

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-31002

(P2010-31002A)

(43) 公開日 平成22年2月12日 (2010.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7008 (2006.01)	A 6 1 K 31/7008	4 C 0 5 7
C 0 7 H 5/06 (2006.01)	C 0 7 H 5/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2009-156834 (P2009-156834)	(71) 出願人	305013910
(22) 出願日	平成21年7月1日 (2009.7.1)		国立大学法人お茶の水女子大学
(31) 優先権主張番号	特願2008-172162 (P2008-172162)		東京都文京区大塚2丁目1番1号
(32) 優先日	平成20年7月1日 (2008.7.1)	(74) 代理人	100107984
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 廣田 雅紀
		(74) 代理人	100102255
			弁理士 小澤 誠次
		(74) 代理人	100096482
			弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100123168
			弁理士 大▲高▼ とし子
		(74) 代理人	100120086
			弁理士 ▲高▼津 一也
		(74) 代理人	100131093
			弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵炎の予防・治療剤

(57) 【要約】

【課題】本発明の課題は、生体に投与しても副作用の懸念がほとんどなく、かつ、十分なトリプシノーゲン活性化抑制作用（又はトリプシン阻害作用）を発揮するトリプシノーゲン活性化抑制剤、あるいは、膵炎の予防・治療剤等を提供することにある。

【解決手段】ガラクトサミン又はその誘導体を利用することを特徴とする。ガラクトサミン又はその誘導体は、トリプシンによる、トリプシノーゲンからトリプシンへの分解（トリプシノーゲンの活性化）を抑制する効果を有しているため、トリプシノーゲン活性化抑制剤や膵炎の予防・治療剤として用いることができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ガラクトサミン又はその誘導体を含むことを特徴とするトリブシノーゲン活性化抑制剤。

【請求項 2】

ガラクトサミン誘導体を含むことを特徴とする膵炎の予防・治療剤。

【請求項 3】

トリブシノーゲン活性化抑制剤の製造におけるガラクトサミン又はその誘導体の使用。

【請求項 4】

膵炎の予防・治療剤の製造におけるガラクトサミン誘導体の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トリブシノーゲン活性化抑制剤や、膵炎の予防・治療剤等に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、食文化の欧米化が進んだ結果、脂肪分や酒類の過剰摂取による急性及び慢性の膵炎の患者が増加している。膵炎の発症メカニズムは完全には判明していないが、膵液の消化酵素によって、膵臓自体が消化されて炎症を起こすという点では共通している。本来、膵臓トリブシンの不活性前駆体であるトリブシノーゲンは、膵液中に分泌され、膵管を通過して十二指腸に達し、そこで発現されているエンテロキナーゼによって活性化される。ところが何らかの原因によりトリブシノーゲンが膵臓中で早期に活性化されてトリブシンに変化すると、そのトリブシンが膵臓中の他のプロテアーゼ前駆体（例えば、トリブシノーゲン、キモトリブシノーゲン、プロエラスターゼ、プロカルボキシペプチダーゼ、及び、プロテアーゼにより活性化されるレセプター等（非特許文献 1 及び 2））を連鎖的に活性化し、活性化されたプロテイナーゼが膵臓細胞の破壊を誘導することによって、急性膵炎を発症する。また、このような炎症がより緩やかに繰り返し長期間にわたって起こると、膵臓の正常な細胞が徐々に破壊されていき、慢性膵炎を発症する。

20

【0003】

これら膵炎の予防・治療剤として、様々なトリブシン阻害剤が開発されている。例えば特許文献 1 には、ウィッチヘーゼル、ローズマリー、レンギョウ、ムクゲ、チョウジ、バナバ、フウ、セイヨウヤマハッカ及びザクロから成る群より選ばれる少なくとも 1 種類の植物又はその抽出物を含むトリブシン阻害剤が記載されており、また、特許文献 2 には、グアニジノ安息香酸誘導体からなるトリブシン阻害剤が記載されている。さらに、他のトリブシン阻害剤として、「フオイパン」（登録商標）としても知られ、慢性膵炎における急性症状の緩解や術後逆流性食道炎に対して主に用いられるカモスタットメシル酸塩や、「エフオーワイ」（登録商標）としても知られ、急性膵炎、汎発性血管内血液凝固症に対して主に用いられるガベキサートメシル酸塩が知られている。しかし、天然成分由来のトリブシン阻害剤では、未だ十分な効果が得られているとはいえず、また、フオイパン等の合成化合物からなるトリブシン阻害剤においては、副作用の問題があり、改善の余地があった。

30

40

【0004】

一方、本発明者らは、ウシの膵臓のトリブシン（BPT）やブタのそれ（PPT）と、糖タンパク質の N - グリカンとの結合性を調べた。非特許文献 3 には、その結果として、BPT 及び PPT のいずれも、17 種類の糖 - ビオチニルポリアクリルアミド（BP）プローブ（ポリアクリルアミド骨格の - CONH₂ 基に、短いスペーサー（- OCH₂CH₂CH₂CH₂-）を介して糖をグリコシド結合で共有結合させたプローブ；例えば α - マンノース BP プローブについて図 5 参照）のうち、α - マンノース（α - Man）；α - マンノース - 6 - リン酸（α - Man - 6P）；N - アセチルノイラミン酸 α 2 , 6 ガラクトース β 1 , 4 グルコース（Neu5Ac α 2 , 6 Gal β 1 , 4 Glc）；α - ガラクト

50

ース (α - Gal) ; 又は、 β - グルコース (β - Glc) ; のプローブには、高い結合力を示したが、BPT及びPPTのいずれも α - N - アセチルガラクトサミン (α - GalNAc) 等には結合しなかった、と記載されている (非特許文献3の32ページの“RESULTS”の第1段落) 。

【0005】

以上のような非特許文献3の結果を考慮すると、BPTやPPTのいずれにも結合しなかった「 α - GalNAcの1位にスペーサーが結合した化合物」(α - GalNAcの1位のヒドロキシ基がブトキシ基に置換された化合物)をはじめとする、 α - GalNAcの1位のヒドロキシ基がアルコキシ基に置換された化合物等が、トリプシノーゲンやトリプシンの活性の阻害剤や促進剤として機能する可能性はきわめて低いと考えられた。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2005-053818号公報

【特許文献2】特公昭60-49185号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Pancreas, 21, 57-62 (2000)

【非特許文献2】Curr. Opin. Struct. Biol., 2, 713-720 (1992)

【非特許文献3】J. Biol. Chem., 281, 8528-8538 (2006)

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の課題は、生体に投与しても副作用の懸念がほとんどなく、かつ、十分なトリプシノーゲン活性化抑制作用 (又はトリプシン阻害作用) を発揮するトリプシノーゲン活性化抑制剤、あるいは、膵炎の予防・治療剤等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、BPTやBPTG (ウシトリプシノーゲン) と、糖との結合性を調べるために、非特許文献3と同様に、糖 - BPプローブを用いたアッセイを行なった。この糖 - BPプローブとは、前述したように、ポリアクリルアミド骨格の - CONH₂ 基に、短いスペーサー (- OCH₂CH₂CH₂ -) を介して糖をグリコシド結合で共有結合させたプローブである。非特許文献3のアッセイでは糖として α - GalNAcを用いた糖 - BPプローブ (α - GalNAc BPプローブ) はBPTに結合しなかったが、今回の実験では、予想に反して、その糖BPプローブが、BPTやBPTGに対して高い結合性、しかも α - Manよりも高い結合性を有していることを見い出した。さらに、本発明者らは、BPTによるBPTGからBPTへの分解 (BPTGの活性化) に対して、Me - GalNAc、GalN (ガラクトサミン) 、及び β - GalNAcが顕著な抑制効果を有していることを見い出し、本発明を完成するに至った。なお、 α - GalNAc BPプローブに関するアッセイの結果が、非特許文献3における結果と逆になった理由は定かではないが、非特許文献3で用いた α - GalNAc BPプローブ (現在入手不可) に何らかの問題があった可能性が考えられる。また、非特許文献3で用いている糖はすべてD体であった。

30

40

【0010】

すなわち本発明は、(1) ガラクトサミン又はその誘導体を含有することを特徴とするトリプシノーゲン活性化抑制剤に関する。

【0011】

また本発明は、(2) ガラクトサミン誘導体を含有することを特徴とする膵炎の予防・治療剤に関する。

【0012】

50

さらに本発明は、(3)トリブシノーゲン活性化抑制剤の製造におけるガラクトサミン又はその誘導体の使用に関する。

【0013】

また本発明は、(4)膵炎の予防・治療剤の製造におけるガラクトサミン誘導体の使用に関する。

【発明の効果】

【0014】

本発明のトリブシノーゲン活性化抑制剤は、生体分子に基づく成分を有効成分としているため生体に投与しても副作用の懸念がほとんどなく、かつ、十分なトリブシノーゲン活性化抑制効果(及び/又はトリブシン阻害効果)を発揮することができる。また、本発明の膵炎の予防・治療剤は、副作用の懸念がほとんどなく、かつ、膵炎に対する十分な予防・治療効果を発揮できると考えられる。

10

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】BPTGからBPTへの変化に対する糖の影響を調べるために行なったSDS-PAGEの結果を示す図である。A:Me- α -Gal、B:Me- β -Gal、C:Me- α -Man、D:Me- α -GlcNAc、E:Me- α -GalNAc、F:GalN $\cdot$ HCl、G:GalNAc、H:L-Fuc、I:D-Fuc、但し「*」は0.1M Me- α -GalNAc(20min)の結果を示す。

【図2】種々の糖存在下におけるBPTG活性化率の推移を示す図である。

20

【図3】BPTG又はBPTと、D-GalNAcとのプレインキュベーションによる活性化抑制効果の比較を示す図である。

【図4】ロットの異なるBPTGおよびBPTと、 α -GalNAc-BP又は α -Man-BPとの結合(pH7.5)を、ELISAにより検出した結果を示す図である。

【図5】 α -Manを持つ糖-BP-プローブの構造を示す図である。

【図6】糖-BPプローブを用いたELISAによるBPTGの糖結合性(pH7.5とpH5.5)の検出結果を示す図である。

【図7】SPRによるBPTG固定化センサーチップへの糖の結合の検出結果を示す図である。

【図8】BPTのBAPAを基質とした酵素活性への糖の影響の結果を示す図である。

30

【図9】BPTG、BPTと、アプロチニン(BPTI)との結合に与える糖の影響を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明のトリブシノーゲン活性化抑制剤は、ガラクトサミン(以下、「GalN」ともいう。)又はその誘導体を含有する限り特に制限されず、本発明における「GalN」とは、D体のGalN、L体のGalNのいずれであってもよいが、D体のGalNが好ましい。また、上記GalNとしては、本発明におけるトリブシノーゲン活性化抑制効果(又はトリブシン阻害効果)を有している限り、 α -GalN、 β -GalNのいずれであってもよい。さらに、上記のGalNの誘導体としては、本発明におけるトリブシノーゲン活性化抑制効果(又はトリブシン阻害効果)を有している限り特に制限されず、例えば、 α -GalNAc; β -GalNAc; GalNAcの1位のヒドロキシ基が、メトキシ基、エトキシ基、ブトキシ基、フェニルオキシ基、p-ニトロフェニルオキシ基等のアルコキシ基; ニトロ基; アミノ基; Fmoc基; 種々の糖残基又はオリゴ糖鎖などに置換された化合物や、GalNAcの2位のN-アセチル基が、遊離アミノ基; N-硫酸基; N-グリコリル基などに置換された化合物や、GalNAcの3位、4位又は6位のヒドロキシ基が、硫酸基; O-アセチル基; リン酸基; 種々の糖残基又はオリゴ糖鎖などに置換された化合物や、メチル α -ガラクトサミニド、メチル β -ガラクトサミニドなどの化合物や、これらの化合物の塩などを好適に例示することができる。上記の化合物の塩としては、例えば、化合物の塩酸塩、リン酸塩、硝酸塩、硫酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、

40

50

酪酸塩、吉草酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩等の酸付加塩、及びナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等の金属塩を例示することができ、中でも酸付加塩を好適に例示することができ、中でも塩酸塩をより好適に例示することができる。本発明において特に好ましい G a l N 又はその誘導体としては、D 体の G a l N 及びその塩や、D 体の α - G a l N A c の 1 位のヒドロキシ基がメトキシ基に置換された化合物 (M e - α - G a l N A c) 及びその塩や、D 体の α - G a l N A c の 1 位のヒドロキシ基がフェニル基又はニトロフェニル基に置換された化合物及びその塩等を挙げることができ、さらに好ましいものとして、D 体の G a l N の塩酸塩 (G a l N $\cdot$ H C l) や、M e - α - G a l N A c を挙げることができる。

【 0 0 1 7 】

10

また、本発明のトリブシノーゲン活性化抑制剤に含有される G a l N 又はその誘導体の形態としては、特に制限されず、G a l N 又はその誘導体自体であってもよいし、G a l N 又はその誘導体同士が α 結合及び / 又は β 結合により結合する糖鎖の形態であってもよいし、G a l N 又はその誘導体やその糖鎖が、G a l N 又はその誘導体以外の糖、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質等の他の生体分子と結合する生体分子複合体であってもよいが、特に優れたトリブシノーゲン活性化抑制効果が期待できる点で、G a l N 又はその誘導体同士が α 結合により結合する糖鎖の形態や、該糖鎖を含む生体分子複合体、すなわちオリゴ糖鎖、糖タンパク質、糖脂質、または多糖鎖などの形態であることが好ましい。

【 0 0 1 8 】

20

本発明において「トリブシノーゲン活性化抑制効果」とは、トリブシンによる、トリブシノーゲンからトリブシンへの分解 (トリブシノーゲンの活性化) を抑制する効果を意味し、トリブシノーゲンに結合して保護作用を示すことによって、トリブシンへの分解を抑制する効果の他、トリブシンに結合することによって、トリブシノーゲンからトリブシンへの分解を抑制する効果も含まれる。ある G a l N 又はその誘導体がトリブシノーゲン活性化抑制効果を有しているかどうかは、例えば、後述の実施例 1 記載の「糖によるトリブシノーゲン活性化抑制実験」と同様の実験によって容易に確認することができる。具体的には、後述の実施例 1 記載の実験と同様の実験において、トリブシン溶液の添加から 2 0 分間経過後のサンプル中の「B P T / B P T G + B P T」(以下、単に「B P T / B P T G + B P T」ともいう。) が、その G a l N 又はその誘導体を添加した場合に、それを添加していない場合に比べて、低いときは、その G a l N 又はその誘導体はトリブシノーゲン活性化抑制効果を有しているといえる。本発明における「トリブシノーゲン活性化抑制効果」の好ましい程度としては、後述の実施例 1 記載の実験と同様の実験において、G a l N 又はその誘導体を添加した場合の「B P T / B P T G + B P T」が、G a l N 又はその誘導体を添加していない場合の「B P T / B P T G + B P T」に対する割合として 6 0 % 以下、より好ましくは 5 0 % 以下、さらに好ましくは 4 0 % 以下、最も好ましくは 3 0 % 以下である場合を例示することができる。

30

【 0 0 1 9 】

上記のトリブシノーゲンとしては、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等の哺乳類由来のトリブシノーゲンやそれらのアイソフォームを好適に例示することができ、中でもヒト由来のトリブシノーゲンやそのアイソフォームをより好適に例示することができ、上記のトリブシンとしては、前述の哺乳類由来のトリブシンやそれらのアイソフォームを好適に例示することができ、中でもヒト由来のトリブシンやそのアイソフォームをより好適に例示することができる。なお、本発明における G a l N 又はその誘導体は、いずれか 1 種類のトリブシノーゲンに対して、その活性化抑制効果を有していればよい。

40

【 0 0 2 0 】

上記の G a l N の入手方法としては、市販のものを用いてもよいし、ガラクトースから公知の方法で誘導してもよい。また、G a l N の誘導体についても、導入する置換基の部位や置換基の種類等に応じて適宜製造することができる。また、G a l N 又はその誘導体が結合した糖鎖や、G a l N 又はその誘導体を含む生体高分子複合体などについても、同

50

様に適宜製造することができる。

【0021】

本発明の膵炎の予防・治療剤は、G a l N又はその誘導体を含有する限り特に制限がされず、このG a l N又はその誘導体や、その好ましい態様については前述したとおりである。なお、本明細書の背景技術においても述べたように、膵炎は、膵液の消化酵素によって、膵臓自体が消化されて炎症を生じるものであるもので、トリプシノーゲン活性化抑制効果を有しているG a l N又はその誘導体を用いれば、膵炎の予防効果や治療効果を得ることができる可能性が極めて高い。本発明における「膵炎の予防効果」とは、本発明におけるG a l N又はその誘導体を投与しない場合に比べて、それを投与した場合に、膵炎の発症の程度が軽減又は抑止される効果を意味し、本発明における「膵炎の治療効果」とは、本発明におけるG a l N又はその誘導体を投与しない場合に比べて、それを投与した場合に、膵炎の程度が改善又は治癒する効果を意味する。膵炎の発症の程度や膵炎の程度は、膵臓の組織の状態や血中のアミラーゼの濃度等を基準に適宜評価することができる。

10

【0022】

上記の本発明のトリプシノーゲン活性化抑制剤や膵炎の予防・治療剤（以下、両剤を併せて「本発明の剤」ともいう。）は、G a l N又はその誘導体による、トリプシノーゲンからトリプシンへの活性化抑制効果や膵炎の予防・治療効果が得られる限り、G a l N又はその誘導体の他に、他のトリプシノーゲン活性化抑制剤や、アプロチニン等のトリプシン阻害剤や、他の膵炎の予防・治療剤などの任意成分を含んでいてもよい。

20

【0023】

本発明の剤に含有されるG a l N又はその誘導体は、常法によって適宜の製剤とすることができる。製剤としては散剤、顆粒剤などの固形製剤であってもよいが、特にインビボにおける膵炎の予防・治療効果を得る観点からは、溶液剤、乳剤、懸濁剤などの注射用の液剤や、注射用のゲル剤とすることが好ましい。前述の液剤の製造方法としては、例えばG a l N又はその誘導体を溶剤と混合する方法や、さらに懸濁化剤や乳化剤を混合する方法を好適に例示することができ、前述のゲル剤の製造方法としては、例えばG a l N又はその誘導体をゼラチンと混和する方法を好適に例示することができる。以上のように、本発明におけるG a l N又はその誘導体を製剤とする場合には、製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、緩衝剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、着色剤などの任意成分を配合することができる。

30

【0024】

前述の溶剤としては、精製水、生理的食塩水、リンゲル液、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン、ポリエチレングリコール、マクロゴールなどの親水性溶剤や、オリーブ油、ラッカセイ油、ゴマ油、ツバキ油、ナタネ油、脂肪酸モノグリセリド、脂肪酸ジグリセリド、高級脂肪酸エステル、流動パラフィンなどの油性溶剤を例示することができ、また、前述の懸濁化剤としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、アラビアゴム、ベントナイトなどを例示することができ、さらに、前述の乳化剤としては、アラビアゴム、ゼラチン、レシチン、コレステロール、卵黄、ベントナイト、ビーガム、セタノール、モノステアリン酸グリセリン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ステアリン酸などを例示することができる。

40

【0025】

前述の溶解補助剤としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D - マンニトール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸

50

ナトリウム、酢酸ナトリウムなどを例示することができ、また、前述の賦形剤としては、乳糖、白糖、D - ソルビトール、デンプン、 α 化デンプン、コーンスターチ、D - マンニトール、デキストリン、結晶セルロース、アラビアゴム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、血清アルブミンなどを例示することができ、さらに、前述の結合剤としては、 α 化デンプン、ショ糖、ゼラチン、アラビアゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、結晶セルロース、白糖、D - マンニトール、トレハロース、デキストリン、プルラン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなどを例示することができる。

【0026】

前述の等張化剤としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グルコース、フルクトース、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、サッカロース、グリセリン、尿素などを例示することができ、また、前述の緩衝剤としては、クエン酸ナトリウム、グリセリンなどを例示することができ、さらに、前述の防腐剤としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などを例示することができる。前述の安定化剤としては、ポリエチレングリコール、デキストラン硫酸ナトリウム、アミノ酸、ヒト血清アルブミンなどを例示することができ、また、前述の無痛化剤としては、ブドウ糖、グルコン酸カルシウム、塩酸プロカインなどを例示することができ、さらに、前述の抗酸化剤としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸などを例示することができる。また、前述の着色剤としては、タール系色素、カラメル、ベンガラ、二酸化チタン、エリス・アンド・エベラールド社のFD & Cブルー2号ならびにFD & Cレッド40号などのFD & C染料などを例示することができる。

【0027】

本発明の剤を膵炎の予防や治療に用いる場合における、本発明の剤の投与方法としては、膵炎の予防・治療効果が得られる限り特に制限されず、静脈内投与や膵臓の炎症部位への直接投与、経口投与、腹腔内投与を例示することができる。また、本発明の剤の投与量や投与回数や投与濃度は、膵炎の状態や患者の体重等に応じて、適宜調節することができる。

【0028】

本発明の膵炎の予防・治療剤の対象となる膵炎としては、膵液の消化酵素によって、膵臓自体が消化される炎症に関連している限り、急性膵炎であっても慢性膵炎であってもよいが、急性膵炎を特に好適に例示することができる。また、膵炎に対して予防・治療効果を発揮する結果として、敗血症、膵臓の周囲の臓器（腎臓、大腸、胃など）の炎症、膵仮性嚢胞、膵壊死、感染性膵壊死などの、膵炎の合併症に対しても、予防・治療効果を発揮する。

【0029】

また、本発明には、トリプシノーゲン活性化抑制剤の製造におけるG a 1 N又はその誘導体の使用や、G a 1 N又はその誘導体をトリプシノーゲン活性化抑制剤として使用する方法や、トリプシノーゲンの活性化抑制におけるG a 1 N又はその誘導体の使用や、膵炎の予防・治療剤の製造におけるG a 1 N又はその誘導体の使用や、G a 1 N又はその誘導体を膵炎の予防・治療剤に使用する方法や、膵炎の予防・治療におけるG a 1 N又はその誘導体の使用や、G a 1 N又はその誘導体を哺乳動物（特にヒト）に投与することの特徴とする膵炎の予防・治療方法も含まれる。これらの使用や方法における文言の内容やその好ましい態様は、前述したとおりである。

【0030】

本発明のトリプシノーゲン活性化抑制剤は、膵炎の予防や治療の他に、腸内での消化抑制剤、腸管細胞の増殖・分化の調節剤、組織溶解抑制剤等として用いることができる。なお、本発明におけるG a 1 N又はその誘導体のトリプシノーゲン活性化抑制効果が、G a 1 N又はその誘導体がトリプシンに結合することによって、トリプシノーゲンからトリプシンへの分解を抑制（すなわち、トリプシンのセリンプロテアーゼ活性を抑制）すること

10

20

30

40

50

により発揮される場合は、また、本発明のトリプシノーゲン活性化抑制剤は、トリプシノーゲンが存在しない条件下でもトリプシン阻害剤として利用することができる他、キモトリプシン、エラスターゼ、カルボキシペプチダーゼ、トロンビン、プラスミン、プラスミノゲンアクチベーター、トリプターゼ、マトリプターゼ及びプロテアーゼにより活性化されるレセプター、の活性化抑制剤としても利用することができる。

【0031】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0032】

10

1. [糖によるトリプシノーゲン活性化抑制実験]

(1) 材料

本実験には以下の材料を用いた。なお、カッコ内にはコード番号を示す。
ウシ膵臓トリプシノーゲン (BPTG) は、MP Biomedicals, Inc. 製のもの (101195) を用い、ウシ膵臓トリプシン (BPT) は、和光純薬株式会社製のもの (204-13951) を用い、Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) は、Nacalai Tesque, INC. 製のもの (27327-52) を用い、Methyl- α -D-galactopyranoside (Me- α -Gal) は、Sigma-Aldrich Corporation 製のもの (M1379-25MG) を用い、1-O-Methyl- β -D-galactopyranoside (Me- β -Gal) は、Nacalai Tesque, INC. 製のもの (22526-34) を用い、Methyl- α -D-Mannopyranoside (Me- α -Man) は、和光純薬株式会社製のもの (131-08021) を用い、Methyl-N-acetyl-2-deoxy- α -D-glucosaminide (Me- α -GlcNAc) は、Sigma-Aldrich Corporation 製のもの (M0257-100MG) を用い、Methyl-N-acetyl-2-deoxy- α -D-galactosaminide (Me- α -GalNAc) は、Toronto Research Chemicals, Inc. 製のもの (M275310) を用い、D-ガラクトサミン塩酸塩 (GalNH $\cdot$ HCl) は、生化学工業製のもの (Lot.S6701) を用い、N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) は、Toronto Research Chemicals Inc. 製のもの (A17700) を用い、L-フコース (L-Fuc) は、Fluka AG, Chem. Fabrik製のものを、D-フコース (D-Fuc) は、和光純薬株式会社製のものを、用いた。

20

【0033】

(2) 方法及び結果

30

トリプシンによるトリプシノーゲンからトリプシンへの分解 (トリプシノーゲンの活性化) に対して、糖がどのような影響を与えるかを調べるために、BPTGをBPT及び糖存在下でアッセイした場合の、BPTG量やBPT量の変化を、SDS-PAGEによる分子量の変化によって確認した。具体的には、以下の方法で行なった。

BPTG、BPT、及び上記1. (1) 記載の9種類の各糖を、それぞれ別のエッペンチューブに分取し、さらにそれぞれのエッペンチューブにTBS溶液 [10mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl] を添加して、5.0mg/mlのBPTG溶液、3.7mg/mlのBPT溶液、及び0.3Mの各糖溶液を調製した。

【0034】

1種類の糖溶液に関して、新たな500 μ lエッペンチューブを12本用意し、12本すべてに前述のBPTG溶液を160 μ lずつ分取した後、さらに、その12本のうち6本のエッペンチューブには前述のTBSを110 μ lずつ添加し、残りの6本のエッペンチューブにその1種類の糖溶液を110 μ lずつ添加して撹拌した。その後、氷上で20~30分間インキュベートした。その後、これら12本のエッペンチューブにBPT溶液を30 μ lずつ添加して撹拌し、37 $^{\circ}$ Cで反応させた。この状態での反応液はいずれもpH4.6となるように調整した。BPT溶液の添加から0分後、2分後、5分後、10分後、15分後、20分後の各時点で、糖溶液を含むエッペンチューブ (BPTG+糖溶液+BPT) と、糖溶液を含まないエッペンチューブ (BPTG+TBS+BPT) をそれぞれ1本ずつ氷上に移すとともに、50mM PMSF (トリプシン阻害剤) を含むTBS溶液を3.2 μ l加え混合し、反応を停止させた。これらの一連の操作を、他の8種

40

50

類の糖溶液に関しても行なった。

【0035】

このようにして得られた各サンプルから、1サンプルあたり40 μ lずつ分取し、そこにサンプルバッファー(5x)を10 μ lずつ添加した後、100℃で5分ボイルして泳動用サンプルを調製した。それらの泳動用の各サンプル(7 μ g)について、ポリアクリルアミドゲル(濃縮ゲルにおいてはPAG濃度3%、泳動ゲルにおいてはPAG濃度12%)を用い、25mA/gelで1.5時間、Laemmli法により、SDS-PAGEを行った。泳動後のポリアクリルアミドゲルをCoomassie brilliant blue染色液中で約10分間染色した後、脱色液中で過剰な色素を脱染した。その後、その泳動ゲルをスキャナーで読み取り、各糖における各時間のサンプル中のBPTGやBPT量の推移を調べた。その結果を図1に示す。図1の各パネルにおける「+」は、その糖を添加したサンプル(その糖の存在下におけるサンプル)であることを意味し、「-」は、その糖を添加していないサンプル(その糖の非存在下におけるサンプル)を意味する。また、図1のSDS-PAGEにおけるBPTGやBPTのバンドの染色強度は、各タンパク質の量に比例するので、図1のSDS-PAGEにおけるBPTGやBPTのバンドの染色強度を、Image J(1.37v, National Institutes of Health)のソフトウェアを利用して数値化し、BPTGがBPTに変化した割合を算出した。具体的には、図1の各糖における各時間のサンプル中のBPTGとBPTの量の和に対するBPTの割合($BPT / BPTG + BPT$; 以下、「BPTGの活性化率」ともいう。)を算出し、その「BPTGの活性化率」の推移をグラフ化した。その結果を図2に示す。

10

20

【0036】

図1及び図2の結果から、Me- α -GalとMe- α -GlcNAc、L-FucならびにD-Fucにおいては、糖の添加の有無にかかわらず、時間の経過と共にBPTGが分解されて、BPTへと変化していることが示され、また、Me- β -GalやMe- α -ManやGalNAcにおいては、時間の経過と共にBPTGが分解されてはいるものの、糖の添加によって、わずかではあるが、BPTGからBPTへの分解が抑制されていることが示され、さらに、GalN $\cdot$ HClでは糖の添加によって、BPTGからBPTへの分解がかなり抑制されていることが示され、また、Me- α -GalNAcにおいては、糖の添加により、20分経過後でもBPTGはほとんど分解せず、BPTGからBPTへの分解が顕著に抑制されていることが示された。Me- α -GalNAcやGalN $\cdot$ HClによるトリブシノーゲンの分解抑制(活性化抑制)のメカニズムの詳細は未だ明らかではないが、トリブシノーゲンに結合した糖がトリブシノーゲンの不活性構造を保護する可能性、又は、トリブシンに結合した糖がトリブシンのタンパク質分解活性を阻害する可能性が考えられる。なお、0.1M Me- α -GalNAcでは、糖とBPTGを氷上で20分間ブレインキュベートした直後の0minにおいて、BPTGのバンドが常に薄くなったが、その後37℃の保温でバンドの濃さは復活した。この原因は不明であるが、BPTGの構造変化により、0℃付近での溶解度が変化した可能性も考えられる。また、GalN $\cdot$ HClは、溶液中ではGalNの α 体と β 体が生じ、GalNAcは、溶液中ではGalNAcの α 体と β 体が生じる。

30

40

【0037】

さらに、前述の[糖によるトリブシノーゲン活性化抑制実験]において、BPTGを0.1M D-GalNAcの存在下、氷上で20分間ブレインキュベーションする過程を行わず、代わりに30 μ lのBPT溶液に110 μ lの0.3M D-GalNAc(終濃度0.24Mとなる)又は110 μ lの糖を含まないTBS溶液を加えて混合し、氷上で20分間ブレインキュベーションしてから、糖とブレインキュベーションしていないBPTG溶液160 μ lを加え、同様に活性化実験を行った。同時に実施例1の条件でも活性化実験を行い、両者の結果を比較した。その結果を図3に示す。図3の結果から、BPTを0.1M D-GalNAcとブレインキュベーションした場合、BPTGはコントロール(糖非存在下)と同様に活性化され、活性化抑制が起こらなかった。すなわち糖による阻害作用はBPTGとのブレインキュベーションによってのみ起こることが示された。

50

したがってD - G a l N A cによる活性化抑制効果は、B P T Gと糖の結合によって、トリプノーゲンの不活性構造が安定化され、B P T GのN末端にある活性化ペプチドが切断されにくくなるためと考えられ、トリプシンと糖の結合によるものではないことが示された。すなわち、トリプシン活性阻害剤を基本とするこれまでの膵炎抑制剤とは異なり、本薬剤はトリプシノーゲンに作用して活性化を抑制するという新規なメカニズムに基づいてトリプシノーゲン等のプロ酵素の活性化を抑制することがわかった。本化合物は特にトリプシン阻害剤が効かないような場合の新規な膵炎の治療・予防方法に用い得る可能性が高い。

【実施例2】

【0038】

10

2. [ELISA法による糖結合性分析]

(1) 材料

本実験には以下の材料を用いた。

B P T G、B P T及びP M S Fは、実施例1で用いたものと同様のものを用い、糖-biotinylated polyacrylamide probes (糖 - B P プロープ)は、GlycoTech Co. (Gaithersburg, Maryland 20879) 製のもの (ポリアクリルアミド骨格の - C O N H₂ 基に、短いスパーサー (- O C H₂ C H₂ C H₂ -) を介して糖をグリコシド結合で共有結合させたプロープ; 例えばα - マンノースB P プロープについて図4参照) を用い、avidin-biotin-horseradish peroxidase complex (A B C - H R P) は、S I G M A社製のもの (S5512) を用い、o-phenylene diamine (O P D) は、和光純薬株式会社製のもの (161-11851) を用いた。

20

【0039】

(2) 方法及び結果

実施例1で示された、トリプシノーゲンからトリプシンへの分解 (トリプシノーゲンの活性化) に対する糖の抑制効果が、B P T GやB P Tの糖結合性と関連があるかどうかを調べるために、以下のようなELISA法による糖結合性分析を行なった。

B P T G、B P Tをそれぞれ3 m g計り取り、2 . 9 4 m lの1 0 m M T B S (p H 7 . 5) と6 0 μ lの0 . 2 M P M S F溶液を加えて溶解し、4 で1時間、ブレインキュベーションして、1 m g / m lのB P T G溶液、及び、B P T溶液を調製した。これらの溶液を1 0 m M T B S (p H 7 . 5) で0 . 1 ~ 1 5 μ g / m lに希釈し、マイクロタイタープレート (Immulon 1B, Thermo Scientific社製) の各ウエルにそれぞれ1 0 0 μ lずつ添加した。4 、2時間インキュベーションすることによりB P T G及びB P Tをプレートに固定化した。各3 0 0 μ lの1 0 m M T B S (p H 7 . 5) で各ウエルを3回洗浄した後、各3 0 0 μ lの3 % B S A (1 0 m M T B S, p H 7 . 5) を添加して、4 で一晩ブロックした。1 0 m M T B S (p H 7 . 5) に、各糖 (α - M a n、α - M a n - 6 - リン酸、α - G a l、α - G a l N A c、α - N e u A c、β - G a l又はL a c) - B P プロープ又は糖を持たないP A Aプロープを1 0 μ g / m lとなるように加えた溶液を1 0 0 μ lずつ各ウエルに添加して、1時間室温で反応させた。各3 0 0 μ lの1 0 m M T B S (p H 7 . 5) で各ウエルを3回洗浄した後、各1 0 0 μ lの0 . 7 μ g / m l A B C - H R Pを添加して、室温で1時間結合反応させた後、各3 0 0 μ lの1 0 m M T B S (p H 7 . 5) で各ウエルを3回洗浄した。次に、各2 0 0 μ lの発色液 [O P D 8 m g, 5 0 m Mクエン酸リン酸バッファー (p H 5 . 0) 2 0 m l, 3 0 % H₂ O₂ 8 μ l] を各ウエルに添加して、室温で2 5分間発色させた後、各5 0 μ lの2 . 5 N H₂ S O₄ を各ウエルに添加して発色を停止させた。マイクロプレートリーダー (M P R - 8 0, Bio-Rad社製) を用いて、4 9 0 n mの吸光度を測定した。以上の結合実験を、T B Sの代わりに1 0 m M 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 5) を用いても、全く同様の手順で行った。

30

40

【0040】

その結果を図4ならびに図6に示す。

図4からわかるように、B P T GとB P Tは、α - M a nを持つ糖B P - プロープには

50

糖を持たないPAAブローブより高い結合性を示し、 α -GalNAcを持つ糖-BPブローブには、顕著に高い結合性を示した。また、BPTGについて別ロットの製品を用いて同様の実験を行なったが、同様の結果であった。

【0041】

また、図6に示すように、十二指腸内のpHであるpH7.5において、BPTGについて、GalNAcを含む糖鎖を中心に、他の糖BP-ブローブとの結合活性を調べたところ、BPTGが α -GalNAc-BPに対してだけでなく、 β -GalNAc-BPに対する結合活性を持っていることが新たに明らかになった。pH7.5において、 α -NeuAc、 β -Gal、又はLacを持つ糖-BPブローブには、糖を持たないPAAブローブと同程度以下の低い結合性しか示さなかった。したがって、pH7.5においてもBPTGへのGalN及びその誘導体の結合と、BPTG活性化抑制効果があると考えられ、実際にpH5.5および実施例1のpH4.6と同様に、pH7.5においてもBPTG活性化抑制効果が観測されている(データ示さず)。一方、チモーゲン顆粒内のpHであるpH5.5において、BPTGの α -GalNAc-BPに対する結合量は、pH7.5の結果と同様に、BPTG濃度に依存して増強した。図6の結果から、pH5.5においては、pH7.5の場合と比べて α -Man-6-P及び α -Gal-BPに対する結合活性がほとんど消失し、対照的に α -NeuAc-BPに対する結合活性がpH7.5の時と比べて著しく増強した。それ以外の結合する糖の種類にはほとんど差がみられなかった。BPTGやBPTの糖結合性の高低に関するこれらの結果(BPTGに関する図4A、Bおよび図6)の傾向は、実施例1における糖(Me- α -GalNAc、Me- α -Man、Me- α -Gal、Me- β -Gal)のBPTG活性化抑制効果の高低の結果の傾向と一致していた。

【実施例3】

【0042】

3. [SPRによるBPTGと糖との相互作用解析]

SPRを用いて、BPTGと糖との相互作用解析を行なった。操作は全てBIAcore2000(GE Healthcare Bio-Sciences KK)を用い、付属のマニュアルに従って操作を行った。リガンドの固定化はアミンカップリング法を用いて、 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で各ステップを14分間ずつ行った。ランニング緩衝液には、HBS-EP bufferに終濃度0.2 mMになるように0.2 M PMSF-エタノール溶液を加えて使用した。CM5センサーチップをランニング緩衝液で平衡化した後、アミンカップリングキットにより、チップ表面をEDC/NHSで活性化した。リガンドに用いたBPTGやBPTは、あらかじめ2 mg秤りとった後、 $960 \mu\text{L}$ の10 mM $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ buffer (pH 6.0)に溶解し、0.2 M PMSF-エタノール溶液を $40 \mu\text{L}$ 加え(終濃度8 mM)、4、1時間振盪した(ブレインキュベーション)。これを10 mM $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ buffer (pH 6.0)に、保護糖としてMe- α -Man、Me- α -Gal又はD-GalNAcを終濃度が各0.2 Mになるように加えた緩衝液を用いて $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した後、センサーチップにインジェクトして固定化を行った。残っているN-hydroxysuccinimide esterを1.0 M エタノールアミン $\cdot\text{HCl}$ (pH 8.0)でブロックした後、10 mM HClで1分間洗浄してから測定に使用した。固定化されたBPTGは3743.6 RU、BPTは8014.9 RUであった。リファレンスセル(対照セル)には、タンパク質溶液を固定化せずに、同様のEDC/NHS活性化と1.0 M エタノールアミン $\cdot\text{HCl}$ (pH 8.0)によるブロッキングを行ったフローセルを用いた。アナライトには、Me- α -Man、Lac、Me- α -GalNAc、Me- β -Galを、それぞれ0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 Mの濃度になるように、ランニング緩衝液を用いて調製した。アナライトの糖類を含むランニング緩衝液をBPTG固定化センサーチップ上に $20 \mu\text{L}/\text{min}$ の流速で90秒間インジェクトし、次にTBSで溶出を行った。この実験の結果を図7に示す。

【0043】

10

20

30

40

50

図 7 に示すように、Me - α - Man , Lac , Me - β - Gal をアナライトとして添加した際には、インジェクト終了とともに全てのアナライトが解離していた。一方、Me - α - GalNAc をアナライトとして添加したところ、フローセルに固定化した BPTG および BPT (BPT については結果を示していない) と Me - α - GalNAc の結合は、インジェクト終了後もほとんど解離せず、濃度依存的に BPTG や BPT との結合が示された。BPTG や BPT の最大結合量をもとに速度論的解析を行ったところ、BPTG と Me - α - GalNAc との K_A は 1×10^6 (M^{-1})、BPT と Me - α - GalNAc との K_A は 2×10^6 (M^{-1}) と算出された。これは、多くのレクチンと特異的な単糖との K_A が $10^4 \sim 10^5$ (M^{-1}) の範囲であることを考慮すると、BPTG と Me - α - GalNAc との間の結合や、BPT と Me - α - GalNAc との間の結合はかなり強力で有意なものであると考えられる。

10

【実施例 4】

【0044】

4. [トリプシン酵素活性への影響]

(1) 材料

本実験には以下の材料を用いた。

BPT (Bovine pancreatic trypsin) は、Sigma-Aldrich 社製の T1426 を使い、BAPA (N- α -Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride) は、株式会社ペプチド研究所製のものを用い、Me - α - Man (Methyl- α -mannoside) は、Sigma-Aldrich 社製のものを用い、GalN $\cdot$ HCl (D-Galactosamine hydrochloride) は、生化学工業株式会社製のものを用い、GalNAc (N-Acethyl-D-galactosamine) は、和光純薬工業株式会社製の 013-12821 を使い、Me - α - GalNAc (o-Methyl-N-Acetyl-2-deoxy-D-galactosamine) は、Tronto Research Chemicals Inc. 社製の M275310 を用いた。

20

【0045】

(2) 方法および結果

各種の糖について、基質濃度を变化させて BPT の酵素反応速度を測定し、Lineweaver-Burk plot により解析して、各種の糖のトリプシン酵素活性に与える影響について調べた。

トリプシンの酵素活性測定には、基質として BAPA を用いた。BAPA を 14.2 mg 秤量し、1065 μ l の DMSO に完全に溶解した後、0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.9) - 20 mM CaCl₂ - 30 mM NaCl (TBS-Ca) を 2200 μ l 加えて、あらかじめ 10 mM BAPA 溶液を調製した。次いで、この BAPA 溶液をさらに希釈して 0 mM から 3 mM の各濃度の基質 BAPA 溶液を調製した。BPT は 2.4 mg を秤量し、酸性で安定であるため、1 mM HCl - 20 mM CaCl₂ 溶液 0.5 ml に溶解し、200 μ M の BPT 溶液を調製した。この BPT 溶液からさらに希釈して 6 μ M のトリプシン酵素溶液を調製した。Me - α - Man、GalN $\cdot$ HCl、GalNAc、Me - α - GalNAc について TBS-Ca を加えて、1 mM から 0.2 M の各糖溶液を数段階調製した。糖溶液 140 μ l と 6 μ M トリプシン溶液 10 μ l をあらかじめ混合して 15 分間 37 でプレインキュベートした。マイクロプレートに、37 でプレインキュベートした各濃度の基質 BAPA 溶液を 1 ウェルあたり 150 μ l 加え、次に、37 でプレインキュベートした糖 - トリプシン混合溶液を 1 ウェルあたり 150 μ l ずつ加えた。素早く攪拌後、マイクロプレートリーダー Vi ent X (DS Pharma Biomedical) を用いて、30 秒おきに 5 分間 410 nm で吸光度を測定した。基質濃度の逆数 $1/[S]$ を横軸に、反応速度の逆数 $1/[v]$ を縦軸にとり、Lineweaver Burk Plot により解析して、各種の糖の BPT 酵素活性に与える影響について考察した。その結果を図 8 に示す。

30

40

【0046】

図 8 の結果から分かるように、GalN $\cdot$ HCl 濃度を 0 mM から 100 mM に上げると、わずかながら K_m は増加し、 V_{max} が 82 % ($(6.8 \times 100) / 8.3$) に減少した。この変化は非拮抗型の活性阻害に近い変化である (図 8 A)。一方、0 - 100

50

mMの範囲のGalNAc存在下では、BPTの酵素活性は V_{max} で8% ($100 - [(7.7 \times 100) / 8.4]$)の減少にすぎず、 K_m はほとんど変化がなかった(図8B)。対照的にMe- α -Manの存在下では K_m の減少傾向が示された。Me- α -GalNAcについては、5mM以下までの濃度範囲でしか実験できなかったが、 K_m の増加(13%)と、僅かな V_{max} の増加が示唆された。以上、結合性の高い糖によるBPT酵素活性への影響はいずれも小さく、トリブシノーゲンの活性化抑制効果を完全に説明することはできないと考えられた。また、最も影響のあったGalN $\cdot$ HClの結果をDixon plotにより解析すると、非拮抗型(または非拮抗・不拮抗混合型)の阻害形式が示された。参考値として、阻害定数 K_i は約300mMと求められた。これはGalN $\cdot$ HClのBPTG活性化抑制作用が、BPTに対する阻害によるものではなく、BPTGに結合してタンパク質分解から保護する効果が主であることと矛盾しない結果であると考えられる。

10

【実施例5】

【0047】

5. [ELISA法によるBPTGとアプロチニンの結合分析と糖の影響]

(1) 材料

本実験には以下の材料を用いた。

BPTG、BPT、糖及びPMSEは、実施例1と同様の物を用い、アプロチニンはウシ膵臓由来の物をSIGMA社から購入して用い、NH₄S-ビオチン(PIERCE社製)を用いてマニュアル通りにビオチン標識して使用した。ELISAに必要な試薬は実施例2と同様の物を用いた。

20

【0048】

(2) 方法及び結果

膵臓由来の内在性トリブシン阻害剤として知られているアプロチニン(BPTI)との結合が、BPTGやBPTの糖結合性に影響があるかどうかを調べるために、ELISA法による結合性分析を行なった。

実施例2と同様にして、PMSE処理を行ったBPTG溶液、及び、BPT溶液を調製し、これらの溶液を10mM TBS(pH7.5)で希釈し、マイクロタイタープレート(Immulon 1B, Thermo Scientific社製)の各ウエルに添加して、BPTG及びBPTをプレートに固定化した。実施例2と同様にしてTBS(pH7.5)を緩衝液に用いて洗浄した後、BSAによるブロッキングを行った。0.1Mの各糖(Me- α -Man、Me- β -Gal又はGalN $\cdot$ HCl)のTBS(pH7.5)溶液を100 μ lずつ各ウエルに添加して、1時間室温で反応させた。各300 μ lの緩衝液で各ウエルを3回洗浄した後、各100 μ lのビオチン化アプロチニン10 μ g/mlを添加して、室温で1時間結合反応させた。その後、各300 μ lの緩衝液で3回洗浄した後、各100 μ lの0.7 μ g/mlのABC-HRPを添加して、室温で1時間結合反応させた後、各300 μ lの緩衝液で3回洗浄した。次に、各200 μ lの発色液[OPD 8mg, 50mMクエン酸リン酸緩衝液(pH5.0)20ml, 30% H₂O₂ 8 μ l]を各ウエルに添加して、室温で25分間発色させた後、50 μ lの2.5N H₂SO₄を添加して発色を停止させた。各ウエル中の液体について、マイクロプレートリーダー(MPR-80, Bio-Rad社製)を用いて、490nmの吸光度を測定した。その結果を図9に示す。

30

40

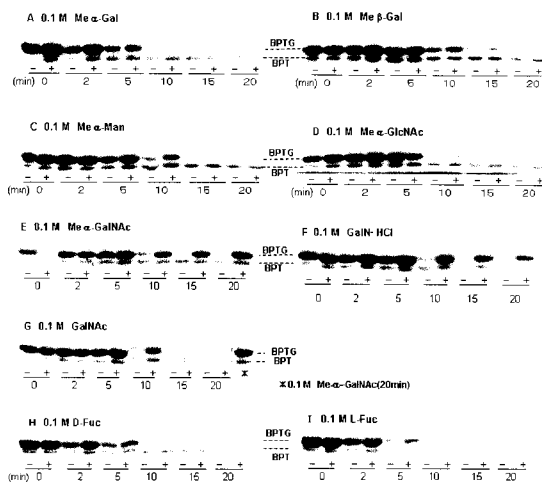
【0049】

図9の結果から分かるように、GalN $\cdot$ HClが存在することによって、BPTGとアプロチニンとの結合が増強することが示された。一方、BPTGと結合しないMe- β -Galや、結合するが活性化阻害をほとんど示さないMe- α -Manでは、糖を含まないコントロールと差が無い結果であった。これらの結果から、GalN誘導体は、上記実施例1~4で示されたトリブシノーゲンを安定化してトリブシンによる分解から保護する効果に加えて、アプロチニン(トリブシンに対する膵臓の内在性阻害剤)とトリブシノーゲンとの結合を増強することにより、活性トリブシンを阻害することによってもトリブシノーゲンを保護する機構が膵細胞内で起こることが予測される。すなわち膵臓内のアプロチニンとトリブシノーゲンの相互作用が、GalN誘導体の存在によって強化される。

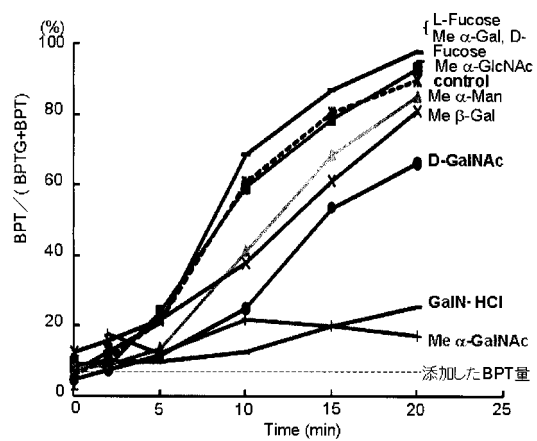
50

ロチニン存在下では、GalN誘導体による膵炎抑制効果はさらに高まることが推測される。

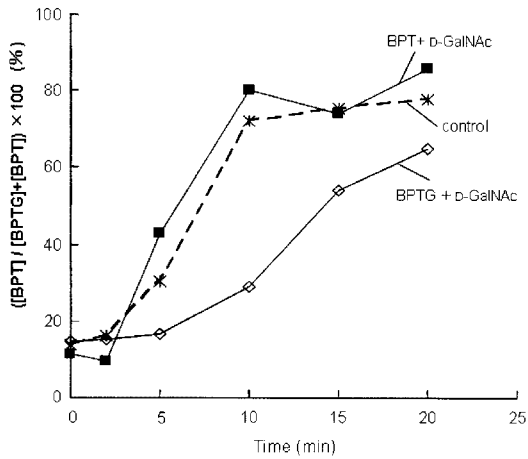
【図 1】



【図 2】



【 図 3 】



【 図 4 】

試薬製造元、商品コード
ロット番号、開封日

BPTG (トリブシノーゲン)

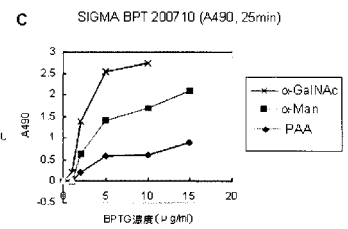
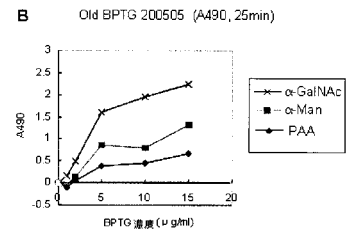
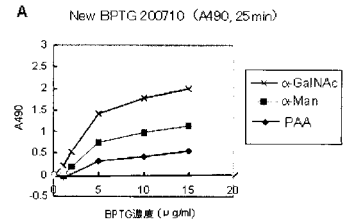
M.P.Bio Cat.No. 101195
Lot.No. 2797J
20071016 open

〔AとBはロットの異なる試料で再現性を調べた結果である〕

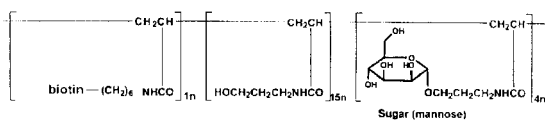
M.P.Bio Cat.No. 101195
Lot.No. 6650H
20050513 open

BPT (トリブソン)

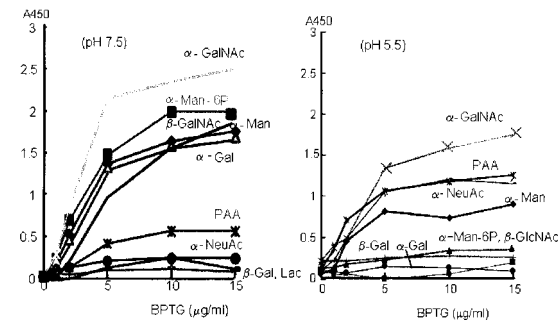
SIGMA T1005-250mMG
Lot. No. 036K7675
200710 open
Activity 11800 BAEE U



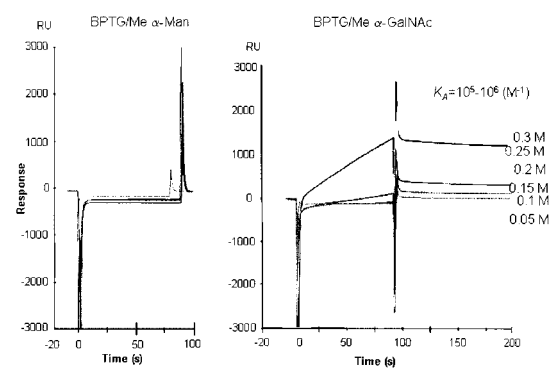
【 図 5 】



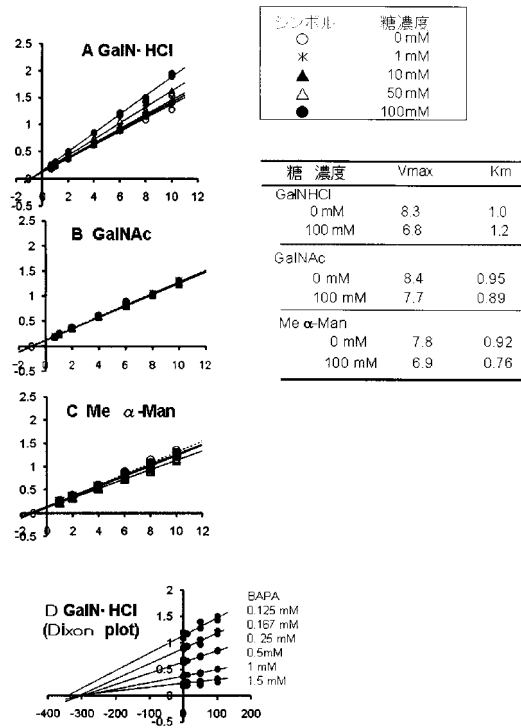
【 図 6 】



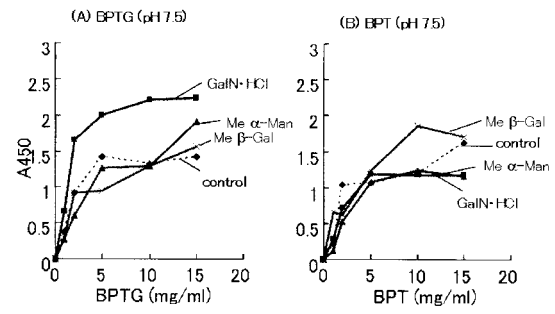
【圖 7】



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

(72)発明者 小川 温子

東京都文京区大塚 2 - 1 - 1 お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科 糖鎖科学教育研究センター兼任

(72)発明者 齊藤 泉

東京都文京区大塚 2 - 1 - 1 お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科

(72)発明者 坂上 ひろみ

東京都文京区大塚 2 - 1 - 1 お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科

Fターム(参考) 4C057 CC04

4C086 AA01 AA02 EA02 MA01 MA04 NA14 ZA66