

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2009年1月15日 (15.01.2009)

PCT

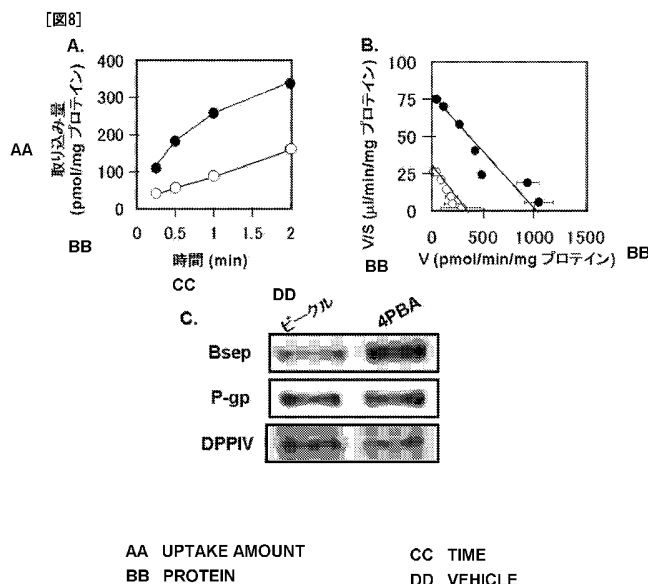
(10) 国際公開番号
WO 2009/008120 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/192 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/001239
- (22) 国際出願日: 2008年5月19日 (19.05.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-182846 2007年7月12日 (12.07.2007) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 杉山雄一 (SUGIYAMA, Yuichi) [JP/JP]; 〒1800013 東京都武蔵野市西久保3-4-10 Tokyo (JP). 林久允 (HAYASHI, Hisamitsu) [JP/JP]; 〒1080075 東京都港区港南3-5-10-2901 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤卓也 (KATO, Takuya) [JP/JP]; 〒1080074 東京都港区高輪1-27-37-830 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 奥原康司, 外 (OKUHARA, Koji et al.); 〒1900023 東京都立川市柴崎町2-9-25 柴崎ドラゴン1号ビル401 ウインググリーン特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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,

[続葉有]

(54) Title: AGENT AND METHOD FOR STABILIZING MEMBRANE PROTEIN

(54) 発明の名称: 膜タンパク質の安定化剤及び安定化方法



(57) Abstract: It is intended to provide an agent and a method for maintaining and promoting stabilization of a membrane protein, particularly a transporter (for example, ABC transporter) on a cell membrane. The invention provides a method for maintaining and promoting the stability of a protein present on a cell membrane by treating a cell with a carboxylic acid or a derivative thereof including 4-phenylbutyric acid thereby suppressing degradation of the protein on the membrane, and an agent for stabilizing a membrane protein containing a carboxylic acid or a derivative thereof including 4-phenylbutyric acid.

(57) 要約: 【課題】本発明は、膜タンパク質、特に、トランスポーター（例えば、ABCトランスポーター）の細胞膜上における安定化を維持、促進するための薬剤及び方法の提供を目的とする。【解決手段】本発明は、4-フェニルブチル酸を含むカルボン酸及びその誘導体

[続葉有]



WO 2009/008120 A1



SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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,

規則4.17に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

で細胞を処理することで、細胞膜上に存在するタンパク質の分解を抑制し、膜上におけるタンパク質の安定性を維持促進する方法、及び、4-フェニルブチル酸を含むカルボン酸及びその誘導体を含有する膜タンパク質の安定化剤を提供する。

明 細 書

膜タンパク質の安定化剤及び安定化方法

技術分野

[0001] 本発明は、膜タンパク質の安定化剤及び安定化方法に関する。より詳細には、本発明はトランスポーターの安定化剤及び安定化方法に関する。

背景技術

[0002] 膜タンパク質は、生体膜に存在し、受容体、トランスポーター（輸送体）、膜酵素として機能する他、膜の構造や運動を維持及び促進する働きを行っている。

膜タンパク質のうち、例えば、トランスポーターは細胞内環境の維持において重要な役割を担っており、その機能的変異は様々な疾患の原因となることが知られている。トランスポーターは、広義には、生体膜に存在し、生体膜を横切る物質輸送の仲介を行うタンパク質のことである。特に、薬物の取り込み及び排出に関与するトランスポーターは、有機アニオンや有機カチオンの輸送を行い、薬物の吸収、排泄など、生体にとって欠くことのできない役割を果たしており、肝臓、腸管、腎臓、脳などの各種臓器を形成する細胞に存在する。

[0003] 薬物の取り込みや排出に関与するトランスポーターの機能が低下すると、毒性を有する物質が細胞内に蓄積して、重篤な疾患の発症への契機になる場合がある。例えば、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2（PFIC2）は、胆管側膜に存在する胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP/ABCB11）の発現における遺伝的欠損が原因の遺伝性疾患で、肝移植などの外科的処置を施さない場合、肝硬変を発症し、生命の危険を招来せしめる難病の1つである。

BSEPは、胆管側膜上に局在するATP結合カセット膜透過トランスポーター（ABCトランスポーター）に分類され、胆汁酸（タウロコール酸）の排出を行っている。BSEPの機能に何らかの障害が発生すると、肝細胞に胆汁酸が蓄積し、その結果、高濃度の胆汁酸の毒性により肝細胞が大きな

ダメージを受けることになる。P F I C 2 患者の遺伝子解析の結果から、B S E P 遺伝子変異として、様々なミスセンス、未成熟ターミネーション、フレームシフト、及びスプライシングジャンクションにおける変異の存在が明らかとなってきた。中でも、2 番目の細胞内ループ及び最初のA T P 結合ドメイン中における2 つのミスセンス変異であるE 2 9 7 G 及びD 4 8 2 G は、P F I C 2 患者においてしばしば見出されている（非特許文献1）。

[0004] B S E P 以外のトランスポーターにおいても、その機能異常による活性の低下が疾患の発症へとつながる例は多く、トランスポーターの活性を有効に維持することは、関連疾患の有効な治療法の開発に寄与する可能性が考えられている。これまでに、細胞膜上における発現が著しく低下する特徴を持つ、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（C F T R / A B C C 7 ; 塩素イオンチャンネル）の変異体（C F T R Δ F 5 0 8）が、4-フェニルブチル酸（4 P B A）により、細胞膜上発現を回復することが報告されている（非特許文献2）。しかし、トランスポーターの細胞膜上への回復を含む、膜上における安定性を維持するメカニズムについては、まだ明らかにされていない。

[0005] 非特許文献1: Hayashi ら, Hepatology, 41: 916-924, 2005

非特許文献2: Ronald ら, Am J. Respir. Crit. Care Med., 157: 484-490, 1998

発明の開示

発明が解決しようとする課題

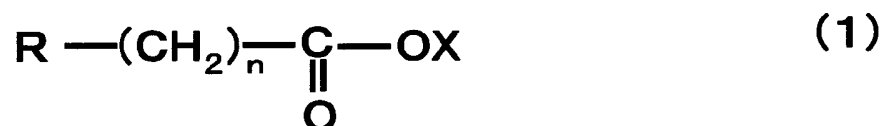
[0006] 本発明は、膜タンパク質、特に、トランスポーター（例えば、A B C トランスポーター）の細胞膜上における安定化剤及び安定化方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、トランスポーターの機能維持及び機能促進を目的として、鋭意研究を重ねた結果、4-フェニルブチル酸（4 P B A とも記する）を含

むカルボン酸が胆管側膜上に存在するBSEPの分解を抑制することを見出し、本発明を完成させた。即ち本発明は、一般式（１）：

[化3]



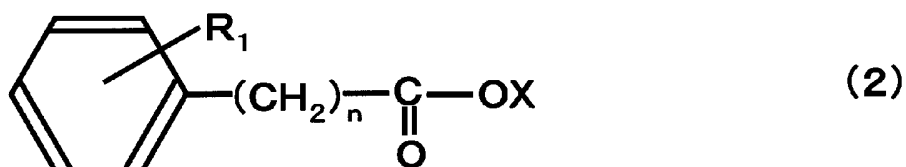
（式中、Rは水素原子、メチル基、又は無置換若しくは置換基を有していてもよいフェニル基を表し、Xは水素原子又はアルカリ金属原子を表し、nは1～8の整数である）

で表される化合物、若しくはその薬剤上許容される塩又はそれらの水和物を有効成分として含有することを特徴とする、膜タンパク質の安定化剤である。

[0008] あるいは、

一般式（２）：

[化4]



（式中、R₁は水素原子又は炭素数1～5のアルキル基を表し、Xは水素原子又はアルカリ金属原子を表し、nは1～8の整数である）

で表される化合物、若しくはその薬剤上許容される塩又はそれらの水和物を有効成分として含有することを特徴とする、膜タンパク質の安定化剤である。

また、上記安定化剤を用いた膜タンパク質の安定化方法である。

さらに、上記安定化剤を含む利胆剤である。

発明の効果

[0009] 本発明に係る安定化剤を用いることにより、膜タンパク質、特に、トランスポーター（例えば、ABCトランスポーター）の膜上における安定性を維持又は促進することができる。

また、本発明の安定化剤を含む薬剤により、トランスポーター（例えば、ABCトランスポーター）（例えば、BSEP）の機能異常により発症する疾患（例えば、胆汁うっ滞性疾患）の治療剤及び治療方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] 図1は、BSEPを発現するMDCK II細胞に対する4PBA処理の時間及び濃度依存的な効果を示す。Aは、BSEPの発現に対する4PBAの時間依存的な効果を示す。野生型、E297G及びD482Gを発現するMDCK II細胞を図に示す時点において1 mM 4PBA処理を行い、粗膜画分を調製した。得られた試料（40 μ g）を6% SDS-PAGEにかけ、ウェスタンブロッティングを行った。Bは、BSEPの発現に対する4PBAの濃度依存的な効果を示す。野生型、E297G及びD482Gを発現するMDCK II細胞を図に示す濃度の4PBAで24時間処理を行い、粗膜画分を調製した。得られた試料（40 μ g）を6% SDS-PAGEにかけ、ウェスタンブロッティングを行った。

[図2] 図2は、BSEPのMDCK II細胞表面上での発現に対する4PBA処理の効果を示す。実験の行う前に、野生型、E297G、D482G BSEP及びGFPを発現する細胞を1 mM 4PBAの存在下又は非存在下において24時間処理を行った。BSEPの細胞表面上での発現は経細胞輸送アッセイ及び細胞表面ビオチン化法により測定した。Aは、MDCK IIの単層培養を横切る [3 H] TCの経細胞輸送の経時変化を示す。黒丸、黒四角及び白丸、白四角は、各々、4PBA存在下及び非存在下で処理したMDCK II細胞を示す。丸と四角は、基底側から頂端側方向、及び頂端側から基底側方向の経細胞輸送を示す。各点及び垂直のバーは、3回の測定値の平均値±標準誤差である。Bは、MDCK II単層培養の頂端膜を横切る

[^3H] TCの経細胞輸送の様子を示す。野生型、E297G、D482G BSEP及びGFPを発現するMDCK II単層培養の頂端膜を横切る [^3H] TC輸送のクリアランスを測定した。各バーは3回の測定の平均値±標準誤差を表す。スチューデントテストによるコントロールとの有意差 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

[図3] 図3は、ビオチン化分析による細胞表面発現の測定結果を示す。細胞尿面画分をビオチン化法により単離し、得られた試料に対し、6%SDS-PAGE後、ウェスタンブロッティングを行った。

[図4] 図4は、MDCK II細胞でのBSEP発現に対する、4PBAの転写及び翻訳への影響を検討した結果を示す。Aは、BSEPMRNAの発現レベルのリアルタイムPCRによる測定結果である。各反応におけるBSEPの発現量は、GAPDHの発現量により標準化した。各バーは、3回の測定の平均値±標準誤差を表す。B及びCは、アクチノマイシンDによる転写阻害(B)及びシクロヘキシミドによる翻訳阻害(C)条件下での、4PBAによるBSEPの上方制御について検討した結果である。野生型、E297G及びD482G BSEPを発現するMDCK II細胞を、1mM 4PBAの存在下又は非存在下において、アクチノマイシンD ($5\mu\text{g}/\text{ml}$)の有無、又はシクロヘキシミド ($20\mu\text{g}/\text{ml}$)の有無の条件下にて、6時間(E297G及びD482G BSEP)又は8時間(野生型BSEP)処理を行った。40 μg の試料を6%SDS-PAGEにかけ、その後、ウェスタンブロッティングを行った。

[図5] 図5は、MDCK II細胞中のBSEPの成熟過程に対する4PBA処理の影響を調べた結果である。Aは、BSEPの成熟経過を調べた結果である。野生型、E297G及びD482G BSEPを発現するMDCK II細胞を、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BFAの存在下又は非存在下において、1mM 4PBAの添加又は非添加で処理を行った。BFAによって蓄積した未成熟の低分子量BSEPが、成熟型の高分子量BSEPへ変換される様子を確認するために、1mM 4PBAの存在下又は非存在下においてBFAを経時的に

洗い流し、粗膜画分を調製した。得られた試料の $40\mu\text{g}$ を $6\%\text{SDS-PAGE}$ にかき、ウェスタンブロッティングを行った。Bは、Aに示す成熟型BSEPのバンド密度を定量した結果を示す。バンド強度は、Image Gauge softwareで定量化した。黒丸及び白丸は、各々、4PBAの存在下及び非存在下において、成熟型BSEPのバンドから得られるシグナルの強度を示す。

[図6] 図6は、MDCK I I細胞表面上に存在するBSEPの分解速度に対する4PBAの効果を調べた結果である。Aは、細胞表面に存在する野生型とE297G BSEPの分解速度について検討した結果を示す。野生型及びE297G BSEPを発現するMDCK I I細胞を 1mM 4PBAの存在下又は非存在下において処理を行った。細胞表面をビオチン化した後、 1mM 4PBAの存在下又は非存在下にて、図中に示す時間、 37°C で培養した。残存したビオチン化タンパク質は、ストレプトタビジンビーズを用いて単離し、 $6\%\text{SDS-PAGE}$ で分離後、ウェスタンブロッティングを行った。Bは、Aに示される野生型及びE297G BSEPのバンド密度を定量した結果である。バンド強度は、Image Gauge softwareで定量化し、0時間の強度に対する比率で示した。黒丸及び白丸は、各々、4PBAで処理したMDCK I I細胞及び処理しなかったMDCK I I細胞の表面上に残存する各BSEPの値を示す。各バーは、3回の実験の平均値 \pm 標準誤差を表す。同様な方法により、P-gp及びDPP IVについても測定した。

[図7] 図7は、MDCK I I細胞表面上に存在するD482G BSEPの分解速度に対する4PBAの効果を調べた結果である。Aは、低温(27°C)条件下におけるD482G BSEPの細胞表面上における発現について検討した結果である。D482G BSEPを発現するMDCK I I細胞を 27°C 、24時間培養した後、細胞表面をビオチン化した。ビオチン化したタンパク質は、ストレプトタビジンビーズを用いて単離し、 $6\%\text{SDS-PAGE}$ で分離後、ウェスタンブロッティングを行った。Bは、細胞表面に存

在するD 4 8 2 G B S E Pの分解速度を調べた結果である。D 4 8 2 G B S E Pを発現するMDCK I I細胞は、1 mM 4 P B Aの存在下又は非存在下において、2 7℃で2 4時間培養した。Aと同じ方法により、調製した試料を6 % S D S - P A G Eで分離後、ウェスタンブロッティングを行った。Cは、Dに示されるD 4 8 2 G B S E Pのバンド密度を定量した結果である。Bと同様な方法で定量化し、グラフ化した。

[図8]図8は、SDラットの胆管側膜上のB S E Pの発現に対する4 P B Aの影響を検討した結果である。実験の行う前に、雄のSDラット（6 - 7週齢）に、チューブを介して0. 6 g / k g / 日用量で1 0日間4 P B A又はビークルを与えた。4 P B A又はビークルは3回に分けて与えた。Aは、C M V sによる時間依存的な $[^3\text{H}]$ T Cの取り込みを示す。4 P B A処理（黒丸）及びビークル処理（白丸）のSDラットから調製したC M V sを5 mm o l / LのA T P又はAMPの存在下、3 7℃でインキュベートした。 $[^3\text{H}]$ T Cの濃度は1 μ Mであった。 $[^3\text{H}]$ T Cの取り込みは、A T P存在下の値からAMP存在下での値を差し引いて算出した。各点及び水平のバーは、3回の実験の平均値±標準誤差を表す。Bは、 $[^3\text{H}]$ T CのC M V sによる取り込みのホフステープロットを示す。4 P B A処理（黒丸）及びビークル処理（白丸）のSDラットから調製したC M V sを5 mm o l / LのA T P又はAMPの存在下、3 7℃で0. 5分間又は1分間インキュベートした。 $[^3\text{H}]$ T Cの濃度は1 μ Mであった。 $[^3\text{H}]$ T Cの取り込みは、A T P存在下の値からAMP存在下での値を差し引いて算出した。各点及び水平のバーは、3回の実験の平均値±標準誤差を表す。Cは、C M V sに対するウェスタンブロッティングの結果を示す。4 P B A処理及びビークル処理のSDラットから調製したC M V s（1 0 μ g）は、6 % S D S - P A G E後ウェスタンブロッティングを行った。

[図9]図9は、B S E Pを発現するMDCK I I細胞に対する4 P B A又はオクタン酸（O c t a n o i c a c i d）処理の効果を示す。野生型B S E Pを発現するMDCK I I細胞を1 mM 4 P B A又はオクタン酸で、2 4

時間処理を行い、細胞表面画分をビオチン化法により単離し、得られた試料に対し、6% SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行った。

[図10] 図10は、野生型BSEPを発現したMDCK II 単層培養の頂端膜を横切る [3H] TCの経細胞輸送に対する、4PBA、Propionic acid (プロピオン酸)、Butyric acid (ブタン酸)、Octanoic acid (オクタン酸) 及びDecanoic acid (デカン酸) 処理の効果を示す。野生型BSEPを発現するMDCK II 単層培養細胞を、1mM 4PBA、プロピオン酸、ブタン酸、オクタン酸及びデカン酸の存在下又は非存在下において24時間処理のち、頂端膜を横切る [3H] TC輸送のクリアランスを測定した。各バーは3回の測定の平均値±標準誤差を表す。スチューデントテストによるコントロールとの有意差 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

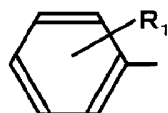
[図11] 図11は、MDCK II 細胞表面上に存在するBSEPの分解速度に対するオクタン酸 (Octanoic acid) の効果を調べた結果である。Aは、細胞表面に存在する野生型BSEPの分解速度について検討した結果を示す。野生型BSEPを発現するMDCK II 細胞を1mM オクタン酸の存在下又は非存在下において処理を行った。細胞表面をビオチン化した後、1mM オクタン酸の存在下又は非存在下にて、図中に示す時間、37°Cで培養した。残存したビオチン化タンパク質は、ストレプトタビジンビーズを用いて単離し、6% SDS-PAGE で分離後、ウェスタンブロッティングを行った。Bは、Aに示される野生型BSEPのバンド密度を定量した結果である。バンド強度は、Image Gauge software で定量化し、0時間の強度に対する比率で示した。黒丸は、カルボン酸無処理のMDCK II 細胞表面上に残存する各BSEPの値 (コントロール)、白丸及び黒四角は、各々、4PBA又はオクタン酸で処理したMDCK II 細胞表面上に残存する各BSEPの値を示す。各バーは、3回の実験の平均値±標準誤差を表す。

発明を実施するための最良の形態

[0011] 一般式（１）において、Rは、水素原子、メチル基、又は無置換若しくは置換基を有していてもよいフェニル基を表し、Xは水素原子又はアルカリ金属原子を表し、nは１～８の整数を表す。この場合、好ましくは、Rはメチル基であり、nは１、２、６又は８である。

あるいは、一般式（１）において、Rは下記式で表され（ただし、R₁は水素原子又は炭素数１～５のアルキル基を表す）、Xは水素原子又はアルカリ金属原子を表し、nは１～８の整数を表す。

[化5]



この場合、好ましくは、R₁は水素原子であり、nは３である。

本発明の一般式（１）で表される化合物は、当業者にとって公知の方法により製造することができるが、市販のものを購入することも可能である（例えば、Scandinavian Formulas Inc.）。

[0012] 本発明は、膜タンパク質の細胞膜上での安定性の維持又は促進のための薬剤及び方法を提供するものである。

ここで、膜タンパク質とは、生体膜を構成するタンパク質のことで、好ましくは、トランスポーター、特に好ましくは、ABCトランスポーターであり、例えば、MDR1、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5、MRP6、BCRP、OCT1、OCT2、OCTN2、OAT-K1、OATP-A、OATP-2、LST1、BSEPなどを挙げることができる。最も好ましくは、BSEP（bile salt export pump）（例えば、ヒトBSEPの配列として、配列番号１及び配列番号２を参照のこと）である。あるいは、BSEPと同様に肝細胞毛細胆管側膜上に発現しているABCトランスポーターであるMRP2も、本発明のトランスポーターとして好適である。MRP2は、フェニルブチル酸により安定化が起こり、その機能異常は、黄疸を惹起し、肝機能障害を引き起こす。

[0013] 本発明に係る薬剤は、生体に対して悪影響を及ぼさない医薬組成物の形態で膜タンパク質、特に、トランスポーターの機能異常に関連する疾患の治療薬として使用することができる。通常、そのような組成物には、本発明の化合物の他、薬剤上許容される担体が含まれる。

「薬剤上許容される担体」は、溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌及び抗真菌剤、アイソトニックに作用して吸着を遅らせる薬剤及びその類似物を含み、薬剤的投与に適するもののことである。該担体及び該担体を希釈するために好ましいものの例には、限定はしないが、水、生理食塩水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、コラーゲン、ヒト血清アルブミン、有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等などが含まれる。また、リポソーム及び不揮発性油などの非水溶性媒体も用いられる。さらに、本発明の化合物の活性を保護又は促進するような特定の化合物が、該組成物中に含まれていてもよい。

[0014] 本発明に係る医薬組成物は、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入なども含む）、経皮及び経粘膜への投与を含み、治療上適切な投与経路に適合するように製剤化される。非経口、皮内、又は皮下への適用に使用される溶液又は懸濁液には、限定はしないが、注射用の水などの滅菌的希釈液、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒、ベンジルアルコール又は他のメチルパラベンなどの保存剤、アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなどの無痛化剤、エチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）などのキレート剤、酢酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩などの緩衝剤、塩化ナトリウム又はデキストロースなど浸透圧調製

のための薬剤を含んでもよい。

pHは塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調製することができる。非経口的標品はアンプル、ガラスもしくはプラスチック製の使い捨てシリンジ又は複数回投与用バイアル中に収納される。

[0015] 注射に適する医薬組成物には、滅菌された注射可能な溶液又は分散媒、使用時に調製するための滅菌水溶液（水溶性の）又は分散媒及び滅菌されたパウダーが含まれる。静脈内の投与に関し、適切な担体には生理食塩水、静菌水、又はリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が含まれる。注射剤として使用する場合、組成物は滅菌的でなくてはならず、また、シリンジを用いて投与されるために十分な流動性を保持していなくてはならない。該組成物は、調剤及び保存の間、化学変化及び腐食等に対して安定でなくてはならず、細菌及び真菌などの微生物由来のコンタミネーションを防止する必要がある。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及び適切な混合物を含む溶媒又は分散媒培地を使用することができる。例えば、レクチンなどのコーティング剤を用い、分散媒においては必要とされる粒子サイズを維持し、界面活性剤を用いることにより適度な流動性が維持される。種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、及びチメロサルなどは、微生物のコンタミネーションの防止に対して使用可能である。また、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール及び塩化ナトリウムのような等張性を保つ薬剤が組成物中に含まれてもよい。吸着を遅らせることができる組成物には、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの薬剤が含まれる。

[0016] 滅菌的な注射可能な溶液は、必要な成分を単独で、又は他の成分と組み合わせた後に、適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を加え、滅菌することで調製される。一般に、分散媒は、基本的な分散培地及び上述したその他の必要成分を含む滅菌的媒体中に活性化化合物を取り込むことにより調製される。滅菌的な注射可能な溶液を調製するための滅菌的パウダーの調製方法には、活性

な成分及び滅菌溶液に由来する何れかの所望な成分を含むパウダーを調製する真空乾燥及び凍結乾燥が含まれる。

- [0017] 経口組成物には、不活性な希釈剤又は体内に取り込んでも害を及ぼさない担体が含まれる。経口組成物には、例えば、ゼラチンのカプセル剤に包含されるか、加圧されて錠剤化される。経口的治療のためには、活性化合物は賦形剤と共に取り込まれ、錠剤、トローチ又はカプセル剤の形態で使用される。また、経口組成物は、流動性担体を用いて調製することも可能であり、流動性担体中の該組成物は経口的に適応される。さらに、薬剂的に適合する結合剤、及び／又はアジュバント物質などが包含されてもよい。

錠剤、丸薬、カプセル剤、トローチ及びその類似物は以下の成分又は類似の性質を持つ化合物の何れかを含み得る：微結晶性セルロースのような賦形剤、アラビアゴム、トラガント又はゼラチンなどの結合剤；スターチ又はラクトースなどの、アルギン酸、PRIMOGE L、又はコーンスターチなどの膨化剤；ステアリン酸マグネシウム又はSTRROTESなどの潤滑剤；コロイド性シリコン二酸化物などの滑剤；スクロース又はサッカリンなどの甘味剤；又はペパーミント、メチルサリチル酸又はオレンジフレーバーなどの香料添加剤。

- [0018] 本発明の化合物は、植込錠及びマイクロカプセルに封入された送達システムなどの徐放性製剤として、体内から即時に除去されることを防ぎ得る担体を用いて調製することができる。エチレンビニル酢酸塩、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの、生物分解性、生物適合性ポリマーを用いることができる。このような材料は、当業者によって容易に調製することができる。また、リポソームの懸濁液も薬剂的に受容可能な担体として使用することができる。有用なリポソームは、限定はしないが、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG誘導ホスファチジルエタノール（PEG-PE）を含む脂質組成物として、使用に適するサイズになるように、適当なポアサイズのフィルターを通して調製され、逆相蒸発法によって精製される。

[0019] 本発明の化合物による特定の疾患の予防又は治療において、適切な投与量レベルは、投与される患者の状態、投与方法等に依存するが、当業者であれば、容易に最適化することが可能である。

注射投与の場合は、例えば、一日に患者の体重あたり約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $500 \text{mg}/\text{kg}$ を投与するのが好ましく、一般に一回又は複数回に分けて投与され得るであろう。好ましくは、投与量レベルは、一日に約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $250 \text{mg}/\text{kg}$ であり、より好ましくは一日に約 $0.5 \mu\text{g} \sim$ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ である。

経口投与の場合は、組成物は、好ましくは 1.0 から 1000mg の活性成分を含む錠剤の形態で提供され、好ましくは活性成分が $1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 750.0, 800.0, 900.0$ 及び 1000.0mg である。化合物は一日に $1 \sim 4$ 回の投与計画で、好ましくは一日に一回又は二回投与される。

[0020] 医薬組成物又は製剤は、一定の投与量を保障すべく、均一単位投与量により構成されなくてはならない。単位投与量は、患者の治療に有効な一回の投与量を含み、薬剤的に受容可能な担体と共に製剤化された一単位のことである。本発明の単位投与量を決定する場合には、製剤化される化合物の物理的、化学的特徴、期待される治療上の効果、及び該化合物に特有な製剤化における留意事項等により影響を受ける。

[0021] 本発明の医薬組成物はキットの形態で、容器、パック中に投与の説明書と共に含めることができる。本発明に係る薬剤組成物がキットとして供給される場合、該薬剤組成物のうち異なる構成成分が別々の容器中に包装され、使用直前に混合される。このように構成成分を別々に包装するのは、活性構成成分の機能を失うことなく長期間の貯蔵を可能にするためである。

[0022] キット中に含まれる試薬は、構成成分が活性を長期間有効に持続し、容器の材質によって吸着されず、変質を受けないような何れかの種類の容器中に

供給される。例えば、封着されたガラスアンプルは、窒素ガスのような中性で不反応性ガスの下において包装されたバッファーを含む。アンプルは、ガラス、ポリカーボネート、ポリスチレンなどの有機ポリマー、セラミック、金属、又は試薬を保持するために通常用いられる他の何れかの適切な材料などから構成される。他の適切な容器の例には、アンプルなどの類似物質から作られる簡単なボトル、及び内部がアルミニウム又は合金などのホイルで裏打ちされた包装材が含まれる。他の容器には、試験管、バイアル、フラスコ、ボトル、シリンジ、又はその類似物が含まれる。容器は、皮下用注射針で貫通可能なストッパーを有するボトルなどの無菌のアクセスポートを有する。

[0023] また、キットには使用説明書も添付される。当該医薬組成物からなるキットの使用説明は、紙又は他の材質上に印刷され、及び／又はフロッピー（登録商標）ディスク、CD-ROM、DVD-ROM、Zipディスク、ビデオテープ、オーディオテープなどの電氣的又は電磁的に読み取り可能な媒体として供給されてもよい。詳細な使用説明は、キット内に実際に添付されていてもよく、あるいは、キットの製造者又は分配者によって指定され又は電子メール等で通知されるウェブサイトに掲載されていてもよい。

[0024] さらに、本発明には、膜タンパク質、特にトランスポーターの機能異常に関連した疾患に罹患した、又は罹患する危険性のある哺乳動物の該疾患に関する予防又は治療方法も含まれる。

ここで「治療」とは、前記疾患に罹患するおそれがあるか又は罹患した哺乳動物において、該疾患の病態の進行を阻止又は緩和することを意味し、治療的処置のみならず予防的処置をも含む広い意味として使用される。

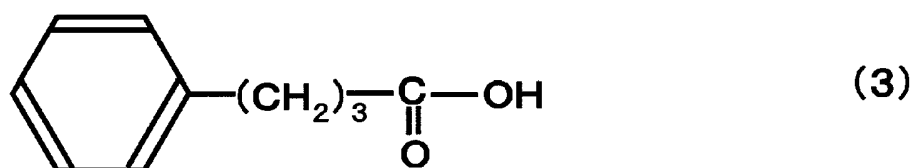
治療の対象となる「哺乳動物」は、哺乳類に分類される任意の動物を意味し、特に限定はしないが、例えば、ヒトの他、イヌ、ネコなどのペット動物、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマなどの家畜動物などのことである。特に好ましい「哺乳動物」は、ヒトである。

実施例

[0025] 以下に本発明につき、式（３）に示すフェニルブチル酸塩の他、プロピオン酸塩、ブタン酸塩、オクタン酸塩及びデカン酸塩を用い、トランスポータータンパク質であるＢＳＥＰの胆管側膜上における安定性の維持、促進を例として、以下に詳細に説明する。

なお、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[化6]



[0026] 方法及び試薬類

1. 試薬類

医薬品グレードのフェニルブチル酸（４ＰＢＡ）及び他のカルボン酸（プロピオン酸、ブタン酸、オクタン酸及びデカン酸）は、Scandinavian Formulas Inc. から購入した。[³H] タウロコール酸（２Ｃｉ／ＰＡ）はNEN Life Science Products社から購入した。ヒトＢＳＥＰ、Ｐ－糖タンパク質（Ｐ－ｇｐ）（Ｃ２１９）、及びジペプチジルペプチダーゼⅣ（ＤＰＰⅣ）に対する抗体は、Santa Cruz Biotechnology社、Signet社及びBD Biosciences社（CA）からそれぞれ購入した。rＢＳＥＰに対する抗血清はオリゴペプチド（rＢＳＥＰのＣ末端、ＡＹＹＫＬＶＩＴＧＡＰＩＳ（配列番号３））に関し、ウサギを用いて作成した。その他すべての試薬類は分析用グレードを用いた。ＭＤＣＫⅠⅠ細胞は、１０％ ＦＢＳ、ペニシリン（１００Ｕ／ｍｌ）、及びストレプトマイシン（１００Ｕ／ｍｌ）を含むＤＭＥＭ培地（Invitrogen社）中、３７℃、５％ＣＯ₂及び９５％湿度の条件下で培養した。

2. リコンビナントアデノウィルスの調製

ヒト野生型、Ｅ２９７Ｇ及びＤ４８２Ｇ ＢＳＥＰのリコンビナントアデ

ノウィルスを調製するために、BD Adeno-X Adenoviral Expression System (BD Biosciences 社)を用いた (Hayashira, Hepatology, 41:916-924, 2005、を参照のこと)。ウィルスの力価はAdeno-X Rapid Titer Kit (Clontech社)でチェックした。コントロールとして、GFPを保持するリコンビナントアデノウィルスを用いた。

[0027] 3. 4PBA、オクタン酸処理

MDCK II細胞を6ウェルプレートに 2.5×10^5 細胞/ウェルの密度となるように播いた。24時間培養後、コンフルエントになった細胞に対し、野生型、E297G、D482G BSEP、及びGFPのcDNAを保持するリコンビナントアデノウィルスで、200MOIにて感染させた。4PBA又はオクタン酸処理は、処理期間及び処理濃度を変えて行った。4PBA又はオクタン酸処理の終了後、粗膜画分を調製した (Mitra, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290:G550-G556, 2006を参照のこと)。得られた試料を6%SDS-PAGEで分離し、ウェスタンブロッティングを行った (Hayashira, Hepatology, 41:916-924, 2005、を参照のこと)。抗体反応は、ECL (Amersham Biosciences社)で検出した。成熟型BSEPを示すバンドの強度をMulti Gauge software Ver 2.0 (Fujifilm社)で定量した。

4. 経細胞輸送アッセイ

MDCK II細胞を、24ウェルプレートのトランスウェルメンブレンインサート (ポアサイズ $3 \mu\text{M}$ 、Falcon)上に、 1.5×10^5 細胞/インサートの密度になるように播いた。培養2日後、コンフルエントになった細胞に対し、野生型、E297G、D482G BSEP、及びGFPのcDNAを保持するリコンビナントアデノウィルスで、50MOIにて感染さ

せた。感染後、細胞を24時間培養し、次いで、1mM 4PBA又は他のカルボン酸（プロピオン酸、ブタン酸、オクタン酸及びデカン酸）で処理した。24時間処理後、経細胞輸送アッセイを行った（Mitraら, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G550-G556, 2006を参照のこと）。

頂端膜を横切る見かけの排出値（ PS_{apical} ）は、2時間の $[^3H]$ TCの経細胞輸送に対する定常速度を実験の終了時（2時間後）の $[^3H]$ TCの細胞内濃度で割ることにより算出した。

[0028] 5. 細胞表面のビオチン化と細胞表面発現タンパク質の分解速度の測定

MDCK II細胞を6ウェルプレートに 2.5×10^5 細胞/ウェルとなるように播いた。培養24時間後、コンフルエントになった細胞に対し、野生型、E297G、D482G BSEP、及びGFPのcDNAを保持するリコンビナントアデノウィルスで、200MOIにて感染させた。感染後、細胞を24時間培養し、次いで、1mM 4PBA又はオクタン酸で処理した。24時間処理後、ビオチン化を行った（Hayashiら, *Hepatology*, 41:916-924, 2005、を参照のこと）。

細胞表面に存在するタンパク質の分解速度を測定する場合、ビオチン化したMDCK II細胞は、可溶化前、1mMの4PBA又はオクタン酸の存在下又は非存在下にて、37℃で、一定時間インキュベーションした。残存したビオチン化タンパク質を単離し、6%SDS-PAGE後、ウェスタンブロットティングを行った。

6. BSEP mRNAレベルの測定

MDCK II細胞を6ウェルプレートに 2.5×10^5 細胞/ウェルとなるように播いた。培養24時間後、コンフルエントになった細胞に対し、野生型、E297G、D482G BSEP、及びGFPのcDNAを保持するリコンビナントアデノウィルスで、50MOIにて感染させた。感染後、細胞を24時間培養し、次いで、1mM 4PBAで処理した。24時間処理後、RNAをISOGEN（Wako Pure Chemical Ind

dustries社)を用いて添付の説明書に従い単離した。37℃で1時間、DNase I 処理をした後、逆転写反応を行った(Hayashiら, Hepatology, 41:916-924, 2005、を参照のこと)。BSEP mRNAレベルはリアルタイム定量PCRにより、定法に従い測定した。定量PCRは以下のプライマーを用いて行った。

BSEP : 5' - dAGTGGGGGAGCTGAATACAA-3' (配列番号4)

5' - dCCAATGGTGGCTGCTCCAAT-3' (配列番号5)

GAPDH : 5' - AACGACCCCTTCATTGAC-3' (配列番号6)

5' - TCCACGACATACTCAGCAC-3' (配列番号7)

なお、各反応におけるBSEP遺伝子の発現はGAPDHの発現により標準化した。

[0029] 7. アクチノマイシンD (ActD) 及びシクロヘキシミド (CHX) 処理

MDCK II 細胞を6ウェルプレートに 2.5×10^5 細胞/ウェルとなるように播いた。培養24時間後、コンフルエントになった細胞に対し、野生型、E297G、D482G BSEP、及びGFPのcDNAを保持するリコンビナントアデノウィルスで、200MOIにて感染させた。感染後36時間細胞を培養し、その後、mRNA合成を阻害するために $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアクチノマイシンDの存在下(Sigma社)又は非存在下で、あるいは、タンパク質合成を阻害するために $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のシクロヘキシミドの存在下(Sigma社)又は非存在下で処理を行った。2時間の処理後、アクチノマイシンD又はシクロヘキシミドの存在下又は非存在下において、1mMとなるように4PBAを添加した。4PBA処理後6時間(E297G、D482G BSEP)又は8時間(野生型 BSEP)の時点で、粗膜画分を調製した。得られた画分を6%SDS-PAGEで分離した後、ウェス

タンブロットティングを行った。

8. ブレフェルジンA洗浄実験

MDCK II細胞を6ウェルプレートに 2.5×10^5 細胞/ウェルとなるように播いた。培養24時間後、コンフルエントになった細胞に対し、野生型、E297G、D482G BSEP、及びGFPのcDNAを保持するリコンビナントアデノウィルスで、200MOIにて感染させた。感染後12時間細胞を培養し、その後、小胞体からゴルジ体へのBSEPの輸送を阻害するために $5 \mu\text{g/ml}$ のブレフェルジンAの存在下（Sigma社）又は非存在下で処理を行った。2時間の処理後、ブレフェルジンAの存在下又は非存在下において、1mMとなるように4PBAを添加した。4PBA処理後12時間の時点で、粗膜画分を調製した。得られた画分を6%SDS-PAGEで分離した後、ウェスタンブロットティングを行った。

[0030] 9. 動物実験

雄のSDラット（6-7週齢）をNippon SLCから購入した。全ての動物は昼夜を逆転させ、標準的な条件下、動物愛護の精神にて取り扱った。食餌及び水は制限することなく与えた。

なお、本研究は学内の動物実験委員会の定めるガイドラインに従って行った。

SDラットに対し、チューブを介して4PBA又はビークルを一定の期間（5、10、15日間）、種々の用量（0.2、0.6、2.4kg/日）で与えた。4PBA処理後、インビボにおける $[^3\text{H}]$ TC注入実験を行った（Hiranoら, Mol Pharmacol 68:800-807, 2005を参照のこと）。生理食塩水に溶解させた $[^3\text{H}]$ TCを大腿静脈へ挿入したカニューレを介して、90分間に70ng/分/kgの速度で注入した。血液及び胆汁を特定の時間で採取した。血漿、胆汁及び肝臓からの放射活性を測定した。

10. 薬物動態解析

血漿の総クリアランス（ CL_{total} ）、循環する血漿で標準化した胆汁のク

リアランス ($CL_{bile, plasma}$)、及び肝臓における濃度で標準化した胆汁のクリアランス ($CL_{bile, liver}$) を以下の式で算出した；

$$CL_{total} = I / C_{ss, plasma}$$

$$CL_{bile, plasma} = V_{ss, bile} / C_{ss, plasma}$$

$$CL_{bile, liver} = V_{ss, bile} / C_{ss, liver}$$

(I 、 $C_{ss, plasma}$ 、 $V_{ss, bile}$ 及び $C_{ss, liver}$ は、各々、注入速度 ($ng / 分 / kg$)、定常状態の血漿濃度 ($ng / 分 / kg$)、定常状態の胆汁排出速度 ($ng / 分 / kg$) 及び平均肝臓濃度 (ng / ml) を表す)。定常状態の血漿濃度 ($C_{ss, plasma}$) は、15、30、60及び90分の時点における血漿 [3H] TC濃度の平均値である。胆汁排出速度 ($V_{ss, bile}$) は、10～15分、25～30分、55～60分及び85～90分間における、 [3H] TCの胆汁排出速度の平均値である。 $C_{ss, liver}$ は、インビボの実験の終了時点における肝臓 [3H] TC濃度の平均値である。

[0031] 11. 胆管側膜ベジクルによる輸送アッセイ

雄のSDラット (6～7週齢) に対し、0.6 kg / 日の4PBA又はビークを、10日間、3回に分けて与えた。胆管側膜ベジクルをラットの肝臓から調製し (Akitaら, *Biochim Biophys Acta*, 1511: 7-16, 2001)、ウェスタンブロッティング及び輸送アッセイに用いた。トランスポートアッセイは迅速濾過法により行った (Hayashiら, *Biochim Biophys Acta*, 1738: 54-62, 2005)。

[0032] 結果

1. 4PBA又はオクタン酸を介した細胞表面上におけるBSEPの上方制御

野生型、E297G及びD482Gを発現するMDCKII細胞に対し、4PBA処理を行った (図1A及びB)。発明者らは、これまでに膜表面上の成熟型BSEPと小胞体中存在する未成熟型BSEPの分子量が、各々、173 kDaと150 kDaであることを報告している (Hayashiら

, *Hepatology*, 41:916-924, 2005)。粗膜画分に対するウェスタンブロッティングにより、成熟型BSEPの発現レベルを調べることににより、4PBAの効果を検討した。4PBA処理により、成熟型BSEPの発現レベルは、E297G及びD482Gのみならず、野生型の発現レベルも変化した。処理の至適条件は、1mM 4PBAによる24時間処理（臨床適用量）で、この条件の処理により、野生型、E297G及びD482G BSEPの発現量が2.5倍～3倍に上昇した。

また、野生型のBSEPを1mM オクタン酸（Octanoic acid）で24時間処理した場合にも、発現量の上昇が認められた（図9）。

[0033] 次に、4PBA又は他のカルボン酸によるBSEPの細胞表面での発現上昇を、経細胞輸送アッセイ及び細胞表面ビオチン化法を用いて検討した。

経細胞輸送アッセイについては、頂端側への $[^3\text{H}]$ TCの排出をメディエートするBSEPの機能に関し、MDCKIIの単層培養の横切る $[^3\text{H}]$ TCの経細胞輸送を測定した（図2）。頂端側への方向性のある $[^3\text{H}]$ TC輸送は、野生型、E297G及びD482G BSEPを発現するいずれの細胞において観察されたが、GFPを発現する細胞ではほとんど観察されなかった。

野生型、E297G及びD482G BSEPを発現するMDCKII単層細胞を横切る $[^3\text{H}]$ TCの基底側から頂端側への排出は、4PBA処理（1mM、24時間）により、各々、1.5倍、2.5倍及び3倍に増大した。一方、GFPを発現する細胞では、このような効果は見られなかった。また、4PBAは、いずれのMDCKII細胞においても頂端側から基底側への排出には影響を与えなかった。

また、4PBAと同様に他のカルボン酸（プロピオン酸、ブタン酸、オクタン酸、デカン酸）で野生型BSEPを処理した場合にも、基底側から頂端側への $[^3\text{H}]$ TCの排出が増大した（図10）。

[0034] BSEPの機能に対する4PBA処理の効果を直接確認するため、BSEPの機能に必要な動力的パラメーターである、 PS_{apical} （Hayash

ら, *Hepatology*, 41:916-924, 2005; Mitra
ら, *Drug Metab Dispos*, 34:1575-1591, 2006)を算出した(図2B)。PS_{apical}は、4PBA処理により、野生型、E297G及びD482G BSEPを発現するMDCK II細胞において増加したが、GFPを発現する細胞では変化を示さなかった。野生型、E297G及びD482G BSEPを発現するMDCK IIにおけるBSEP依存性PS_{apical} (PS_{apical, BSEP})を、野生型、E297G及びD482G BSEPを発現するMDCK IIのPS_{apical}からGFPを発現するMDCK IIのPS_{apical}を差し引いて算出した。野生型、E297G及びD482G BSEPを発現するMDCK IIのPS_{apical, BSEP}は、至適条件下(1mM、24時間)での4PBA処理によって、各々、1.7倍、3.0倍及び2.8倍増加した。

さらに、野生型及び変異型BSEPの細胞表面での発現を、MDCK II細胞における細胞表面ビオチン化法により検討した(図3A)。野生型、E297G及びD482G BSEPの細胞表面での発現は、至適条件下(1mM、24時間)での4PBA処理によって、各々、1.8倍、3.1倍及び2.6倍増加した。一方、外来性のP-gp及び内在性のジペプチジルペプチダーゼIV(DPP IV)の発現は影響を受けなかった(図3B)。4PBA処理によりBSEPの細胞表面発現の増加レベルとPS_{apical, BSEP}の増加レベルが同等であったことから、臨床適用濃度での4PBA処理は、細胞表面における野生型、E297G及びD482G BSEPの発現を増加させることにより、BSEPの輸送能力を促進することが示唆された。

[0035] 2. BSEPの細胞表面発現の増加に対する4PBAの転写及び翻訳への影響

4PBA処理がBSEPの細胞表面上での発現を増加させるメカニズムについて検討した。4PBAがBSEPタンパク質の転写あるいは翻訳レベルを上昇させることにより、細胞表面での発現が増加している可能性が考えられた。4PBA処理の有無によるMDCK II細胞中でのBSEP mRNA

の発現を定量的PCRにより測定した。BSE P mRNAの発現量は、4 PBAによって影響を受けないGAPDH mRNAの発現量により標準化した。野生型、E 2 9 7 G及びD 4 8 2 G BSE P mRNAの発現量は4 PBA処理により、僅かに上昇したが、その上昇値は統計的に有意ではなかった ($P=0.10$ (野生型)、 0.20 (E 2 9 7 G及びD 4 8 2 G)、図4 A)。

次に、アクチノマイシンD及びシクロヘキシミドで前処理したMDCK I I細胞を用いて、BSE Pの発現増加に関し、4 PBA処理の転写及び翻訳への影響について検討した(図4 B及びC)。アクチノマイシンDによる転写阻害及びシクロヘキシミドによる翻訳阻害は、野生型、E 2 9 7 G及びD 4 8 2 G BSE Pを発現するMDCK I I細胞における、4 PBAを介したBSE P成熟型の発現増加に対して影響を与えなかった。これらの結果から、主として、翻訳後のメカニズムが4 PBAを介するBSE Pの細胞表面での発現増加に寄与していることが示された。

[0036] 3. BSE Pの成熟に対する4 PBA処理の影響

成熟型BSE Pの細胞表面での発現増加に関与する可能性のある翻訳後メカニズムの1つとして、小胞体に存在する未成熟型BSE Pから細胞表面上の成熟型BSE Pへの変換過程の促進が考えられる。BSE Pの成熟に対する4 PBA処理の効果を評価するため、ブレフェルジンA (BFA)を用いて、小胞体からゴルジ体へのBSE Pの輸送を阻害し、BFAを洗い流した後、MDCK I I細胞上における成熟速度を測定した。BFAは、未成熟な小胞体存在型BSE Pの蓄積を引き起こす薬剤である(図5 A及びB)。成熟速度は、BFAを洗い流した後、成熟型BSE Pのバンド密度の増加量を経時的にウェスタンブロッティングにより測定することで評価した。成熟型のバンド密度は、各測定時におけるバンド密度から0時間における密度を差し引いて算出した(図5 B)。MDCK I I細胞中での、BFAを洗い流した直後の野生型、E 2 9 7 G及びD 4 8 2 G BSE Pの未成熟な小胞体存在型の発現レベルは、4 PBA処理の有無にかかわらずほぼ同じであった(図

5 A ; 0 時間) 。また、成熟型については、B F A の洗い流し後 3 時間までは 4 P B A の有無にかかわらず発現レベルに変化はなかったが、3 時間後から直線的に増加し始めた。B F A の洗い流し後 8 時間の時点において、4 P B A で処理しない M D C K I I 細胞と比較すると、4 P B A で処理した M D C K I I 細胞では、成熟型の発現レベルがより高かった。この結果から、4 P B A 処理は、野生型、E 2 9 7 G 及び D 4 8 2 G B S E P の成熟を促進せずに、これら成熟型を安定化することが示唆された。

4. 細胞表面存在型 B S E P の半減期の 4 P B A 又はオクタン酸による延長

細胞表面に存在する B S E P は、胆管側膜と細胞内コンパートメントとの間を循環し、最終的にはタンパク質分解経路によって除去される。従って、分解経路へのエントリーのブロックにより、細胞表面における B S E P の発現の増加が誘導される可能性も考えられた。そこで、細胞表面に存在する B S E P が分解経路に入ることが、4 P B A 処理により阻害されるかどうか検討するため、野生型、E 2 9 7 G 及び D 4 8 2 G B S E P を発現する M D C K I I 細胞表面の B S E P の分解速度を、ビオチン標識法を用いて測定した。細胞表面に存在する野生型及び E 2 9 7 B S E P の半減期は、4 P B A 処理によって、各々、1. 8 倍及び 2. 5 倍長くなった (図 6 A 及び B) 。また、野生型 B S E P については、4 P B A に代えてオクタン酸を用いた場合にも同様の結果が得られた (図 1 1) 。

一方、外来性の P - g p 及び内在性のジペプチジルペプチダーゼ I V (D P P I V) は影響を受けなかった (図 6 A 及び B) 。細胞表面に存在する D 4 8 2 G B S E P の分解速度は、発現量が少なかったため、野生型及び E 2 9 7 G と同じ測定条件下では検出することができなかった。そこで、D 4 8 2 G B S E P に関し、変異型のミスフォールドされたタンパク質の輸送を正しく補正することが知られている低温処理の効果について検討を行った (D e n n i n g ら, N a t u r e 3 5 8 : 7 6 1 - 7 6 4 , 1 9 9 2 ; P l a s s ら, J H e p a t o l 4 0 : 2 4 - 3 0 , 2 0 0 4) (図 7 A) 。低温条件下 (2 7 ° C) で細胞を 2 4 時間培養すると、細胞表面上での

発現が4倍増加した。その後、37℃で細胞表面に存在するD482GBSE Pの分解速度を測定したところ、4PBA処理により細胞表面上での半減期が3.3倍になった（図7B及びC）。この結果から、4PBAの処理によってBSE Pの成熟型が安定化されることが明らかとなった（図5A及びB）

[0037] 5. インビボ条件下での胆管側膜上で発現するBSE Pの4PBAによる上方制御

4PBAの処理により、MDCK II細胞表面での野生型、E297G及びD482GBSE Pの機能的な発現を増加させることができる（図2及び3）。そこで、インビボにおいても4PBAが同じ効果を示すか検討するために、SDラットを用いて実験を行った。SDラットに対する4PBAの適量は、子供に対して承認されている用量（0.45–0.6 g/kg/日）に従って決定した。0.6 g/kg/日の用量の4PBAで10日間繰り返し処理した後に $[^3\text{H}]$ TC注入実験を行った。ビークル処理と4PBA処理のSDラットとの間で、 $[^3\text{H}]$ TCの $C_{ss, \text{ plasma}}$ 、 $V_{ss, \text{ bile}}$ に有意差はみられなかったが、4PBA処理のSDラットにおける $[^3\text{H}]$ TCの $C_{ss, \text{ liver}}$ は、ビークル処理のラットの $C_{ss, \text{ liver}}$ の1/2であった（表1及び2）。従って、ビークル処理と4PBA処理のSDラットとの間で、 $[^3\text{H}]$ TCに対する CL_{total} 及び $CL_{\text{bile, plasma}}$ に有意差はみられなかった。逆に、4PBA処理のラットの $[^3\text{H}]$ TCに対する $CL_{\text{bile, liver}}$ は、ビークル処理のラットと比べて2倍大きかった。これらの結果から、胆管側膜を介する $[^3\text{H}]$ TCの胆汁排出は促進されていることが示唆された。

4PBAの至適な処理条件を検討するために、種々の時間及び用量に関して $[^3\text{H}]$ TC注入実験を行った（表1及び2）。至適条件は、4PBAによる0.6 g/kg/日用量での10～15日間処理であった。全ての条件下において明らかな副作用はみとめられなかった。

[0038]

[表1]

	ビークル (N=9)	4PBA (5日) (N=6)	4PBA (10日) (N=9)	4PBA (15日) (N=3)
$C_{ss, plasma}$ (ng/ml)	2.0±0.2	2.3±0.3	2.0±0.2	2.1±0.2
$C_{ss, liver}$ (ng/ml)	5.1±0.6	3.1±0.5 ^{**}	2.6±0.5 ^{***}	2.3±0.2 ^{**}
$V_{ss, bile}$ (ng/min/kg)	64.4±2.1	64.9±7.8	67.9±6.8	68.9±2.4
CL_{total} (ml/min/kg)	29.4±3.8	26.6±3.8	30.7±3.7	27.5±2.7
$CL_{bile, plasma}$ (ml/min/kg)	31.4±4.2	32.3±8.5	32.3±2.9	33.2±2.0
$CL_{bile, liver}$ (ml/min/kg)	14.2±3.0	21.7±3.0 [*]	29.3±6.1 ^{***}	29.9±1.5 ^{***}

データは、平均値±標準誤差で示す。

スチューデント t-テストによるビークル処理SDラットとの有意差 (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001)

[0039] [表2]

	ビークル (N=9)	4PBA (0.2g/kg/日) (N=3)	4PBA (0.6g/kg/日) (N=9)	4PBA (2.4g/kg/日) (N=3)
$C_{ss, plasma}$ (ng/ml)	2.0±0.2	2.6±0.2	2.0±0.2	3.3±0.7
$C_{ss, liver}$ (ng/ml)	5.1±0.6	3.8±0.7	2.6±0.5 ^{***}	5.9±1.8
$V_{ss, bile}$ (ng/min/kg)	64.4±2.1	66.5±1.6	67.9±6.8	73.3±6.4
CL_{total} (ml/min/kg)	29.4±3.8	26.6±3.8	30.7±3.7	29.6±3.5
$CL_{bile, plasma}$ (ml/min/kg)	31.4±4.2	26.3±2.0	32.3±2.9	23.9±4.7
$CL_{bile, liver}$ (ml/min/kg)	14.2±3.0	19.0±3.9	29.3±6.1 ^{***}	19.2±3.2

データは、平均値±標準誤差で示す。

スチューデント t-テストによるビークル処理SDラットとの有意差(***, P < 0.001).

[0040] 胆管側膜上でのBSEPの発現増加が胆管側膜を介した^[3H]TCの胆汁

排出の促進と関連するかどうか検討するため、胆管側膜ベジクル（CMVs）を用いてベジクルの取り込み実験及びウェスタンブロットティングを行った。CMVsは0.6 g/kg/日用量で4 PBA又はビークル処理を10日間繰り返し行ったSDラットから調製した。4 PBA処理ラット由来のCMVsによるATP依存的な $[^3\text{H}]$ TCの取り込みは、0.5分間直線的に上昇し、ビークル処理ラットのCMVsの0.5分後の取り込み量と比較すると、3倍であった（図8A）。4 PBA処理ラット及びビークル処理ラット由来のCMVsへの $[^3\text{H}]$ TCの取り込みの初期速度は、各々、 13.5 ± 2.4 及び $9.5 \pm 1.0 \mu\text{M}$ の K_m 値を持つ単一の飽和成分で表された（図8B）。 $[^3\text{H}]$ TCの V_{max} 値は、4 PBA処理により 270 ± 20 から $1,000 \pm 110$ に増大した（図8B）。さらに、CMVsのウェスタンブロットティングにより、BSEPの発現レベルが4 PBA処理によって3.2倍増加したのに対し、P-gp及びDPP IVの発現レベルは変化がなかったことも明らかとなった（図8C）。これらの結果から、SDラットにおいて、ヒトに対する臨床適用量の4 PBA処理によって、胆管側膜上の機能的なBSEPの発現レベルが増加し、胆管膜を介した胆汁酸の輸送が促進されることが示唆される。

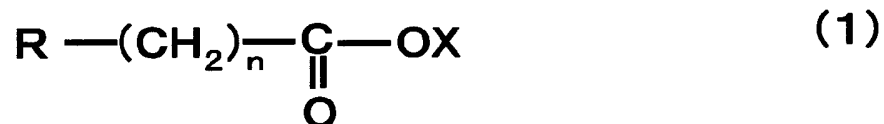
産業上の利用可能性

[0041] 本発明の安定化剤及び安定化方法は、膜タンパク質、特に、トランスポーター（例えば、ABCトランスポーター）の細胞膜上における安定性を維持、促進することから、トランスポーター（例えば、ABCトランスポーター）の活性の促進を実現することができる。従って、該トランスポーターの機能異常に関連する疾患の治療剤及び治療方法の開発に大いに貢献するものである。

請求の範囲

[1] 一般式 (1) :

[化1]



(式中、Rは水素原子、メチル基、又は無置換若しくは置換基を有していてもよいフェニル基を表し、Xは水素原子又はアルカリ金属原子を表し、nは1～8の整数である)

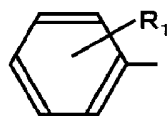
で表される化合物、若しくはその薬剤上許容される塩又はそれらの水和物を有効成分として含有することを特徴とする、膜タンパク質の安定化剤。

[2] 前記Rがメチル基であることを特徴とする請求項1に記載の安定化剤。

[3] nが1、2、6又は8であることを特徴とする請求項2に記載の安定化剤。

[4] 前記Rが以下の置換基、

[化2]



(ただし、R₁は水素原子又は炭素数1～5のアルキル基を表す) であることを特徴とする請求項1に記載の安定化剤。

[5] 前記R₁が水素原子、nが3であることを特徴とする請求項4に記載の安定化剤。

[6] 前記膜タンパク質がトランスポーターであることを特徴とする請求項1乃至5のいずれかに記載の安定化剤。

[7] 前記トランスポーターがABCトランスポーターであることを特徴とする請求項6に記載の安定化剤。

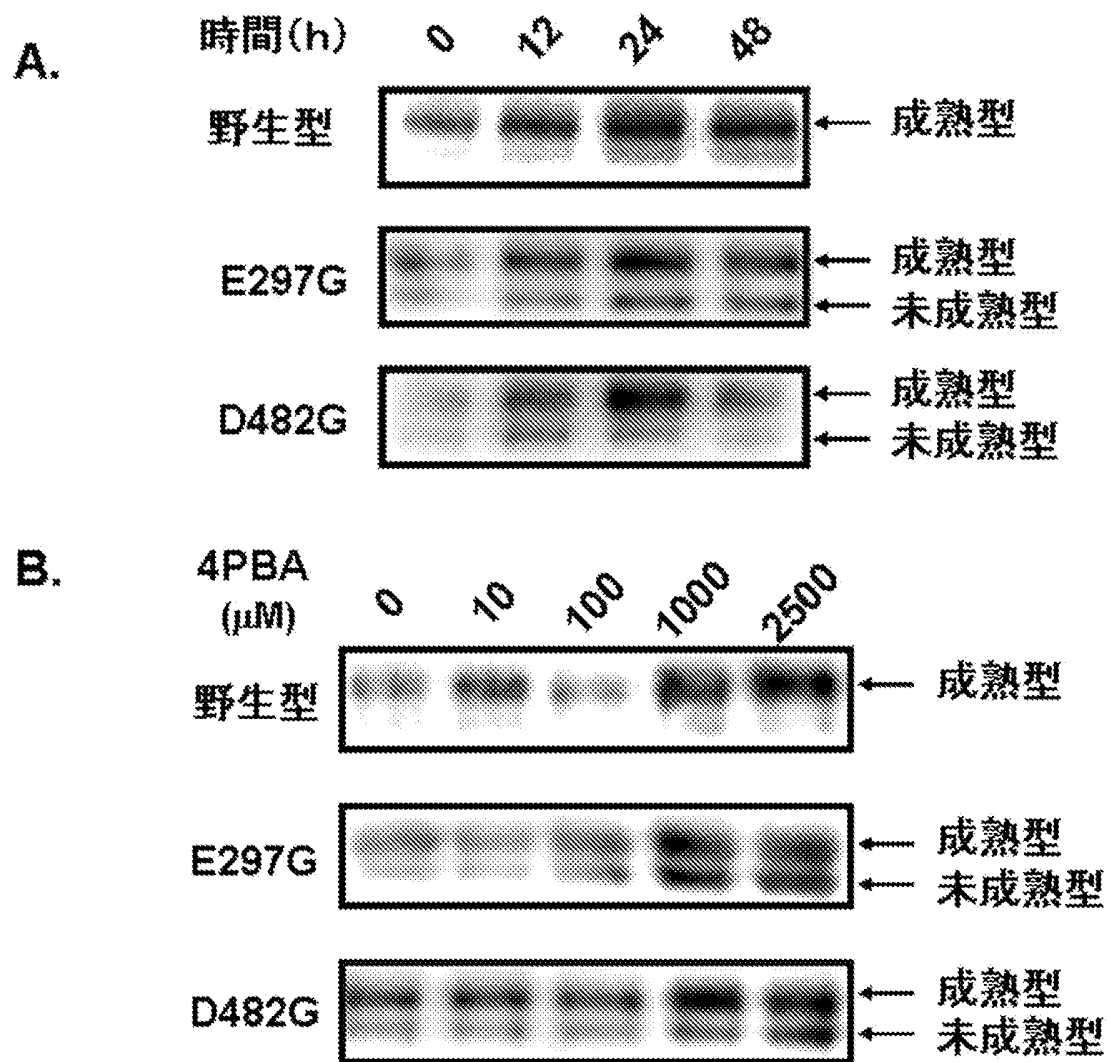
[8] 前記ABCトランスポーターがBSEPであることを特徴とする請求項7

に記載の安定化剤。

[9] 前記ABCトランスポーターがMRP2であることを特徴とする請求項7に記載の安定化剤。

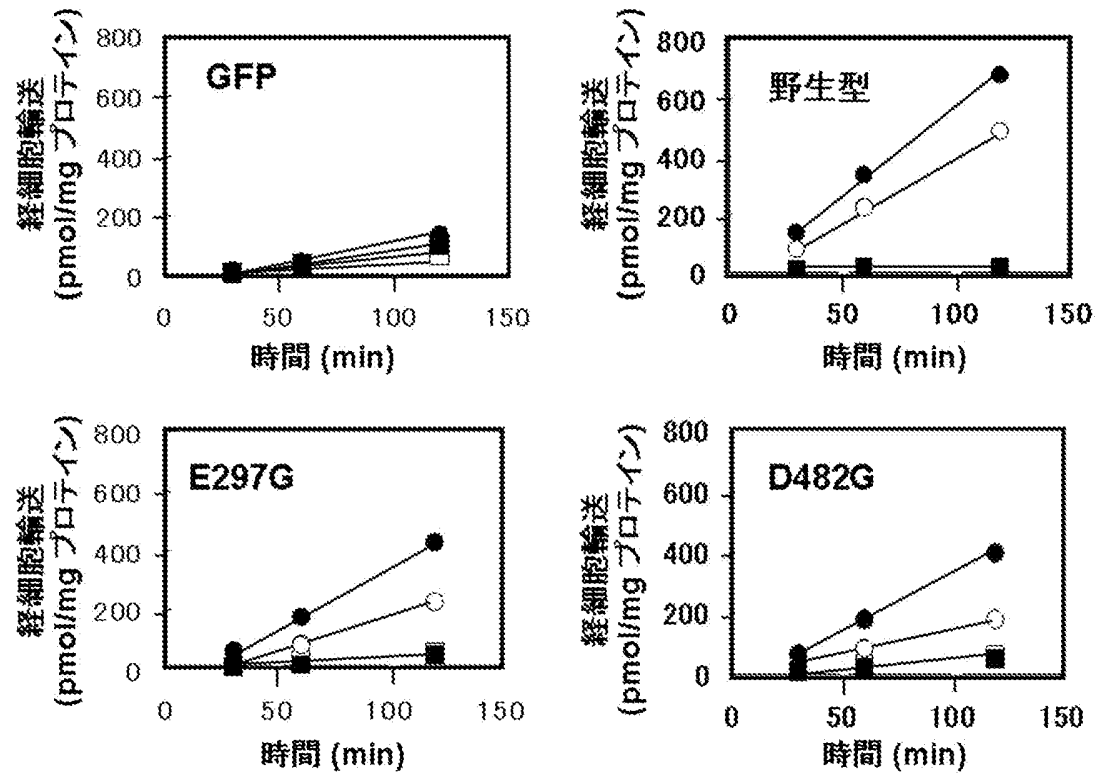
[10] 請求項8に記載の安定化剤を含む利胆剤。

[図1]

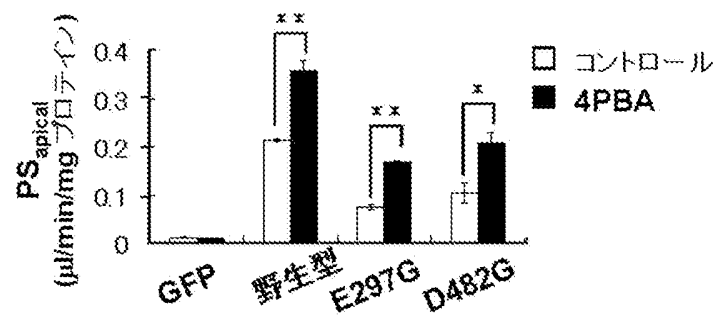


[図2]

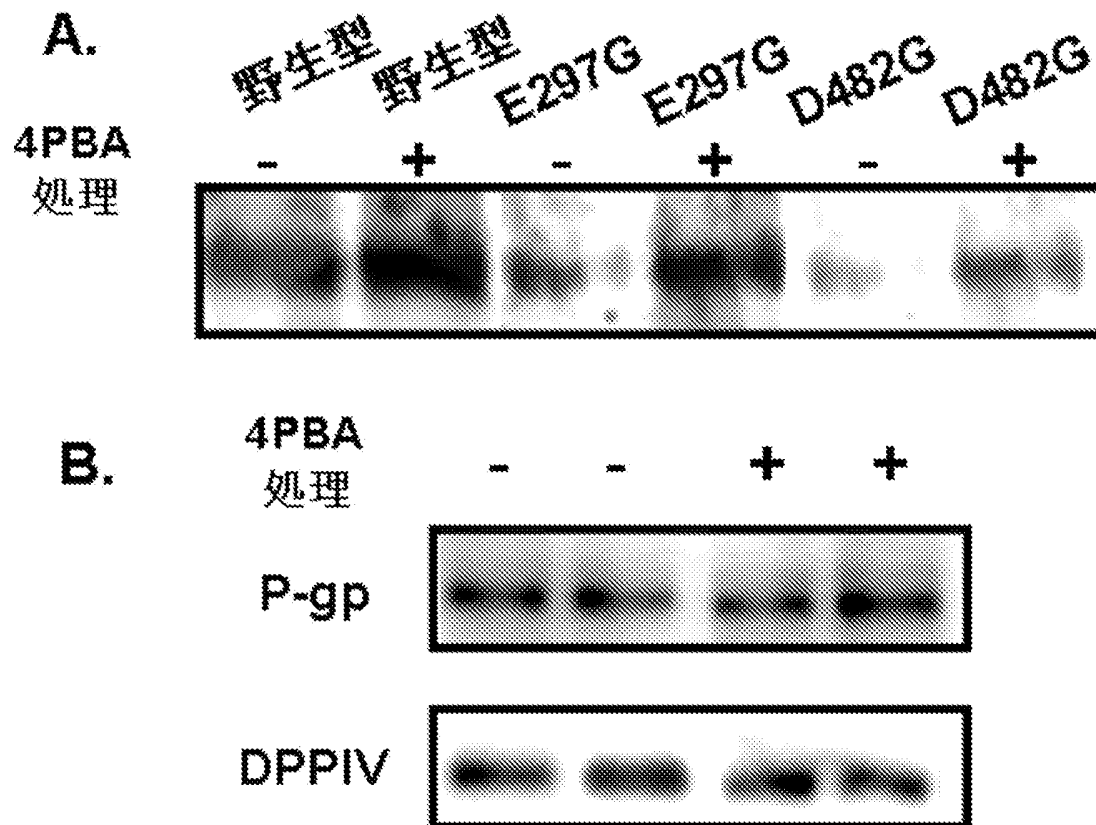
A.



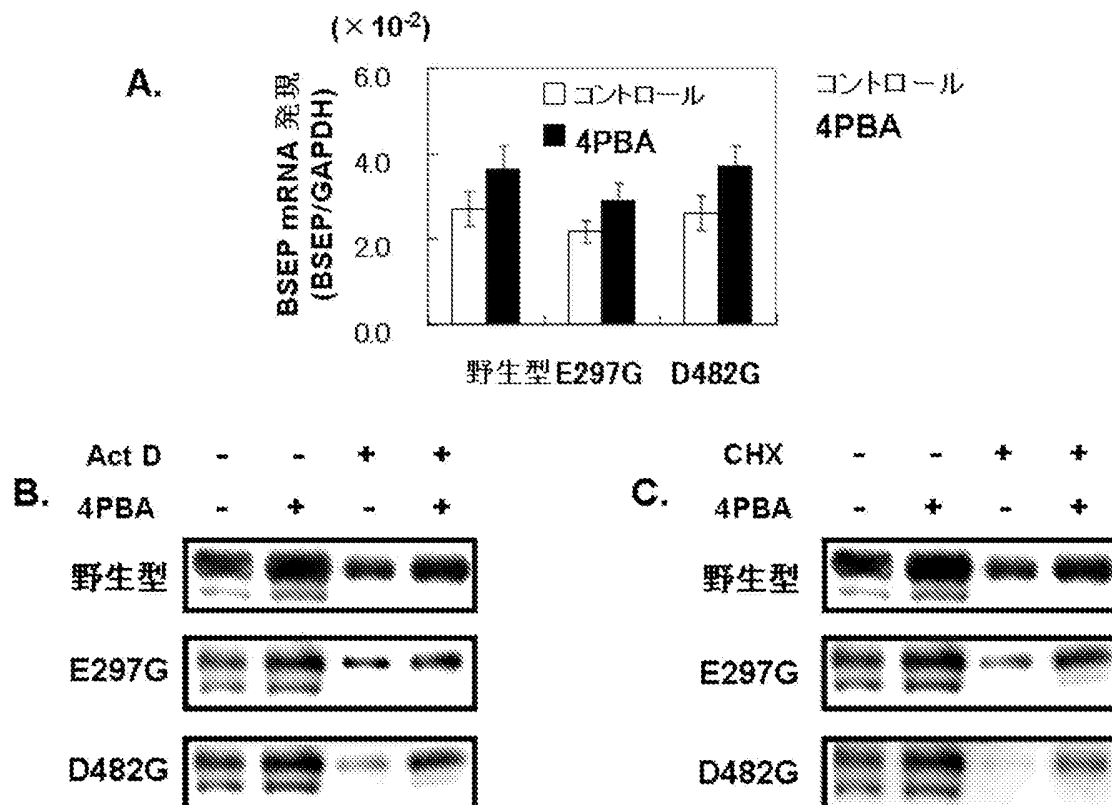
B.



[図3]



[図4]



A.

4PBA - +

BFA - +

洗浄時間 (h) 0 1 3 8 0 1 3 8

野生型 成熟型 未成熟型

E297G 成熟型 未成熟型

D482G 成熟型 未成熟型

B.

野生型 E297G D482G

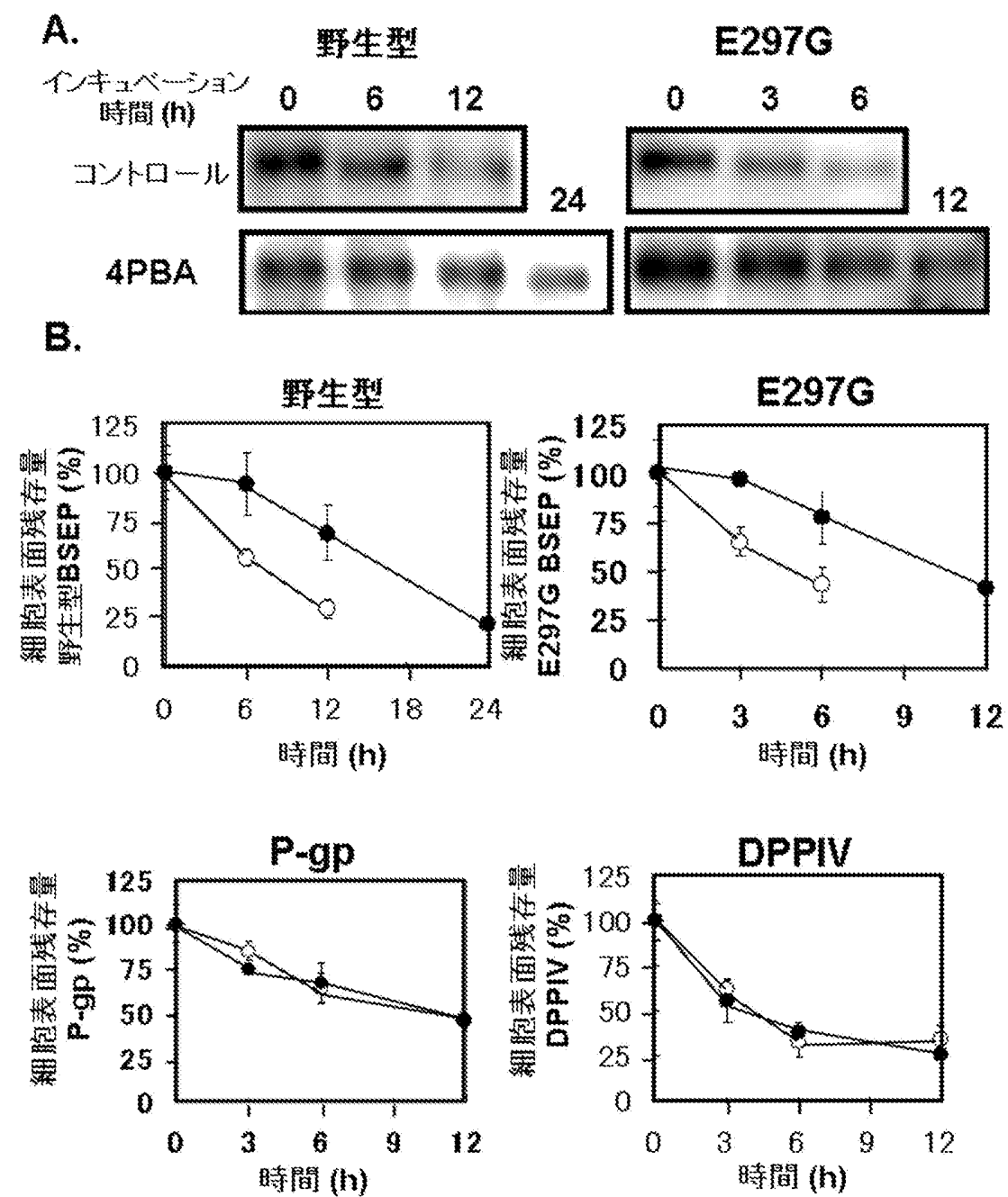
170kDa BSEP 免疫ゲル (arbitrary unit)

時間 (h) 0 3 9

時間 (h) 0 3 9

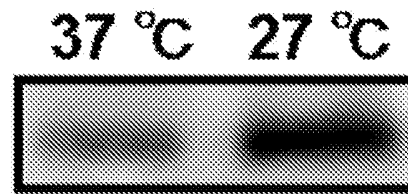
時間 (h) 0 3 9

[図6]

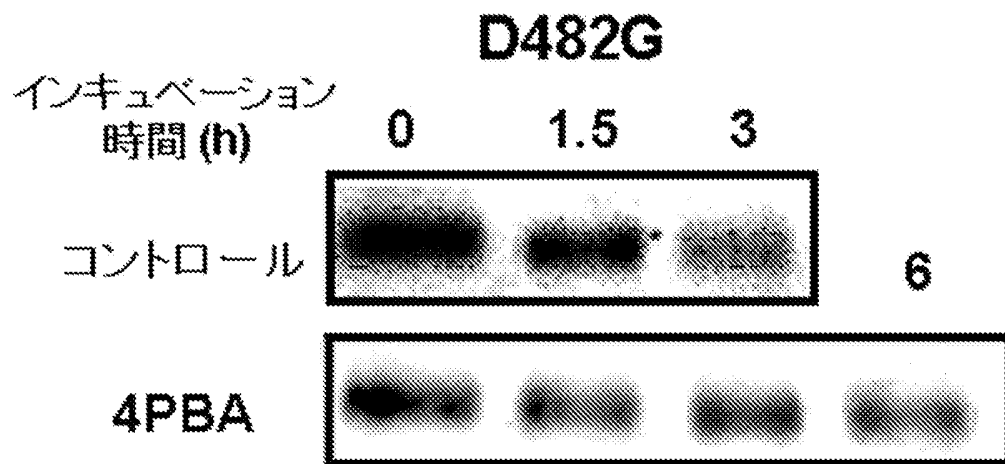


[図7]

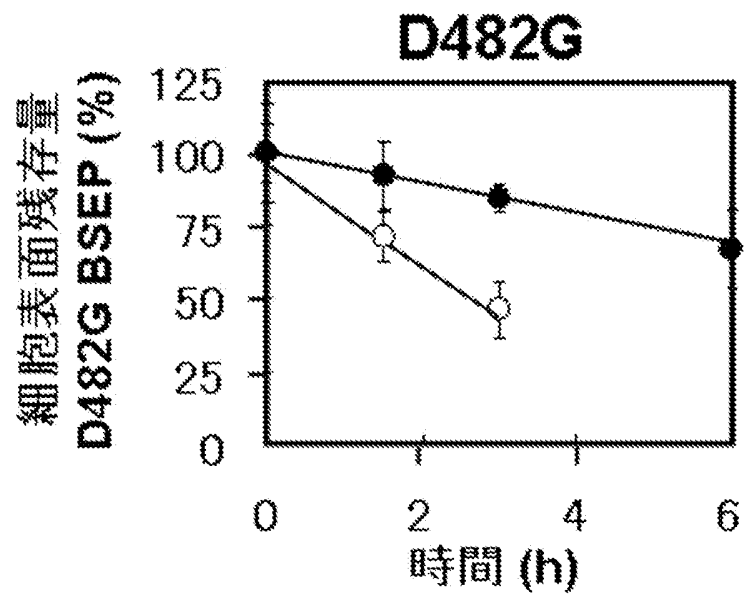
A.



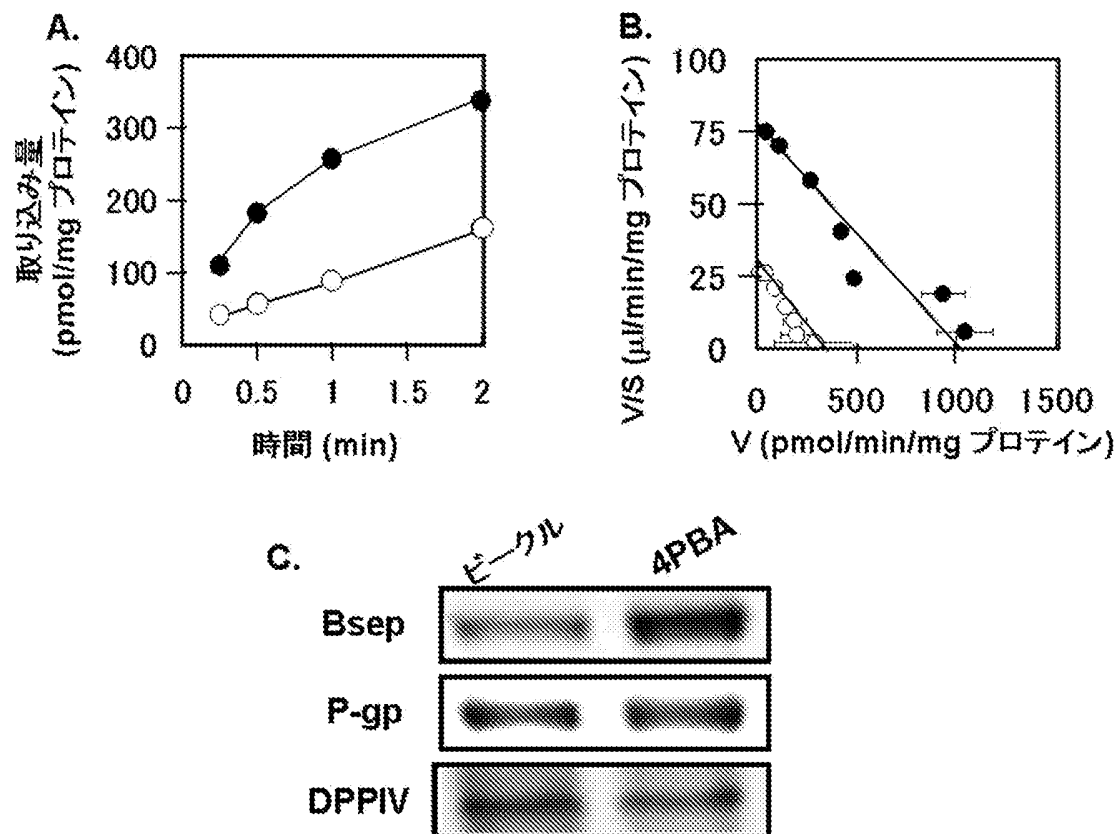
B.



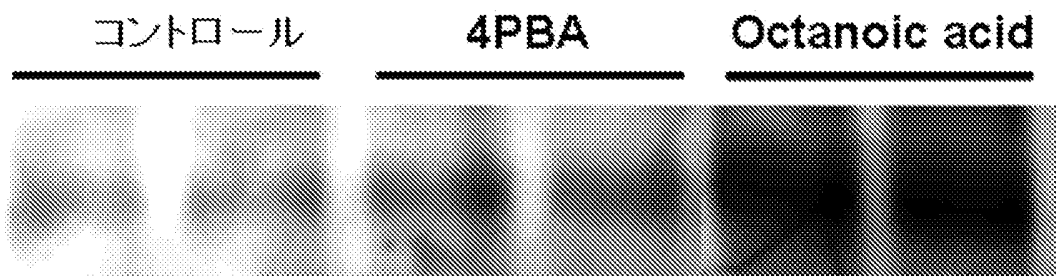
C.



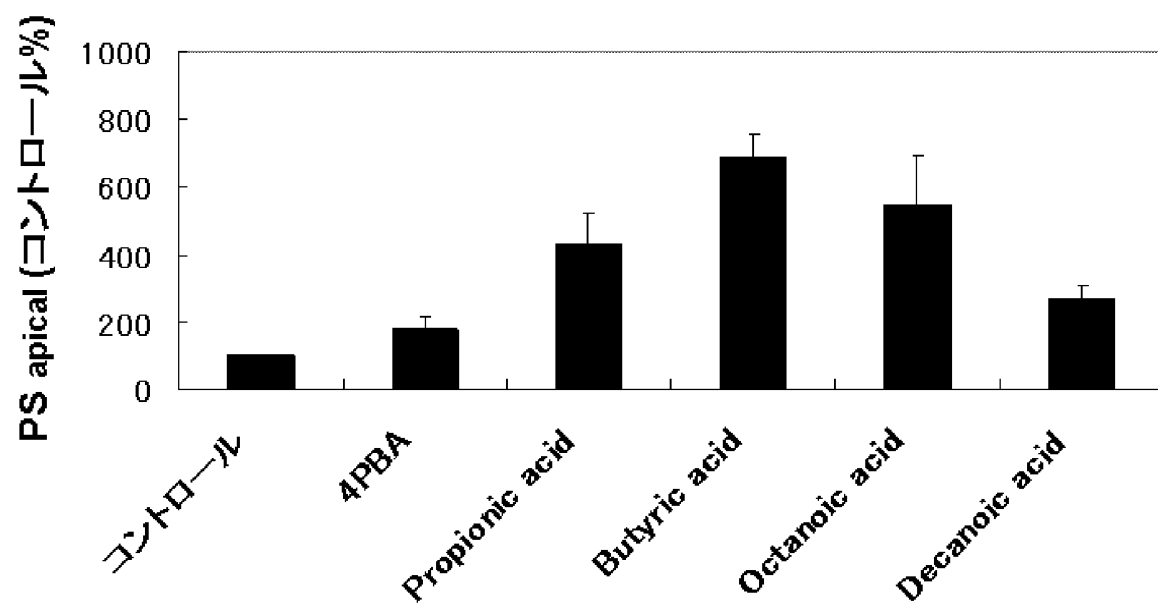
[図8]



[図9]



[図10]



[図11]

A.

インキュベーション
時間(h)

0

8

コントロール



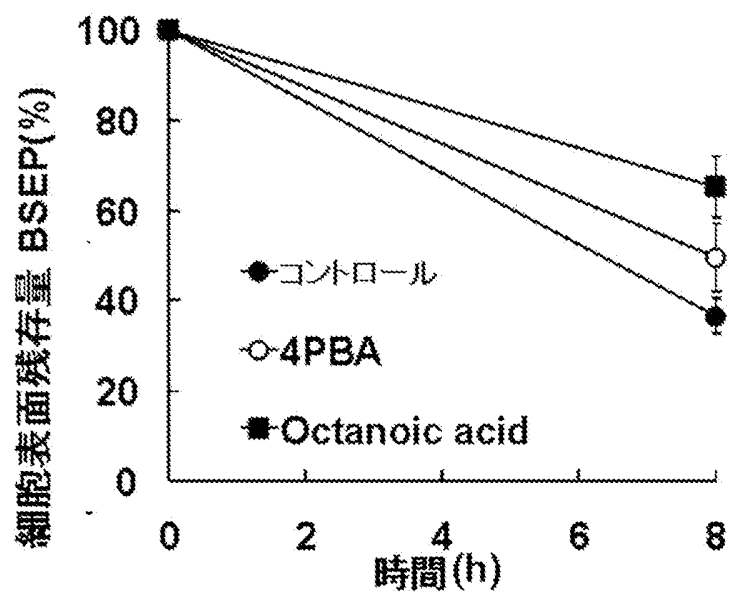
4PBA



Octanoic acid



B.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/001239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/192(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i 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) A61K31/192, A61P1/16, A61P43/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPlus (STN), REGISTRY (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Yuichi SUGIYAMA, 'Phenylbutyrate ni yoru Transporter Anteika Sayo Kiko no Kaiseki', Nanchisei no Kan-Tando Shikkan ni Kansuru Chosa Kenkyu Heisei 19 Nendo Sokatsu · Buntan Kenkyu Hokokusho, (2008 APR.), pages 58 to 59, full text	1-10
P, X	HAYASHI · SUGIYAMA, '4-Phenylbutyrate ga BSEP o Kaishita Tanjusan Yuso ni Oyobosu Eikyo', Basic Pharmacology & Therapeutics, (15 December, 2007 (15.12.07)) 35(SUPPL.3), P.S193-S196, full text	1-10
P, X	MAEDA · MATSUSHIMA et al., 'Ko-Histamine-yaku Foxofenadine no Kan Yuso ni Kan'yo suru Transporter no Dotei', Basic Pharmacology & Therapeutics, (15 December, 2007 (15.12.07)), 35(SUPPL.3) P.S185-S192, full text	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 application or patent 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 25 June, 2008 (25.06.08)		Date of mailing of the international search report 08 July, 2008 (08.07.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/001239

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAYASHI, H. ET AL. ' 4-PHENYLBUTYRATE ENHANCES THE CELL SURFACE EXPRESSION AND THE TRANSPORT CAPACITY OF WILD-TYPE AND MUTATED BILE SALT EXPORT PUMPS.' HEPATOLOGY, (2007 JUN.) 45(6) P.1506-1516, full text	1-10
X	Yuichi SUGIYAMA, 'Transporter ni Sayo suru Shinki Tanju Uttai Chiryoyaku no Tansaku', Nanchisei no Kan·Tando Shikkan ni Kansuru Chosa Kenkyu Heisei 18 Nendo Sokatsu · Buntan Kenkyu Hokokusho, (2007 APR.), pages 49 to 50, full text	1-10
X	KOSS, FW ET AL. 'EXPERIMENTAL INVESTIGATION IN CHOLERESIS' EUR. J. PHARMACOL., (1968) 4(2) P.215-223, full text, compound(VIII)	1-10
X	DATABASE CAPLUS ON STN, (1971) ACC.NO. 1971: 446437 ABSTRACT & KOSS, FW ET AL. 'USE OF RADIOACTIVITY LABELED CHOLERETICS IN STUDIES OF THE MECHANISM OF BILE FORMATION ' NUKLEARMEDIZIN,SUPPLEMENTAM(STUTTGART), (1970) (8) P.69-73	1-10
X	DATABASE CAPLUS ON STN, (1970) ACC.NO. 1970: 464576 ABSTRACT & BOUCARD, M. ET AL. 'EFFECT OF THE STRUCTURE OF PHENYL SUBSTITUTED ALIPHATIC ACIDS ON CHOLERESIS' LABO-PHARMA - PROBLEMES ET TECHNIQUES, (1970) 18(186) P.52-53	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A61K31/192(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A61K31/192, A61P1/16, A61P43/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 日本国実用新案公報 日本国公開実用新案公報 日本国実用新案登録公報 日本国登録実用新案公報 </div> <div> 1 9 2 2－1 9 9 6年 1 9 7 1－2 0 0 8年 1 9 9 6－2 0 0 8年 1 9 9 4－2 0 0 8年 </div> </div>			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus(STN), REGISTRY(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
P, X	杉山雄一 ‘フェニルブチレートによるトランスポーター安定化作用機構の解析’ 難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究 平成19年度総括・分担研究報告書, (2008 APR.) P.58-59 文献全体	1－10	
P, X	林・杉山 ‘4-Phenylbutyrate がBSEPを介した胆汁酸輸送に及ぼす影響’ 薬理と治療, (2007.12.15) 35(SUPPL.3) P.S193-S196 文献全体	1－10	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 2 5 . 0 6 . 2 0 0 8		国際調査報告の発送日 0 8 . 0 7 . 2 0 0 8	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 大久保 元浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4 C 8 8 2 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	前田・松島他 ‘抗ヒスタミン薬 Foxofenadine の肝輸送に関与するトランスポーターの同定’ 薬理と治療, (2007.12.15) 35 (SUPPL.3) P.S185-S192 文献全体	1 - 1 0
X	HAYASHI, H. ET AL. ‘4-PHENYLBUTYRATE ENHANCES THE CELL SURFACE EXPRESSION AND THE TRANSPORT CAPACITY OF WILD-TYPE AND MUTATED BILE SALT EXPORT PUMPS.’ HEPATOLOGY, (2007 JUN.) 45 (6) P.1506-1516 文献全体	1 - 1 0
X	杉山雄一 ‘トランスポーターに作用する新規胆汁うっ滞治療薬の探索’ 難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究 平成 1 8 年度総括・分担研究報告書, (2007 APR.) P.49-50 文献全体	1 - 1 0
X	KOSS, FW ET AL. ‘EXPERIMENTAL INVESTIGATION IN CHOLERESIS’ EUR. J. PHARMACOL., (1968) 4 (2) P.215-223 文献全体 ; 化合物 (VIII)	1 - 1 0
X	DATABASE CAPLUS ON STN, (1971) ACC.NO. 1971:446437 ABSTRACT & KOSS, FW ET AL. ‘USE OF RADIOACTIVITY LABELED CHOLERETICS IN STUDIES OF THE MECHANISM OF BILE FORMATION ’ NUKLEARMEDIZIN,SUPPLEMENTAM(STUTT GART), (1970) (8) P.69-73	1 - 1 0
X	DATABASE CAPLUS ON STN, (1970) ACC.NO. 1970:464576 ABSTRACT & BOUCARD, M. ET AL. ‘EFFECT OF THE STRUCTURE OF PHENYL SUBSTITUTED ALIPHATIC ACIDS ON CHOLERESIS’ LABO-PHARMA - PROBLEMES ET TECHNIQUES, (1970) 18 (186) P.52-53	1 - 1 0