

## Mungbean Trypsin Inhibitor(MBTI) 및 MBTI-polymer 포함체의 약물학적 특성

김상율 · 신영희<sup>#</sup>

경성대학교 약학대학

(Received January 28, 2004; Revised February 18, 2004)

## Pharmacological Effects of Mungbean Trypsin Inhibitor (MBTI) and MBTI-polymer Conjugate

Sang-Yul Kim and Young-Hee Shin<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

**Abstract** — Mungbean trypsin inhibitor (MBTI) was isolated and purified from Mung bean which has been used as a galenic and traditional food. MBTI and poly(ethylene glycol) were conjugated by using water soluble carbodiimide. We evaluated the therapeutic value of the MBTI and MBTI-PEG conjugate using animal models, sublethal septic shock model in guinea pig caused by *pseudomonas elastase*, shock model in rat caused by lipopolysaccharide, and the vascular permeability test by using *pseudomonas elastase*. In two shock model in guinea pig and in rat, hypotension shock was inhibited by pretreatment of MBTI. And also the vascular permeability caused by *pseudomonas elastase* reduced by pretreatment of MBTI. Also, therapeutic value of the MBTI-PEG conjugate was evaluated by using the sublethal septic shock model caused by *pseudomonas elastase*. The MBTI-PEG conjugate was more effective than native MBTI against *pseudomonas elastase* induced septic shock in guinea pig model.

**Keywords** □ mungbean trypsin inhibitor (MBTI), *pseudomonas elastase*, lipopolysaccharide, shock model, vascular permeability

Serine protease<sup>1-4)</sup>는 기질의 결합부위 내에 activated serine 잔기를 가지고 있으면서, 이를 peptide bond의 가수분해에 이용하는 효소군이다. 그 종류로는 coagulation에 관여하는 plasma kallikrein, 보체 반응에 관여하는 많은 factors, digestion에 관여하는 trypsin, chymotrypsin, elastase, enterokinase 등과 fibrinolysis에 관련된 urokinase, hormone activation에 관여하는 tissue kallikrein, fertilization에 관여하는 acrosin 등이 있으며 생명활동의 많은 부분에 관련되어 있다. 이들 serine protease의 하나인 urokinase가 tumor cell의 metastasis에 관련되어 있음이 알려지면서 serine protease inhibitor(serpin)을 약물로 적용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>5)</sup> 실례로, bovine pancreas로부터 추출한 serine protease inhibitor(serpin)인 aprotinin<sup>6)</sup>은 현재 임상에 사용되고 있는 대표적인 trypsin 및 kallikrein의 inhibitor이며, 급성췌장염의 치료제로 이용되고 있다.

식물의 serpin은 콩과식물 중에 다량 함유되어 있는 것으로 알

려져 있으며, 식물 방어 mechanism에 관여하는 물질로 보고되고 있다.<sup>7)</sup> 본 실험에서 사용한 mungbean trypsin inhibitor (MBTI)는 우리나라에서 식용뿐만 아니라 한방재료로 널리 사용되는 녹두(*Vigna radiata L.*)로부터 분리 정제된 trypsin inhibitor로서 분자량 8,000 Da의 BBI-type(Bowman-Birk inhibitor type)이다. 그러나, MBTI의 생체활성에 관한 연구는 많이 보고되어 있지 않으므로 본 실험에서는 동물모델을 이용하여 MBTI의 약리 활성을 측정하였다. 또한 대부분의 bioactive protein/peptide의 생체이용률이 낮으므로 MBTI의 생체 내 반감기를 연장시켜 치료학적 계수를 증가시킬 목적으로 MBTI-Poly(ethylene glycol) 포함체를 합성한 후, 동물모델을 통해 그 치료학적 계수 증가를 평가하였다.

### 실험방법

#### 실험동물

실험동물로서는 대한실험동물센터에서 분양 받은 기니아 피(Hartley albino, 250~300 g, male), sprague dawley계 웅성 흰쥐(250±10 g)를 일정한 조건(온도: 22±1°C, 습도: 50±5%, 12

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 051-620-4886 (팩스) 051-628-6540  
(E-mail) yhshin@ks.ac.kr

시간 명암주기)에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

### 시약 및 기구

실험에 사용한 녹두는 국내산으로서 시중의 대형 할인 마트에 서 구입하였으며, 시약으로는 trypsin(from bovine pancreas), N-benzoyl-*dl*-arginine *p*-nitroanilide (BAPNA), N-benzoyl-*L*-arginine-4-methyl-coumarine-7-amide(Bz-Arg-MCA), evans blue, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide(EDAC)는 Sigma Chemical. Co.(MO, USA)에서, O-(2-aminoethyl)-O'-methyl(polyethylene glycol)(NH<sub>2</sub>-PEG, 평균분자량: 5,000)은 Fluka사 (Buchs, Switzerland), lipopolysaccharide(LPS)는 Difco연구소 (Ditroit, USA)에서 구입하였다. DEAE cellulose, Sephadex G-50은 Pharmacia(Uppsala, Sweden)에서 구입하였다. 또한, *pseudomonal elastase*(*PE*)는 일본의 Nagase Biochemica 사 (Kobe, Japan)로부터 기증 받아 사용하였다. 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다. 실험에 사용한 기구로는 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu, UV-1601), spectrofluorometer (Jasco, FP-750), blood pressure transducer(TP-400T, Nihon Kodon, Japan), 동결건조기(EYELA CA-1500, EYELA CD-5N, GLD-100, Japan), ultrafiltration system(Amicon 8200) 등을 사용하였다.

### MBTI의 분리 및 정제

MBTI의 분리 및 정제는 Moon 등이 보고한 방법<sup>8)</sup>과 동일한 방법으로 정제하여 전기영동 및 부분 아미노산 서열을 결정하여 MBTI임을 확인한 후 실험에 사용하였다.

### MBTI - Polymer 포함체의 합성 및 정제

MBTI-PEG 포함체는 carbodiimide method<sup>9)</sup>에 따라 제조하였다. Carboxyl(-COOH)기를 가지는 MBTI(1 g)와 amino(-NH<sub>2</sub>)기를 가지는 NH<sub>2</sub>-PEG를 각각 1:2, 1:5 및 1:10의 질량 비율(MBTI : NH<sub>2</sub>-PEG)로 pH 4.75 인산염 완충액 10 ml에 녹이고, EDAC를 가하여 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응 완료 후, 각 비율의 포함체들을 ultrafiltration system(membrane cut off 10,000)으로 농축하였고 이를 정제수로 3회 세척한 후 동결 건조하여 포함체로 실험에 사용하였다.

### Trypsin inhibitory activity(IC<sub>50</sub>) 측정<sup>8)</sup>

MBTI 용액 또는 MBTI-PEG 포함체 각각 50 μl 씩 함유한 시험관에 트립신 용액(1 μg/40 μl in 0.02 M-CaCl<sub>2</sub> 함유 50 mM Tris-HCl, pH 8.2)을 40 μl 가하여 교반하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 기질액으로 디메틸설폭사이드에 용해한 5 mM Bz-Arg-MCA 10 μl를 가하여 다시 교반하고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 정지액으로 17% 초산용액 1 ml을 가한 후, 생성된

7-아미노-4-메틸쿠마린을 형광광도계를 이용하여 여기파장 380 nm, 발광파장 460 nm에서 형광세기를 측정하여 트립신의 활성을 50% 저해하는 농도(IC<sub>50</sub>)를 구하였다.

### 약물학적 효과

**Septic shock caused by *pseudomonal elastase* in guinea pig<sup>10,11)</sup>** - 기니아 피크의 경정맥과 경동맥을 위와 같은 방법으로 각각 cannulation하고, 경정맥에 연결된 cannula에 대조군으로 saline을 주입하고, 약물처치군으로 MBTI(30 mg/kg)와 MBTI-PEG(30 mg/kg equivalent of native MBTI)을 각각 생리식염수에 녹여 전처치하여 일정시간 경과 후 PE.(0.8 mg/kg)를 투여하여 MABP의 변화를 관찰하였다.

**Shock caused by lipopolysaccharide in rat<sup>12)</sup>** - Sodium pentobarbital(50 mg/kg) 복강주사로 마취한 SD계 흰쥐 경정맥을 약물주입을 위하여 PE-50 tube로 cannulation하고, MABP(Mean arterial blood pressure) 측정을 위해 경동맥을 cannulation하여 blood pressure transducer(Nihon Kodon, TP-400T)에 연결하였다. 경정맥에 연결된 cannula에 대조군으로 생리식염수를, 약물 처치군으로서 생리식염수에 녹인 MBTI를 전처치하여, 1분 후 LPS(5 mg/kg)를 투여하여 MABP의 변화를 관찰하였다.

**Vascular permeability test<sup>13)</sup>** - Sodium pentobarbital(30 mg/kg) 복강주사로 마취한 기니아 피크의 등부위 털을 깨끗이 제거하고, 경정맥을 약물과 5% evans blue의 주입을 위하여 PE-50 tube로 cannulation하였다. 경정맥에 연결된 cannula에 대조군으로 생리식염수와 5% evans blue를, 약물처치군으로 MBTI와 5% evans blue를 각각 주입하였다. 그 직후 기니아 피크의 등 피부에 PE를 각각 0, 1, 3, 10, 30 및 100 μg씩을 피하 주사하였다. 피하 주사 수분 후에 기니아 피크를 희생시켜 PE에 의한 모세혈관 투과도 증가로 evans blue가 삼출된 푸른 반점(Fig. 4)이 나타난 부분을 취하여 잘게 분쇄한 후 3.0 ml의 디메틸포름아미드를 넣고 60°C에서 48시간 동안 evans blue를 추출하였다. 추출 완료 후 620 nm에서 흡광도를 측정하여 PE에 의해 유도된 혈관 투과도를 측정하였다.

### 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### MBTI의 분리 및 정제

Moon 등의 방법<sup>8)</sup>으로 녹두로부터 MBTI를 Sephadex G-50을 이용한 gel filtration chromatography, DEAE-cellulose ion

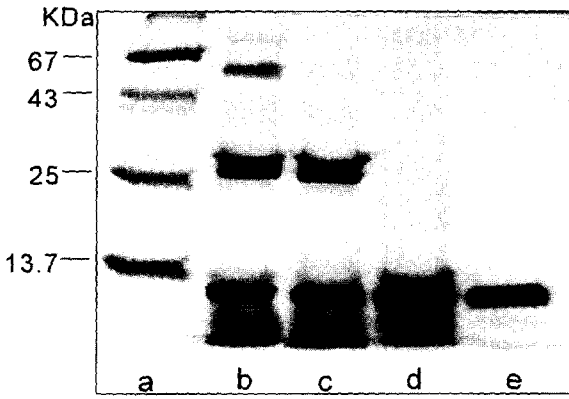


Fig. 1 - Electrophoresis on 20% SDS-PAGE. Lane a, marker protein; lane b, crude extract; lane c, Sephadex G-50 elution; lane d, DEAE cellulose column elution; lane e, Trypsin affinity column elution.

exchange chromatography, trypsin affinity chromatography 등을 차례로 행하여 분리 정제한 시료를 전기 영동한 결과, 8,000 Da에서 하나의 밴드(Fig. 1)가 나타났으며, 이를 부분 아미노산 시열을 결정하여 MBTI임을 확인하였다.

**Trypsin inhibitory activity(IC<sub>50</sub>) 측정**

분리 정제한 MBTI에 carrier로서 NH<sub>2</sub>-PEG를 결합시켜 MBTI-PEG 포함체를 합성하고, MBTI 및 MBTI-PEG 포함체의 트립신에 대한 저해 활성(IC<sub>50</sub>)을 비교 측정하였다(Table 1). MBTI의 트립신 1 µg에 대한 50% 억제 농도(IC<sub>50</sub>)은 0.37 µg로 나타났고, MBTI-PEG conjugate는 1:2 반응 비율의 경우 0.7 µg, 1:5 반응 비율의 경우 2.2 µg, 그리고 1:10의 경우는 6.1 µg로 나타났다. IC<sub>50</sub> 활성이 1:2의 경우는 native MBTI의 약 52%, 1:5의 경우는 약 17%, 그리고 1:10의 경우는 약 5.6% 정도를 유지하는 것으로 보아 고분자 수식에 의하여 다소 활성이 감소되기는 하였으나 MBTI의 활성부위가 어느 정도 보호되고 있었다. 특히, 1:2 반응비율의 경우는 그 활성이 native MBTI의 50% 이상으로 다른 반응 비율의 포함체보다 높은 트립신 저해활성을 유지하고 있었다. 일반적으로 화학적 수식법의 가장 어려운 문제는 생리활성 단백질의 활성부위에 직접 결합 또는 구조 장애로 인한 단백질 활성의 현저한 감소이다. 본 실험에서는 MBTI-PEG 포함체가 1:2의 반응 비율의 경우에 원래 활성의 상당 부분이 유지되고 있음을 확인할 수 있었으므로 이를 다량으로 합성하여 각 동물 실험에 시료로 사용하였다.

Table 1 - The inhibitory activity of native-MBTI and MBTI-PEG conjugate

	MBTI	MBTI-PEG conjugate		
반응비율	-	1:2	1:5	1:10
IC <sub>50</sub> (µg) against trypsin (1.0 µg)	0.37	0.7	2.2	6.1

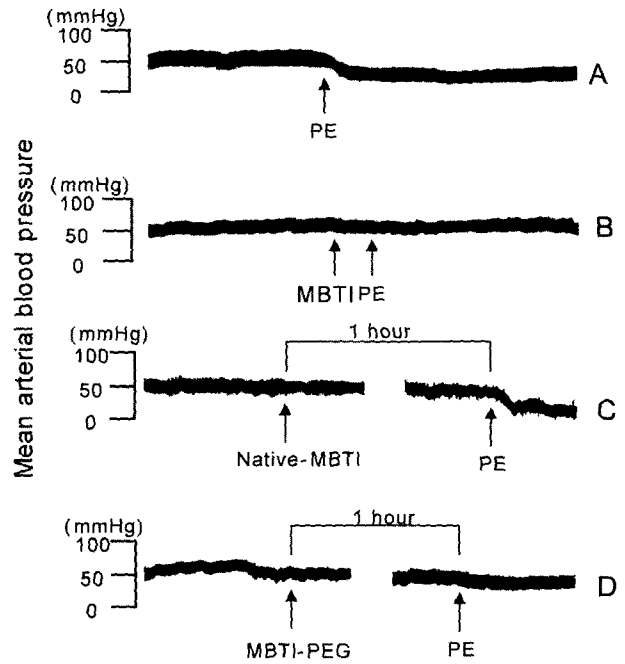


Fig. 2 - Tracing showing the preventive effect of MBTI and MBTI-PEG on the sublethal shock model in guinea pig caused by *Pseudomonas elastase* (PE, 0.8 mg/kg). A, PE only; B, MBTI (30 mg/kg) was injected 1 min before the PE injection; C, MBTI (30 mg/kg) was injected 1 hour before the PE injection; D, MBTI-PEG (30 mg/kg equivalent of MBTI) was injected 1 hour before the PE injection.

**약물학적 효과**

***Pseudomonas elastase* induced sublethal septic shock model in guinea pig** - MBTI 및 MBTI-PEG의 치료학적 계수를 평가하기 위하여 기니아 돼지에 *pseudomonas elastase* induced septic shock의 병태 model<sup>11,14)</sup>을 작성하고 MBTI 및 MBTI-PEG conjugate 화합물을 일정시간 전에 전처치하여 그 치료학적 계수를 평가하였다. Fig. 2에서, PE.(0.8 mg/kg)만을 단독으로 guinea pig에게 투여하였을 때는 뚜렷한 hypotension shock이 일어나지만, MBTI(30 mg/kg)를 PE 투여 1분 전에 전처치하였을 때는 severe hypotension shock이 억제되었다. 그리고 native MBTI(30 mg/kg)를 투여하고 1시간 후에 PE를 투여한 결과 hypotension shock이 유발되어 혈압이 떨어지지만 MBTI-PEG 포함체(30 mg/kg equivalent of native MBTI)은 hypotension shock 억제 효과가 1시간 이상 지속되어 mild한 condition을 유지하고 있었다.

포합체의 물리화학적 성질들은 일반적으로 carrier로 사용하는 polymer 성질에 의하여 지배된다. 또한 대부분의 bioactive protein/peptide의 생체내 반감기가 매우 짧아 생체이용률이 낮으므로 여러종류의 polymer를 이용하여 치료계수를 증가시킬 연구도 많이 보고되어 있다. PEG나 Dextran 등을 이용한 conjugate 화합물인 PEG-SBTI나 Dextran-SBTI의 경우 native

SBTI에 비해 plasma에서의  $t_{1/2}$ 이 약 30배 정도 증가됨을 보고 하였으며, Shin 등은<sup>15)</sup> succinylated gelatin을 이용한 SBTI와의 conjugate 화합물에서 area under the curve(AUC)가 native SBTI에 비하여 약 4배 증가를 보고하였다. 이런 경향은 현재 임상에 사용되고 있는 poly(styrene-maleic acid) conjugated of neocarzinostatin(SMANCS)의 혈장내 반감기가 neocarzinostatin 보다 20배 증가된 예와도 잘 일치하고 있다. SMANCS의 경우 반감기의 증가는 약물의 분자량 증가 외에도 lipophilicity가 커짐에 따라 약물의 serum albumin과의 결합력이 증가되고 결과적으로 전체 체순환으로부터의 배설이 지연되는 까닭에 기인되는 것으로 보고되어 있다.<sup>16)</sup> 본 실험에 사용한 MBTI의 생체 내 반감기를 연장시켜 치료학적 계수를 증가시킬 목적으로 합성한 MBTI-PEG도 치료계수가 증가됨을 알 수 있었다.

**Lipopolysaccharide induced shock model in rat** - 대부분의 bacterial protease는 hageman factor(Hf)와 prekallikrein 혹은, Hf와 kininogen의 활성화에 의한 bradykinin 생성 증가에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>17)</sup> Kinin generation cascade에 bacterial protease들이 직접적으로 관여함이 증명되면서 serpin의 치료학적 계수를 평가하기 위한 동물 병태 model의 작성 및 응용이 보고되고 있다. 주로 많이 사용되는 병태 model은 bacteremia를 야기하는 주 물질로 알려진 LPS induced shock model<sup>10)</sup>이 있다.

이에 본 실험에서는 MBTI의 치료학적 계수를 평가하기 위하여 LPS induced shock model in rat을 작성하고 MBTI를

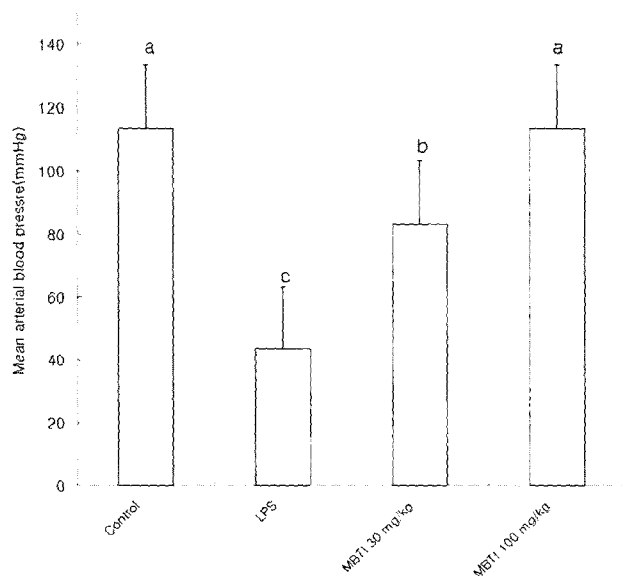


Fig. 3 - Effect of the pretreatment of MBTI on the mean arterial blood pressure of rat induced by Lipopolysaccharide (5 mg/kg). Values are mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test ( $p<0.05$ ).

pretreatment하여 그 치료학적 계수를 평가하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 LPS(5 mg/kg)만을 단독으로 rat에게 투여하였을 때는, 뚜렷한 hypotension shock이 나타나지만, MBTI(30 mg/kg)를 LPS 투여 1분 전에 전처치하였을 때는 혈압이 떨어지는 정도가 LPS 단독 투여시보다 유의성 있게 감소하였다. 그리고 MBTI를 100 mg/kg로 증량하였을 때는 severe hypotension shock을 현저히 억제하여 LPS 투여에 의한 유의성 있는 혈압 변화를 나타나지 않았다.

**Vascular permeability test in guinea pig** - 기니아 피크의 피부에 *pseudomonal elastase*를 투여하면 short-lasting permeability 반응이 일어나며, histamin 또는 kinin은 주 mediator로 잘 알려져 있다.<sup>13)</sup> 또한, Hageman factor-kallikrein-kinin cascade에서 PE.투여에 의하여 kinin 즉, bradykinin이 유리되어 hypotension shock을 유발한다. 본 실험에서는 MBTI의 투여에 의하여 kinin의 유리가 억제되면 short-lasting permeability가 억제될 것이므로 그 억제정도를 측정하였다. Fig. 4는 대조군에 *pseudomonal elastase*를 투여하였을 경우 투여 용량에 따라 Evans blue의 삼출량이 많아 vascular permeability가 증가되는 것을 알 수 있었다. 약물처치군에 MBTI(30, 100 mg/kg)를 투여한 경우 vascular permeability가 억제되었으며 그 정도를 Fig. 5에 나타내었다. PE. 100  $\mu$ g에서 MBTI 30 mg/kg를 투여하였을 때 대조군에 비하여 약 70% 정도 억제되었으며, 100 mg/kg를 투여하였을 때는 약

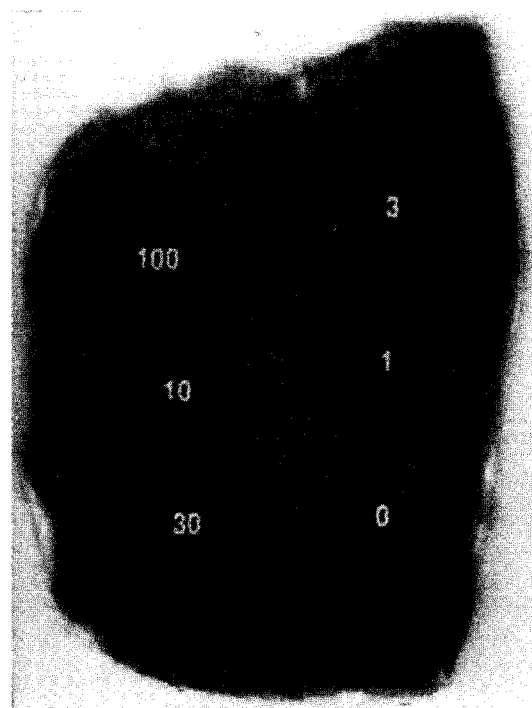
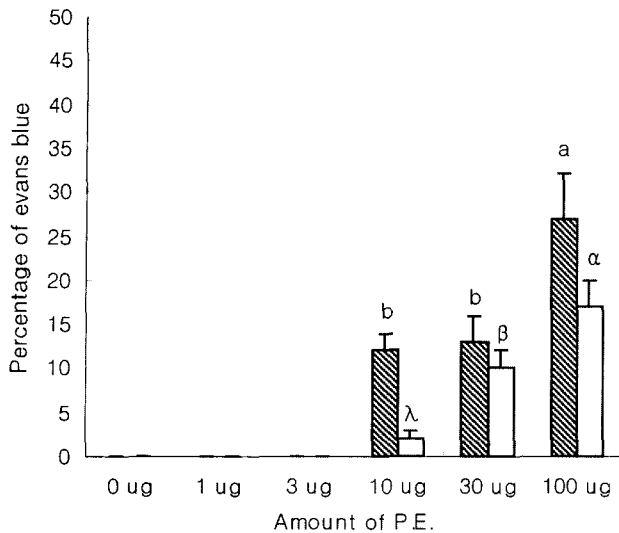


Fig. 4 - Vascular permeability in guinea pig after intradermal injection of *Pseudomonal elastase* (PE.). Numbers exhibit amount of injected PE., respectively.



**Fig. 5** - Effect of the treatment of MBTI on the vascular permeability in guinea pig after intradermal injection of *Pseudomonas elastase*. Values are mean  $\pm$  S.D. (n=3). Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test ( $p < 0.05$ ). Key; ▨; 30 mg/kg, □; 100 mg/kg.

80% 정도 억제되었다. 또한 저용량의 PE를 투여하였을 경우에는 vascular permeability가 거의 억제됨을 볼 수 있었으므로 MBTI는 PE로 유도된 bradykinin의 유리를 유의성 있게 억제하는 것으로 사료된다.

## 결 론

Moon 등의 방법에 의하여 Mungbean trypsin inhibitor (MBTI)를 분리 정제하였으며 나아가 MBTI-PEG conjugate 화합물을 합성하고 그들의 생화학적 활성을 측정하였다. native MBTI의 경우 trypsin inhibitory activity, 즉,  $IC_{50}$ 이 trypsin I  $\mu$ g에 대하여 0.37  $\mu$ g이었으며 MBTI-PEG conjugate 화합물의 경우 1:2의 비율로 반응시킨 것의 저해활성이 가장 높게 나타났으며  $IC_{50}$ 은 0.70  $\mu$ g이었다.

그리고 약리학적 효과를 평가하기 위하여 몇 가지 병태 동물 모델을 이용하였다. *Pseudomonas elastase*에 의한 vascular permeability를 측정한 결과, MBTI는 PE에 의해 유도되는 permeability를 현저히 감소시켰고, LPS induced shock model in rat를 이용하여 평가한 결과 MBTI(100 mg/kg) 전처리로 hypotension shock이 현저히 억제되었다. 또한 *pseudomonas elastase* induced shock model in guinea pig를 이용하여 평가한 결과, MBTI(30 mg/kg) 전처리는 hypotension shock을 유의성 있게 억제하는 것으로 나타났다.

치료계수 증진을 위하여 MBTI-PEG conjugate를 합성하였으며 그 약리활성을 측정한 결과, 생체 내 반감기가 증가하여

*pseudomonas elastase* induced shock model in guinea pig에서 전처리에 의한 hypotension shock 억제시간이 연장됨을 알 수 있었다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2002학년도 경성대학교 학술지원 연구비에 의하여 연구되었음.

## 문 헌

- 1) Ikenaka, T., Odani, S. and Koide, T. : Bayer-Symposium V proteinase, Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, pp. 325 (1974).
- 2) Powers, J. C. and Harper, J. D. : Inhibitors of serine proteases, Barrett and Salvesen (eds.) Proteinase Inhibitors, Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division) (1986).
- 3) Schnebli, H. P. and Braun, N. J. : Proteinase inhibitors as drug, Proteinase Inhibitors (Barrett and Salvesen eds.), Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division), 613 (1986).
- 4) Neurath, H. : Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**, 350 (1998).
- 5) Hayaishi, Protease and Protease Inhibitor, Medical view, Tokyo, Japan (1993).
- 6) Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. : Handbook of Proteolytic Enzymes Academic Press, Inc., London (1998).
- 7) Pixley, R. A. and Colman, R. W. : The kallikrein-kinin system in sepsis syndrome, The Kinin System, Academic Press Limited, pp. 173-186 (1997).
- 8) Moon, S. E. and Shin, Y. H. : Characterization and pharmaceutical effect of Mung bean trypsin inhibitor. *Korean Journal of Life Science* **12**(5), 528 (2002).
- 9) Taila, M. and Meir, W. : A simplified for the preparation of succinimidyl carbonate polyethylene glycol for coupling to proteins. *Bioconj. Chem.* **4**, 568 (1993).
- 10) Khan, M. M. H., Yamamoto, T., Araki, H., Ijiri, Y., Shibuya, Y. and Kambara, T. : Role of Hageman factor/Kallikrein-Kinin systemic *pseudomonas elastase* induced shock model. *Biochem. Biophys. Acta* **119**, 1157 (1993).
- 11) Shin, Y. H., Akaike, T., Khan, M. M. H., Sakada, Y. and Maeda, H. : Further evidence of bradykinin involvement in septic shock : reduction of kinin production *in vivo* and improved survival in rats by use of polymer tailored SBTI with longer  $t_{1/2}$ . *Immunopharmacology* **33**, 369 (1996).
- 12) Yoshida, M., Akaike, T., Wada, Y., Sato, K., Ikeda, K., Ueda, S. and Maeda, H. : Therapeutic effects of imidazolineoxyl N-oxide against endotoxin shock through its direct nitric oxide-scavenging activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**(2),

- 923 (1994).
- 13) Kamata, R., Yamamoto, T., Matsumoto, K. and Maeda, H. : A serratial protease causes vascular permeability reation by activation of the hageman factor-dependent pathway in guinea pigs. *Infect. Immun.* **48**(3), 747 (1985).
- 14) Khan, M. M. H., Yamamoto, T., Araki, H., Ijiri, Y., Shibuya, Y., Okamoto, M. and Kambara, T. : *Pseudomonal elastase* injection causes low vascular resistant shock in guinea pigs. *Biochem. Biophys. Acta* **83**, 1182 (1993).
- 15) Shin, Y. H., Kojima, Y., Otagiri, M. and Maeda, H. Conjugation of succinylated gelatin to soybean trypsin inhibitor. *Bioactive Compatible Polymers* **11**(1), 3 (1996).
- 16) Maeda, H. : SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **6**, 181 (1991).
- 17) Molla, A., Yamamoto, T., Akaike, T., Miyoshi, S. and Maeda, H. : Activation of hageman factor and prokallikrein and generation of kinin by various microbial proteinase. *J. Biol. Chem.* **264**, 10589 (1989).