CMP-A)
タンパク質	(Lowry)	32.7%

【実施例３】

【００７４】

実施例３：第１の加水分解物の調製

【００７５】

Ｈｉｐｒｏｔａｌ　５３５からのＡＣＥ抑制ペプチドの遊離のために、第１の加水分解物が、Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓから購入されたニュートラーゼ０．５Ｌとのインキュベーションで調製された。ニュートラーゼインキュベーションについての最適な条件は５０℃及びｐＨ＝７．０である。第１の実験の目的は、ニュートラーゼにより触媒される加水分解の動力学を決定することであった。この実験において、１０ｇのタンパク質（２８．６ｇ産物）が、１００ｍｌの水の最終体積中に溶解された。全部の溶液が、ｐＨ－Ｓｔａｔの滴定スタンド中に置かれた。該溶液の出発ｐＨは、おおよそｐＨ＝６．４５であった。５０℃の温度への平衡後、予備滴定が、所望のｐＨ＝７．０が達成されるまで、該ｐＨ－Ｓｔａｔにより実施された。その点で、１００μｌのニュートラーゼが該溶液に添加され、そして、インキュベーションが開始された。該滴定装置は反応のｐＨを連続的に監視した。ｐＨは、水酸化ナトリウムの制御された添加により、予め設定された値で維持される。タンパク質加水分解物の加水分解度（ＤＨ）は、塩基の消費から直接的にに計算されることができる（Adler-Nissen, Jens; Enzymic hydrolysis of food proteins; ISBN 0-85334-386-1; blz 115-124）。

【００７６】

用いられる等式は：

$$DH = B \times N_b \times 1 / \alpha \times 1 / MP \times 1 / H_{tot} \times 100\%$$

であり、ここで、

Ｂ＝水酸化ナトリウム消費（ｍｌ）

N_b＝水酸化ナトリウム溶液の規定度

α＝αＮＨ基の平均解離度

H_{tot}＝タンパク質基質中のペプチド結合の合計数（ｍｅｑ／ｇタンパク質）

ＭＰ＝加水分解におけるタンパク質の質量（ｇ）

【００７７】

ＤＨの決定の為に、８．８の値がＭＰについて用いられた。１／αの値は、インキュベーションの間に適用された温度及び実際のｐＨに依存した。ｐＨ＝８、５０℃について、１／αは１．１３であり、ｐＨ＝７、５０℃について、１／αは２．２７であった。

【００７８】

ニュートラーゼによるＨｉｐｒｏｔａｌ　５３５の典型的な加水分解パターンが図１に表される。インキュベーションの最初の数分において、加水分解は、比較的高い速度で進んでいる。或る時に、速度はかなりゆっくりになっている。利用可能なペプチド結合の約５％が加水分解されたときに、得られた酵素活性は再度増加する。理論にとらわれることを望まないで、インキュベーションの開始の間に、基質のコンフォメーションが酵素を抑制していることが考えられる。或る時（ＤＨ＝５％）に、基質のコンフォメーションが変化

し、そして、タンパク質分解攻撃にとってそれをより脆弱にする。

【００７９】

時間に応じた加水分解度の実験データ

ニュートラーゼインキュベーションについて (E/S= 1:100):		E/S= 1:50 について
	%DH	**%DH**
t=0 h	0	0
t=1,4h	1,29	3,51
t=2,8h	2,84	6,34
t=4,2h	3,61	7,98
t=5,6h	4,39	9,45
t=6,8h	4,90	10,91
t=17h	18,3	

【００８０】

第１の加水分解物における加水分解の延長の効果を決定する為に、夫々異なる加水分解度を有する、３つの異なる試料が調製された（Ａ＝５．０％、Ｂ＝１０．６％及びＣ＝１８．３％）。得られた加水分解物のＲＰ－ＨＰＬＣは、酵素ニュートラーゼによるタンパク質の分解は、比較的ゆっくりだが制御可能な反応速度で進んでいることを示した。

【実施例４】

【００８１】

実施例４：第２の加水分解物の調製

【００８２】

得られた第１の加水分解物は、１０ｇ／１００ｍｌのペプチド／タンパク質濃度を有した。第２の酵素サーモリシンによるインキュベーションに先立ち、第１の加水分解物が、１０ｇタンパク質／２５０ｍｌの最終濃度へと水により希釈された。用いられたサーモリシンは、Ａｍａｎｏから購入されたサモアーゼ　ＰＣ１０Ｆであった。

【００８３】

サモアーゼ　ＰＣ１０Ｆインキュベーションのために用いられた条件は、ｐＨ＝８．０及び５０℃であった。第２の加水分解を開始する為に、１００ｍｌの第１の加水分解物が、ｐＨ－Ｓｔａｔ装置に置かれた。予備滴定により、溶液のｐＨが、ｐＨ＝８．０に調節された。インキュベーションは、サーモリシン酵素の既知の量の添加により開始された。典型的には、１／１００又は１／５０の酵素対基質（Ｅ／Ｓ）比が用いられた。酵素サモアーゼによる第１の加水分解物の典型的な加水分解パターンが図２に示され、サモアーゼによる第１の加水分解物の加水分解が、比較的高い速度で進んでいることを示す。さらに、サモアーゼによる延長されたインキュベーション後、高い加水分解度が得られることができたことが結論付けられうる。

【００８４】

夫々異なる加水分解度を有するいくつかの第２の加水分解物が調製された。そのために、アリコートが、サモアーゼによるインキュベーションの６０、１２０及び１８０分の後に、第２の加水分解物から採られた。

【００８５】

該試料は、水により、１０ｍｇ／ｍｌのタンパク質／ペプチド最終濃度へと希釈された。酵素は、水浴（９５℃）中で５分間、希釈された加水分解物を置くことにより、失活された。

【００８６】

対照として、第２の加水分解物は、第２の酵素として、酵素Ｐｒｏｔｅａｓｅ　Ａによっても調製された。この酵素は、Ｐ１位で、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ又はＶａｌについての特異性を有する。試料は、ＡＣＥ抑制活性の決定まで、冷蔵庫で保存された。ＡＣＥ抑制活性は、上記で記載されたＨｉｐ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕアッセイにより分析された。表１は、２０μｇ／ｍｌの加水分解物のインヒビター（ペプチド）濃度で得られた百分率ＡＣＥ抑制を示す。

【００８７】

表１：第２のホエータンパク質加水分解物によるＡＣＥ抑制

第１の加水分解物	第２の加水分解物	% ACE 抑制 (I=20μg/ml) t=60 '	t=120'	t=180'
A ニュートラーゼ DH=5,0%	サモアーゼ (1/100)	31	46	54
B ニュートラーゼ DH=10,6%	サモアーゼ (1/100)	30	38	40
B ニュートラーゼ DH=10,6%	プロテアーゼ A (1/100)	17	25	20
C ニュートラーゼ DH=18,3%	サモアーゼ (1/100)	17	26	32
C ニュートラーゼ DH=18,3%	プロテアーゼ A (1/100)	24	33	29
D アルカラーゼ DH=12,2%	サモアーゼ (1/100	37	32	30

【００８８】
表１は、サモアーゼによる第１の加水分解物のインキュベーションが、少なくとも３時間のインキュベーションまで増加するＡＣＥ抑制活性の放出を結果することを示す。最大の効果は、第１の加水分解物Ａ（ニュートラーゼ　ＤＨ＝５．０％）により見られた。
【００８９】
対照的に、第２の加水分解物を製造する為にサーモリシンの代わりに菌のＰｒｏｔｅａｓｅ　Ａ（メタルプロテイナーゼ；ＥＣ　３．４．２４．３９）による同じ第１の加水分解物の処理は、ＡＣＥ抑制ペプチドの放出に関してほとんど何も改善を結果しなかった。
【００９０】
さらなる比較の例として、第１の加水分解物が、アルカラーゼ（広い範囲のタンパク質分解酵素）により調製された。サモアーゼによるこの第１の加水分解物の処理後、得られたＡＣＥ抑制活性について、改善はほとんど何も見られなかった（表１、試料Ｄ）。
【００９１】
表１の結果に基づき、ＡＣＥ抑制ペプチドの産生は、サモアーゼによる延長されたインキュベーションのときに、さらにさえ継続するだろうことについて仮説が立てられた。この仮説を試験する為に、追加の加水分解物が、２３時間のインキュベーション時間により調製された。この加水分解物におけるＡＣＥ抑制活性はさらにより強力であった。
【００９２】
次の実験において、多くの第２の加水分解物からのＩＣ５０値が決定された。ニュートラーゼを用いることによりＢＬＧに富むホエータンパク質を処理することによって得られた第１の加水分解物（最終ＤＨは５．０又は１０．６％）が、次に、示された時間（１、３又は２３時間）、示されたＥ／Ｓ比でサモアーゼと接触された。ＩＣ５０値が、上記で記載されたアッセイを用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏで決定された。結果は表２に示される。１２及び２３時間のインキュベーションの間で、実質的に変化がないこと、及び、約２３μｇ／ｍｌのＩＣ５０が、サモアーゼによる１２時間の処理後に得られることを、さらなる試験は明らかにした。
【００９３】
表２：本発明の酵素の組み合わせを用いて調製された加水分解物のＡＣＥ抑制活性（ＩＣ５０として表される）

第１の加水分解物		第２の加水分解物		Ic50(μg/ml)
A	ニュートラーゼ DH 5.0%	サモアーゼ (1/100)	1時間	42
A		サモアーゼ (1/100)	3時間	31
A		サモアーゼ (1/50	23時間	23
B	ニュートラーゼ DH=10.6%	サモアーゼ (1/100)	3時間	54

【００９４】
この結果は、同様の基質を用いたが、アルカラーゼ／ＥｎｄｏＰｒｏの酵素の組み合わせを用いて得られた第２の加水分解物の、以前に報告されたＩＣ５０値（ＩＣ５０＝２７μ

ｇ／ｍｌ；国際公開第２００６／０２５７３１号パンフレットを参照されたい）よりもよい。

【００９５】

ホエー由来加水分解物のＡＣＥ抑制活性をさらにさえ改善する為に、３．０％又は７．０％のＤＨを有する第１の加水分解物から第２の加水分解物を調製することが決定された。サーモリシンによる第１の加水分解物の延長されたインキュベーション（サモアーゼ；２３時間、Ｅ／Ｓ＝１／５０）後、ＩＣ５０値が決定された。

【００９６】

第１の加水分解物が３％のＤＨを有したとき、得られたＩＣ５０値は約２３μｇ／ｍｌであり、すなわちＤＨ＝５．０％について見られたものとちょうど同じであった。対照的に、第１の加水分解物が７％のＤＨを有したとき、得られたＩＣ５０値はいくぶんより高く、約２７μｇ／ｍｌであった。すなわち、第１の酵素としてニュートラーゼを用いた最適の結果について、第１の加水分解物の加水分解度は、約５％の最大の値を有すると分かる。

【００９７】

ホエータンパク質ＢＬＧ、ＡＬＡ、ＣＭＰ、ＩｇＧ及びＢＳＡを含む一般的なＷＰＣ（Ｈｉｐｒｏｔａｌ　８７５）が、上記で記載されたのと同じ条件を用いて本発明の方法においてホエー含有基質として用いられたときに、１６μｇ／ｍｌの最終ＩＣ５０値が達せられた。

【実施例５】

【００９８】

実施例５：ＡＣＥ抑制ペプチドの分離及び同定

【００９９】

例４からの第２の加水分解物の一部が、最後のプロテアーゼ処理後に、製造されそして乾燥された。ペプチドの分離のために、乾燥した加水分解物が、ホスフェート－生理食塩水バッファー（５０ｍＭ、ｐＨ＝６．０、０．１５Ｍ塩化ナトリウム）中に、２０ｍｇ／ｍｌの最終タンパク質／ペプチド濃度で溶解された。該加水分解物は、溶液からの全ての粒子を除去する為に、溶解後に遠心された。

【０１００】

５ｍｌのこの溶液が、ゲルろ過カラム（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　３０－ＰＧ、１６／６０）に施与され、そして次に、ホスフェート－生理食塩水バッファー（５０ｍＭ、ｐＨ＝６．０、０．１５Ｍ塩化ナトリウム）により１ｍｌ／分の流速で溶出された。８つの２０ｍｌ画分が集められそして、それらのＡＣＥ抑制活性について分析された。さらに、それぞれのｓｕｐｅｒｄｅｘ画分のペプチドプロファイルがＲＰ－ＨＰＬＣにより決定された。

【０１０１】

表３：Ｓｕｐｅｒｄｅｘ画分のＡＣＥ抑制活性；１００μｌの得られた画分が、抑制アッセイにおいて含まれた

画分	% ACE 抑制
X-1	0
X-2	0
X-3	22
X-4	55
X-5	70
X-6	60
X-7	30
X-8	0

【０１０２】

最も高いＡＣＥ抑制活性が、画分Ｘ５において及び画分Ｘ６において見られた。ＲＰ－Ｈ

ＰＬＣから、画分Ｘ－６はほとんど純粋なペプチドであることが明らかであった（ＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムにおいて１つのピーク）。このピークの正体が、ＬＣ－ＭＣＭＳにより決定され、そして、ペプチド　ＶＡＧＴＷＹＳＬ及びＶＡＧＴＷＹＳを含むことが分かった。

【０１０３】

画分Ｘ－５は、ＲＰ－ＨＰＬＣによりさらに精製された。画分Ｘ－５のｐＨが、ギ酸の添加により低められた。約１０ｍｌが、調製用の（preparative）逆相カラム（Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　ＲＰＣ－３ｍｌ）に施与された。該カラムをバッファーによりリンスした後、吸着したペプチドはその後、ＲＰ－カラムから、ホスフェート－生理食塩水バッファー（５０ｍＭ、ｐＨ＝６．０、０．１５Ｍ塩化ナトリウム）中のアセトニトリル勾配により、選択的に溶出された。該溶出されたペプチドは、画分（サイズ　１ｍｌ）に集められた。次の分析の為に十分な量のペプチドを得る為に、この手順が５回繰り返された。

【０１０４】

乾燥及び次のＡＣＥ抑制バッファー中への該ペプチドの溶解の後、これらの画分のＡＣＥ抑制活性が決定された。さらに、該画分の主なペプチド構成成分が、ＬＣ－ＭＳＭＳ又はＭＡＬＤＩ－ＴＯＦにより同定された。

【０１０５】

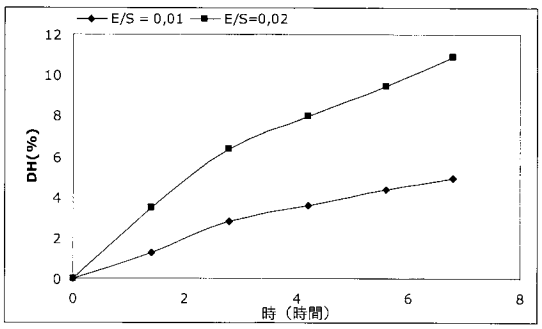
画分Ｘ－５に存在する主なペプチドは、

WYSL, IAEKTKIPAV, AASDISL, VAGTW, ASDISL, VYVEE, LKALPM, LIVTQT, IIVTQT, DAQSAPL, VLDTDY, LVLDTDYKKY, DTDYKKY及び LKPTPEG.

であると分かった。

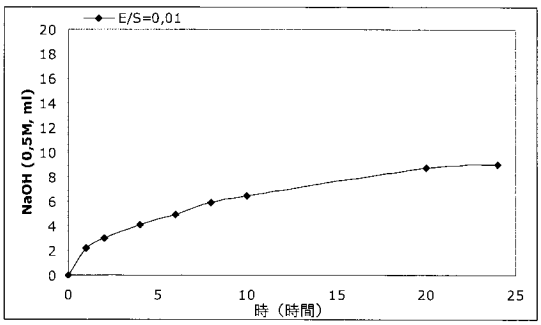
【図１】

図１：



【図２】

図２：



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2008/050131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K5/117 C07K7/00 C12P21/06 A23L1/305 A23J3/34
A61K38/01 A61K38/02 A61K38/04

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)
C07K C12P A23L A23J A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HERNÁNDEZ-LEDESMA BLANCA ET AL: "Effect of beta-lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides." JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. A 26 MAY 2006, vol. 1116, no. 1-2, 26 May 2006 (2006-05-26), pages 31-37, XP005422876 ISSN: 0021-9673 page 34; table 3 page 36; table 3 the whole document ----- -/—	1,16-20

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 document 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	Date of mailing of the international search report
28 January 2009	12/02/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hagenmaier, Susanne

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2008/050131

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE REGISTRY [Online] 28 February 1999 (1999-02-28), XP002496963 retrieved from STN Database accession no. RN: 220063-57-0 See Reference 2: ZBORNIK-BLATNIK AND GRAMC, 1997, "Enzymic modification of whey protein and its characterization" abstract	1,16-20
X	PIHLANTO-LEPPALA ANNE ET AL: "Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins" INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, vol. 8, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 325-331, XP000853723 ISSN: 0958-6946 page 329; table 3 page 330, left-hand column, paragraph 2	1,16-20
X	WO 2007/004876 A2 (CAMPINA NEDERLAND HOLDING B V [NL]; CADEE JENNEKE ADRIANA [NL]; MALLEE) 11 January 2007 (2007-01-11) page 1, line 2 - line 3 page 4 page 5 page 6, line 29 - line 33 page 7, line 34 - line 39 page 9, line 18 - line 20	2-15, 17-20
Y	WO 02/19837 A1 (NEW ZEALAND DAIRY BOARD [NZ]; SCHLOTHAUER RALF CHRISTIAN [NZ]; SCHOLLU) 14 March 2002 (2002-03-14) cited in the application page 4 claims 1-14,17-20	2-15, 17-20
Y	WO 99/65326 A1 (NEW ZEALAND DAIRY BOARD [NZ]; SCHLOTHAUER RALF CHRISTIAN [NZ]; SCHOLLU) 23 December 1999 (1999-12-23) claims 1-13 page 8, line 5 - line 15	2-15, 17-20
Y	WO 2006/025731 A1 (FRIESLAND BRANDS BV [NL]; DE SLEGTE JAAP [NL]; KLARENBEEK GIJSBERTUS [) 9 March 2006 (2006-03-09) cited in the application page 4; claims 1-16	2-15, 17-20
	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2008/050131

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/057976 A1 (CANADA NATURAL RESOURCES [CA]; WU JIANPING [CA]; MUIR ALISTER D [CA];) 15 July 2004 (2004-07-15) page 14, line 17 - line 30 page 15, line 9 - line 19 page 19; example 9 claims 1-45	2-15, 17-20
Y	US 6 787 168 B1 (SAWHILL JAMES W [US]) 7 September 2004 (2004-09-07) the whole document	2-15, 17-20
Y	ABUBAKAR AMHAR ET AL: "New derivation of the inhibitory activity against angiotensin converting enzyme (ACE) from sweet cheese whey" TOHOKU JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH, vol. 47, no. 1-2, 1996, pages 1-8, XP008083421 ISSN: 0040-8719 the whole document	2-15, 17-20
A	HERNÁNDEZ-LEDESMA B ET AL: "Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON, US, vol. 52, no. 6, 24 March 2004 (2004-03-24), pages 1504-1510, XP008057959 ISSN: 0021-8561 the whole document	
A	MEISEL H ET AL: "Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties." ANTONIE VAN LEEUWENHOEK 1999 JUL-NOV, vol. 76, no. 1-4, July 1999 (1999-07), pages 207-215, XP002960560 ISSN: 0003-6072 cited in the application the whole document	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2008/050131

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	HERNANDEZ-LEDESMA BLANCA ET AL: "ACE-inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from beta-lactoglobulin f(19-25). Interactions with ascorbic acid" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 55, no. 9, May 2007 (2007-05), pages 3392-3397, XP002496962 ISSN: 0021-8561 Epub 2007 Apr 6 the whole document	1,16-20
X	HETTICH ET AL.: "Protein Surface mapping by Mass Spectrometry to monitor pH-dependent structural transitions in beta-lactoglobulin A" 52ND ANNUAL ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY, [Online] 24 May 2004 (2004-05-24), - 27 May 2004 (2004-05-27) XP002511999 Retrieved from the Internet: URL:www.ornl.gov/sci/csd/Presentations/Demet_ASMS2004.ppt> [retrieved on 2009-01-23] See "oxidized peptides identified by pepsin digestion"	1,16-19
L	-& ANONYMOUS: "Posters presented at the 52nd Annual ASMS Conference on Mass Spectrometry in Nashville, Tennessee, May 24 - 27, 2004" AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY ANNUAL CONFERENCES, [Online] XP002512000 Retrieved from the Internet: URL:http://www.ornl.gov/sci/csd/Research_areas/obms_rd_ASMS.html> [retrieved on 2009-01-26] page 6	
Y	PIHLANTO-LEPPÄLÄ A ET AL: "Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides." THE JOURNAL OF DAIRY RESEARCH FEB 2000, vol. 67, no. 1, February 2000 (2000-02), pages 53-64, XP008022966 ISSN: 0022-0299 page 62; table 3 the whole document	1,16-20

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2008/050131

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEUNG H ET AL: "Binging of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 255, no. 2, 1 January 1980 (1980-01-01), pages 401-407, XP002991317 ISSN: 0021-9258 the whole document	1,16-20
T	ORTIZ-CHAO P. ET AL.: "Production of novel ACE inhibitory peptides from béta-lactoglobulin using Protease N Amano" INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, [Online] vol. 19, no. 2, 19 September 2008 (2008-09-19), pages 69-76, XP002512424 Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T7C-4TGHN92-1&_user=987766&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000049880&_version=1&_urlVersion=0&_userid=987766&md5=4e759alef1b073ab48e46a3bd16aa789> [retrieved on 2009-01-27] page 73; table 1 the whole document	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL2008/050131

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an 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 reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1,16-20 (all partially), 2-15 (all completely)

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 Application No. PCT/NL2008/050131

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1,16-20 (all partially); 2-15 (all completely)

An ACE-inhibitory peptide selected from the group VAGTWYS, VAGTWYSL, WYSL and VAGTW, composition comprising said peptide and use of said peptide for the preparation of a medicament for inhibiting ACE activity in a mammal.

1.1. claims: 2-15 (all completely), 17-20 (all partially)

A method of providing a protein hydrolysate comprising a peptide according to claim 1, comprising treating a whey protein-containing substrate with a bacterial heat-labile neutral protease to produce a primary hydrolysate; and treating said primary hydrolysate with a thermolysin to produce a secondary hydrolysate; a whey hydrolysate having ACE-inhibitory activity, obtainable by said method, composition comprising said hydrolysate and use of said hydrolysate for the preparation of a medicament for inhibiting ACE activity in a mammal

---

2. claims: 1,16-20 (all partially)

The ACE-inhibitory peptide IAEKTKIPAV , a composition comprising said peptide and use of said peptide for the preparation of a medicament for inhibiting ACE activity in a mammal.

---

3. claims: 1,16-20 (all partially)

An ACE-inhibitory peptide selected from the group AASDISL and ASDISL, a composition comprising said peptide and use of said peptide for the preparation of a medicament for inhibiting ACE activity in a mammal.

---

4. claims: 1,16-20 (all partially)

The ACE-inhibitory peptide VYVEE, a composition comprising said peptide and use of said peptide for the preparation of a medicament for inhibiting ACE activity in a mammal.

---

5. claims: 1,16-20 (all partially)

The ACE-inhibitory peptide LKALPM , a composition comprising said peptide and use of said peptide for the preparation of a medicament for inhibiting ACE activity in a mammal.

---

6. claims: 1,16-20 (all partially)

International Application No. PCT/NL2008/050131

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

An ACE-inhibitory peptide selected from the group LIVTQT and IIVTQT, a composition comprising said peptide and use of said peptide for the preparation of a medicament for inhibiting ACE activity in a mammal.

---

7. claims: 1,16-20 (all partially)

The ACE-inhibitory peptide DAQSAPL, a composition comprising said peptide and use of said peptide for the preparation of a medicament for inhibiting ACE activity in a mammal.

---

8. claims: 1,16-20 (all partially)

An ACE-inhibitory peptide selected from the group VLDTDY, LVLDTDYKKY and DTDYKKY, a composition comprising said peptide and use of said peptide for the preparation of a medicament for inhibiting ACE activity in a mammal.

---

9. claims: 1,16-20 (all partially)

The ACE-inhibitory peptide LKPTPEG, a composition comprising said peptide and use of said peptide for the preparation of a medicament for inhibiting ACE activity in a mammal.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2008/050131

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007004876 A2	11-01-2007	NONE	
WO 0219837 A1	14-03-2002	AU 9037601 A	22-03-2002
		AU 2001290376 B2	25-08-2005
		BR 0113812 A	01-02-2005
		CA 2421714 A1	14-03-2002
		CN 1474656 A	11-02-2004
		EP 1317186 A1	11-06-2003
		HK 1063132 A1	21-04-2006
		HU 0302370 A2	28-10-2003
		JP 2004508025 T	18-03-2004
		MX PA03002109 A	24-05-2004
		NO 20031096 A	07-05-2003
		NZ 506866 A	30-05-2003
		ZA 200301982 A	25-06-2004
WO 9965326 A1	23-12-1999	AT 275831 T	15-10-2004
		AU 761477 B2	05-06-2003
		AU 4535999 A	05-01-2000
		DE 69920219 D1	21-10-2004
		DE 69920219 T2	22-09-2005
		DK 1087668 T3	24-01-2005
		EP 1087668 A1	04-04-2001
		NO 20006305 A	14-02-2001
		NZ 508867 A	28-11-2003
		TW 225490 B	21-12-2004
		US 2004086958 A1	06-05-2004
		US 6919314 B1	19-07-2005
WO 2006025731 A1	09-03-2006	AT 397623 T	15-06-2008
		DK 1794189 T3	15-09-2008
		EP 1794189 A1	13-06-2007
		ES 2308531 T3	01-12-2008
		JP 2008511317 T	17-04-2008
		NL 1026931 C2	01-03-2006
		US 2008070828 A1	20-03-2008
WO 2004057976 A1	15-07-2004	AU 2003289794 A1	22-07-2004
		BR 0317762 A	22-11-2005
		CA 2508219 A1	15-07-2004
		CN 1731934 A	08-02-2006
		CN 101139625 A	12-03-2008
		EP 1575375 A1	21-09-2005
		JP 2006512371 T	13-04-2006
		MX PA05006403 A	05-12-2005
US 6787168 B1	07-09-2004	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 35/20	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/20	
Ａ６１Ｐ 9/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/12	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ファン リューセン－ファン カン，エッレン ジャクリーヌ マリヤ
オランダ国，８０４３ ジェーアール ズウォッレ，ゴウドプレウィエルストラート １６２
(72)発明者 クラレンビーク，ゲイスベルト
オランダ国，７７３１ エスティー オンメン，ファン オスタデストラート １０６

Ｆターム(参考) 4B018 LB07 LB08 LB10 MD71 ME04 MF06 MF12
4B064 AG23 CA21 CB06 CC01 CE10 DA01 DA10
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA17 CA38 NA14 ZA421
4C087 AA01 AA02 AA03 BB39 CA16 NA14 ZA42
4H045 AA10 AA20 AA30 BA13 BA14 BA15 CA43 DA57 EA01 EA23
FA70 GA15 GA22 GA25