

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年11月25日(25.11.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/134537 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 7/08 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)
A61K 9/38 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/058420
- (22) 国際出願日: 2010年5月19日(19.05.2010)
- (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 2009-122096 2009年5月20日(20.05.2009) JP
特願 2010-071774 2010年3月26日(26.03.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 森下 真莉子(MORISHITA, Mariko) [JP/JP]; 〒1428501 東京都品川区荏原2-4-4 1 星薬科大学 薬剤学教室 Tokyo (JP). 高山 幸三(TAKAYAMA, Kozo) [JP/JP]; 〒1428501 東京都品川区荏原2-4-4 1 星薬科大学 薬剤学教室 Tokyo (JP). 西尾 玲士(NISHIO, Reiji) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内 Kanagawa (JP). 井田 伸夫(IDA, Nobuo) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内 Kanagawa (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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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, LR, 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 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則 5.2(a))

(54) Title: CELL MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDES

(54) 発明の名称: 細胞膜透過性ペプチド

(57) Abstract: Any one of the following cell membrane-permeable peptides (A) to (D) which imparts cell membrane-permeability and mucosal absorbability to hydrophilic physiologically active substances. (A) A peptide comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1. (B) A peptide comprising an amino acid sequence, that is derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 by substitution, deletion, insertion or addition of one or several basic amino acids, and having cell membrane-permeability. (C) A peptide comprising an amino acid sequence, that is derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 by substitution, deletion, insertion or addition of one to five amino acids, and having cell membrane-permeability. (D) A peptide comprising an amino acid sequence represented by, for example, a reverse sequence to any one of the sequences (A) to (C), and having cell membrane-permeability.

(57) 要約: 以下の(A)～(D)のいずれかの細胞膜透過性ペプチドは、親水性生理活性物質に細胞膜透過性、さらには粘膜吸収性を付与する。(A)配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。(B)配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチド。(C)配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチド。(D)(A)～(C)のいずれかの逆配列で表されるアミノ酸配列、等のアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチド。

WO 2010/134537 A1

明 細 書

発明の名称：細胞膜透過性ペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、細胞膜透過性を有する新規ペプチドおよび該ペプチドと親水性生理活性物質を含有する医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 細胞は、タンパク質および核酸などの親水性生理活性物質に対して不透過性の細胞膜により外界から隔てられている。これらの親水性生理活性物質を細胞内に送達する方法が無いことが、細胞内を作用部位とする多くの親水性生理活性物質の臨床使用の障害になってきた。

[0003] このような細胞不透過性の親水性生理活性物質を細胞内に送達する技術がいくつか報告されている。最も一般的な方法は脂質を用いて、親水性生理活性物質に疎水性を付与するもので、細胞膜の透過性を向上させることができる。また、ペプチド性のリガンドを用いて透過性を向上させる技術も報告されている。

[0004] 細胞膜を破壊せずに細胞外から細胞内へ移行する性質を持つペプチドリガンドは細胞膜透過性ペプチドと呼ばれる。有名なものとしてはアルギニンが連なったオリゴアルギニン、HIV-1ウイルス由来のペプチドTat（特許文献1）、ショウジョウバエ由来ペプチドであるペネトラチン（特許文献2）などがある。これらの他にも単純な塩基性を特徴とするもの、ペプチドの一次構造あるいは二次構造の両親媒性を特徴とするもの、メカニズムが明確ではないものなど様々が報告されている。これらのペプチドは、自身の細胞内移行性に加えて、前述したように自身をビークルとして連結した遺伝子等の親水性生理活性物質を細胞内部に送達する用途の研究が盛んに行われている。しかし研究用試薬としては実績があるものの、臨床応用に用いられるものは少なく、様々な模索が行われ、それぞれの用途において、より効率良く細胞内に移行しうる配列が模索されている。

[0005] 細胞膜透過性ペプチドの一部において、親水性生理活性物質と共に経口あるいは経鼻投与した場合、親水性生理活性物質の粘膜上皮細胞層の通過を促進させ、全身循環に高い効率で親水性生理活性物質を移行せしめることのできるペプチドが報告されている。全ての細胞膜透過性ペプチドが粘膜からの透過促進性を有しているわけではなく、細胞膜透過性に加え、細胞内での動態、細胞からの離脱などの特性が関係していると考えられており、これらの条件を満たす一部の細胞膜透過性ペプチドのみが親水性生理活性物質の経粘膜吸収促進能を有すると考えられるが、このような機能が報告されているペプチドの種類は少ない。また、粘膜透過促進性が報告されているペプチドであっても、特定の生理活性物質とのコンジュゲートでのみ、その効果が確認されているもの（特許文献2、3）や、薬物との共有結合を必要としない形で用いることのできる可能性が示されているものであっても、十分な効果を得るためには大量の細胞膜透過性ペプチドが必要であるもの（特許文献4）などであり、実用化には多くの課題が残されている状況である。

[0006] 親水性生理活性物質は、近年、これまで主流を占めてきた低分子で疎水性の薬物に加えて医薬品の候補化合物として注目され、顕著な治療効果を示しているが、経粘膜からの難吸収性を理由に投与方法が注射剤にほとんど限られている状況であり、粘膜から親水性生理活性物質を吸収させる技術開発は親水性生理活性物質の非注射剤化の用途において強い期待がある。特に細胞膜透過ペプチドを用いた吸収促進技術は、これまで広く検討されてきた界面活性剤による吸収促進技術と比べて、粘膜への刺激性が低いことが期待され、効率よく吸収促進を起こす細胞膜透過ペプチドが見つければ有望な技術となる可能性がある。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開平10-33186号公報

特許文献2：特表2002-530059号公報

特許文献3：WO2004/037859

特許文献4：特開平10-95738号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、親水性生理活性物質を細胞内に移行させることのできる新規な細胞膜透過性ペプチドを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、細胞膜透過性を有するペプチド配列の探索を行い、目的とする細胞膜透過性を有する新規ペプチド配列を見出した。すなわち、本発明は以下のような構成を有する。

[0010] (1) 以下の(A)～(D)のいずれかの細胞膜透過性ペプチド。

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

(B) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチド。

(C) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチド。

(D) (A)～(C)のいずれかの逆配列で表されるアミノ酸配列、(A)の逆配列で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列、あるいは(A)の逆配列で表されるアミノ酸配列において、1～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチド。

[0011] (2) 前記(B)のペプチドが配列番号2～4, 9～10, 13のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、(1)に記載の細胞膜透過性ペプチド。

[0012] (3) 前記(C)のペプチドが配列番号12, 15～30のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、(1)または(2)に記載の細胞膜透過性ペ

プチド。

- [0013] (4) 前記 (D) のペプチドが配列番号 5 または 14 で表されるアミノ酸配列からなる、(1) ~ (3) のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチド。
- [0014] (5) (1) ~ (4) のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質を含む、医薬組成物。
- [0015] (6) (1) ~ (4) のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質を含む、経口投与用医薬組成物。
- [0016] (7) (1) ~ (4) のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質を含む、経鼻投与用医薬組成物。
- [0017] (8) 親水性生理活性物質がペプチド、タンパク質または核酸である、(5) ~ (7) のいずれかに記載の医薬組成物。

発明の効果

- [0018] 本発明により、親水性生理活性物質の効率の良い細胞内への移行が可能となり、細胞内の分子を標的とした新たな薬物治療が可能となる。また、従来注射でしか投与できなかった親水性生理活性物質を経口、経鼻投与などによって非注射剤化することが可能となり、簡便で患者に優しい薬物治療が可能となる。

図面の簡単な説明

- [0019] [図1] HeLa 細胞への細胞膜透過性ペプチド移行を示すグラフである。
- [図2] 細胞膜透過性ペプチドによる HeLa 細胞へのインスリン移行促進を示すグラフである。
- [図3] 細胞膜透過性ペプチドによる HeLa 細胞へのポリスチレンビーズ移行促進を示すグラフである。
- [図4] 細胞膜透過性ペプチドによるインスリンの経鼻吸収性を血糖値により示すグラフである。
- [図5] 細胞膜透過性ペプチドによるインスリンの経鼻吸収性を血漿中のインスリン濃度により示すグラフである。
- [図6] 細胞膜透過性ペプチドによるインスリンの経鼻吸収性をバイオアベイラ

ビリティにより示すグラフである。

[図7]細胞膜透過性ペプチドによるインターフェロン β の経鼻吸収性を血漿中のインターフェロン β 濃度により示すグラフである。

[図8]細胞膜透過性ペプチドによるエキセンジン4の経鼻吸収性を血漿中のエキセンジン4濃度により示すグラフである。

[図9]細胞膜透過性ペプチドによるインスリンの腸管吸収性を血糖値により示すグラフである。

[図10]細胞膜透過性ペプチドによるインスリンの腸管吸収性を血漿中のインスリン濃度により示すグラフである。

[図11]細胞膜透過性ペプチドの鼻腔障害性をLDH漏洩により示すグラフである。

[図12]各細胞膜透過性ペプチドによるHeLa細胞へのインスリン移行促進を示す共焦点レーザー顕微鏡観察像である。各図中のA（左上）はローダミン標識インスリンの局在、B（右上）はDiD 'O i lで染色した細胞膜、C（左下）は微分干渉像、A+B（右下）はAの像とBの像を重ねて表した像を示す。

[図13]細胞膜透過性ペプチドによるHeLa細胞へのインスリン移行促進を示すグラフである。

[図14]細胞膜透過性ペプチドによるインスリンの経鼻吸収性をAUCにより示すグラフである。

[図15]HeLa細胞への細胞膜透過性ペプチド移行を示すグラフである。

[図16]細胞膜透過性ペプチドによるHeLa細胞へのインスリン移行促進を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明者は、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド（以下、配列番号1のペプチド、ともいう。）またはその改変ペプチドが、細胞膜透過性ペプチドであることを新規に見出し、本発明を完成させた。以下、本発明の細胞膜透過性ペプチドについて詳細に説明する。

- [0021] 本発明の細胞膜透過性ペプチドの細胞膜透過性とは、細胞の外部と内部を隔てる脂質の膜を通過する性質を示す。ペプチドが細胞膜透過性を通過するかどうかは、当該ペプチドに蛍光物質を連結したペプチドを細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡などで観察し、細胞内部に蛍光物質が検出できるかどうかで確認できる。また、蛍光物質を連結した当該ペプチドを取り込ませた細胞を破碎し、破碎液を分光光度計を用いて蛍光強度を測定することで定量的に細胞内移行性を確認することができる。なお、本明細書においては蛍光物質（具体例としてフルオレセイン）と連結したペプチドの細胞内への移行量が、蛍光物質と連結した配列番号6で表されるアミノ酸配列からなる細胞膜透過性でないペプチドの細胞内移行量と比較して3倍以上上昇した場合、当該ペプチドは細胞膜透過性ペプチドであると判断する。
- [0022] また、本発明の細胞膜透過性ペプチドは、親水性生理活性物質に細胞膜透過性を付与する特徴を有している。なお、本明細書においては、蛍光標識した親水性生理活性物質とペプチドを連結または混合させて細胞に接触させた時の蛍光標識親水性生理活性物質の細胞内移行効率が、蛍光標識親水性生理活性物質のみを細胞に接触させた時の蛍光標識親水性生理活性物質の細胞内移行効率より3倍以上高い場合、当該ペプチドは親水性生理活性物質に細胞膜透過性を付与する特徴を有すると判断する。
- [0023] さらに、本発明の細胞膜透過性ペプチドは、親水性生理活性物質に粘膜吸収性（好ましくは腸管吸収性または鼻腔吸収性）を付与する特徴を有している。具体的には、親水性生理活性物質単独では粘膜を通じて生体内に取り込まれにくいものが、細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質を連結または混合したものを粘膜組織（好ましくは腸管組織または鼻腔組織）に接触させると、親水性生理活性物質の経粘膜吸収（好ましくは腸管吸収性または鼻腔吸収性）が促進されるようになる。
- [0024] 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、細胞膜透過性ペプチドのスクリーニングにより見いだされた新規ペプチドである。該ペプチドが通過する細胞の種類に特に制限は無く、原核細胞であっても真核細胞で

あっても良いが、好ましくは真核細胞、より好ましくは哺乳類細胞の細胞膜、さらに好ましくは哺乳類の粘膜細胞膜を通過しうる。また、該ペプチドは、それ自体が細胞膜透過性であるだけでなく、該ペプチドと親水性生理活性物質を共有結合させることで親水性生理活性物質に細胞膜透過性を付与しうることができ、好ましくは該ペプチドと親水性生理活性物質がそれぞれ独立して存在する組成物の状態であっても、親水性生理活性物質に細胞膜透過性を付与することができるペプチドである。

[0025] また、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなる改変ペプチドについても、細胞膜透過性を有する範囲においては本発明の細胞膜透過性ペプチドである。ここで塩基性アミノ酸とはアルギニン、リシン、ヒスチジンいずれかのアミノ酸のことを示す。置換、欠失、挿入または付加される塩基性アミノ酸の数は、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましくは1個である。なお、置換、欠失または挿入により変異したアミノ酸配列において、もとのアミノ酸配列の3つ以上のアミノ酸の連続した並びが保存されていることが好ましく、5つ以上のアミノ酸の連続した並びが保存されていることがより好ましい。さらに、配列番号1で表されるアミノ酸配列の塩基性アミノ酸が別の塩基性アミノ酸に置き換わる改変ペプチドの場合、同一の特性を持つペプチドへの置換はペプチド全体の特性は変化しにくいいため、最も許容されうる改変である。配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチドの好ましい例としては、配列番号2～4, 9～10, 13のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

[0026] また、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、塩基性アミノ酸に限らず1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個、さらに好ましくは1個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなる改変ペプチドについても、細胞膜透過性を有する範囲においては

本発明の細胞膜透過性ペプチドである。なお、配列番号1で表されるアミノ酸の置換、欠失、挿入または付加による改変ペプチドにおいて、もとのアミノ酸配列の3つ以上のアミノ酸の連続した並びが保存されていることが好ましく、5つ以上のアミノ酸の連続した並びが保存されていることはより好ましい。さらに、配列番号1で表されるアミノ酸配列の塩基性アミノ酸が別の塩基性アミノ酸に置き換わる場合、親水性アミノ酸が別の親水性アミノ酸に置き換わる場合、疎水性アミノ酸が別の疎水性アミノ酸に置き換わる場合など、同一の特性を持つペプチドへの置換はペプチド全体の特性は変化しにくいいため、最も許容されうる。配列番号1で表されるアミノ酸配列において、塩基性アミノ酸に限らず1～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチドの好ましい例としては、配列番号12, 15～30のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

[0027] また、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの逆配列で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列の逆配列で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列の逆配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列において、塩基性アミノ酸に限らず1～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列の逆配列で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列の逆配列において、塩基性アミノ酸に限らず1～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチドであっても、細胞膜透過性を有する範囲においては本発明の細胞膜透過性ペプチドである。ここで、逆配列からなるペプチドとは、構成するアミノ酸の並びが逆であることを示し、例を挙げるとN末端からC末端に向けてのアミノ酸配列の並びがアルギニン、グルタミン、イ

ソロイシン、リシンである時、その逆ペプチドはN末端からC末端に向けてのアミノ酸配列の並びがリシン、イソロイシン、グルタミン、アルギニンであるペプチドを言う。本具体例として、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの逆配列で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであって、細胞膜透過性を有するペプチドである配列番号5または14で表されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

[0028] 本発明の細胞膜透過性ペプチドを構成するアミノ酸は、天然に存在するアミノ酸である立体配置がL体であるアミノ酸の他に、天然のアミノ酸の構造を一部改変した誘導体など非天然のアミノ酸も使用されうる。例えば、立体配置がD体のアミノ酸は、蛋白分解酵素による分解を受けにくいことから有効に使用されうるため、該ペプチドのアミノ酸配列のうち、一部がD体であってもよい。

[0029] また、本発明の細胞膜透過性ペプチドを構成するアミノ酸は自然界での存在の有無に関わらずカルボキシル基とアミノ基を持つ分子であればよく、ヒドロキシル化、リン酸化、あるいはグリコシル化等の生体内で通常見られる翻訳後修飾をされたアミノ酸であっても良いが、好ましくは哺乳類細胞内に通常存在する天然アミノ酸およびその光学異性体からなる配列であり、例を挙げるとアルギニン (Arg)、リシン (Lys)、アスパラギン酸 (Asp)、アスパラギン (Asn)、グルタミン酸 (Glu)、グルタミン (Gln)、ヒスチジン (His)、プロリン (Pro)、チロシン (Tyr)、トリプトファン (Trp)、セリン (Ser)、トレオニン (Thr)、グリシン (Gly)、アラニン (Ala)、メチオニン (Met)、システイン (Cys)、フェニルアラニン (Phe)、ロイシン (Leu)、バリン (Val)、イソロイシン (Ile) などからなるアミノ酸配列である。

[0030] 本発明の細胞膜透過性ペプチドは、当業者に公知の手法により適宜修飾されてもよく、具体的には、糖鎖修飾あるいは蛍光標識、ポリエチレングリコール (PEG) 化またはN末端のアセチル化もしくはC末端のアミド化などの化学的に修飾された誘導体であってもよい。ただし、本発明の細胞膜透過

性ペプチドを後述の医薬組成物に使用する場合は、該ペプチドは修飾されていないことが好ましい。また、本発明の細胞膜透過性ペプチドは線状であっても環状であってもよい。

[0031] 本発明の細胞膜透過性ペプチドは他の公知の細胞膜透過性ペプチドと併用して利用してもよい。また、本発明の細胞膜透過性ペプチドは、細胞膜透過性を有する範囲においては、後述の手法により該ペプチドと他のペプチドまたはタンパク質を融合させた融合ペプチドまたは融合タンパク質の状態でも利用してもよい。

[0032] 本発明の細胞膜透過性ペプチドは、一般的な化学合成法により製造することができる。製造する方法には、通常の液相法及び固相法によるペプチド合成法が含まれる。かかるペプチド合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次結合させ鎖を延長させていくステップワイズエロゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメント・コンデンセーション法とが含まれる。本発明の細胞膜透過性ペプチドの合成は、そのいずれによることもできる。

[0033] 上記ペプチド合成に採用される縮合法も、公知の各種方法に従うことができる。その具体例としては、例えばアジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA（ジフェニルホスホリルアジド）法、DCC+添加物（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシニミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド等）、ウッドワード法等を例示できる。これら各方法に利用できる溶媒もこの種ペプチド縮合反応に使用されることがよく知られている一般的なものから適宜選択することができる。その例としては、例えばジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ヘキサメチルホスホロアミド、ジオキサン、テトラヒドロフラン（THF）、酢酸エチル等またはこれらの混合溶媒等を挙げることができる。

[0034] 上記ペプチド合成反応に際して、反応に関与しないアミノ酸やペプチドに

おけるカルボキシル基は、一般にはエステル化により、例えばメチルエステル、エチルエステル、第三級ブチルエステル等の低級アルキルエステル、例えばベンジルエステル、p-メトキシベンジルエステル、p-ニトロベンジルエステル等のアラルキルエステル等として保護することができる。また、側鎖に官能基を有するアミノ酸、例えばTyrの水酸基は、アセチル基、ベンジル基、ベンジルオキシカルボニル基、第三級ブチル基等で保護されてもよいが、必ずしもかかる保護を行う必要はない。更に、例えばArgのグアニジノ基は、ニトロ基、トシル基、2-メトキシベンゼンスルホニル基、メチレン-2-スルホニル基、ベンジルオキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、アダマンチルオキシカルボニル基等の適当な保護基により保護することができる。上記保護基を有するアミノ酸、ペプチド及び最終的に得られる本発明のペプチドにおけるこれら保護基の脱保護反応もまた、慣用される方法、例えば接触還元法や、液体アンモニア/ナトリウム、フッ化水素、臭化水素、塩化水素、トリフルオロ酢酸、酢酸、蟻酸、メタンスルホン酸等を用いる方法等に従って、実施することができる。

[0035] その他、本発明の細胞膜通過性ペプチドは、遺伝子工学的手法を用いて常法により調製することもできる。このようにして得られる本発明の細胞膜通過性ペプチドは、通常の方法に従って、例えばイオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、向流分配法等のペプチド化学の分野で汎用されている方法に従って、適宜その精製を行うことができる。

[0036] その他、本発明の細胞膜透過性ペプチドは、そのペプチドをコードする核酸の状態で使用されうる。具体的に例をあげると本発明のペプチドとの融合タンパク質をコードする組換え核酸を含みこのペプチドを発現しうるプラスミドベクター、ウイルスベクター、ファージミド、トランスポゾンなどであるが、これに限定されない。また該組換え核酸は、例えば、本発明の細胞膜通過性ペプチドまたは本発明の細胞膜通過性ペプチドとの融合タンパク質の

工業的生産や、体内より取り出した生体由来の細胞への本発明の細胞膜通過性ペプチドをコードする発現ベクターの導入、体内に本発明の細胞膜通過性ペプチドを投与し、体内の細胞に本発明の細胞膜通過性ペプチドまたは融合タンパク質を発現させることなどに、好ましく用いられる。特に、生体外にて本発明の細胞膜通過性ペプチドまたは本発明の細胞膜通過性ペプチドとの融合タンパク質を生産する方法として好適に用いられる。

[0037] なお、前記組換え核酸とは、人工的に作成されたDNAまたはRNAを表す。これはアデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシルなどの核酸を結合させ合成したものや、生物に含まれるDNAまたはRNAの一部を切り出して一部塩基を除去、他の塩基と結合などの修飾により作成したもの、またそれらを複製したものも組換え核酸に含まれる。

[0038] さらに、本発明は細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質を含有した医薬組成物、あるいは本発明の細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質を併用することによる親水性生理活性物質の生体内への投与方法に関する。

[0039] 本発明の細胞膜透過性ペプチドは、該ペプチドそのものの細胞膜透過性だけではなく、親水性生理活性物質に細胞膜透過性を付与しうることから、親水性生理活性物質を有効成分とする医薬組成物に本発明の細胞膜透過性ペプチドを配合する、あるいは親水性生理活性物質と本発明の細胞膜透過性ペプチドを併用して投与することにより、親水性生理活性物質の細胞膜を経た生体内デリバリーが可能となる。より詳しくは、本発明の細胞膜透過性ペプチドは、粘膜細胞膜を好ましく通過しうらだけでなく、親水性生理活性物質に経粘膜吸収性（好ましくは腸管吸収性または鼻腔吸収性）を付与しうることから、親水性生理活性物質の粘膜を経た生体内デリバリーが可能となる。親水性生理活性物質の経粘膜吸収とは、粘膜に投与した親水性生理活性物質が、粘膜層を通過し血液中に移行することであり、その結果は、親水性生理活性物質の血中濃度の上昇または薬理活性の発現で確認できる。親水性生理活性物質の血中濃度は、免疫学的測定法など当業者に通常用いられる方法で測定することができる。薬理活性は、例えば、酵素であればその酵素活性、細

胞の受容体に作用する物質であれば、標的細胞の機能あるいはマーカー物質の産生量を変化させる能力などを指標に測定することができる。例えば、インスリンの薬理活性であれば、投与した動物の血中グルコース濃度を指標に測定することが可能である。

[0040] 親水性生理活性物質に細胞膜透過性、好ましくは経粘膜吸収性を付与する細胞膜透過性ペプチドとしては、前述の本発明の細胞膜透過性ペプチドであれば特に限定されず、具体的には、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列の塩基性アミノ酸の1~7個、好ましくは1~5個、より好ましくは1~2個を置換、欠失、挿入または付加させた改変ペプチドであって、かつ細胞膜透過性を有するペプチドが挙げられる。特に、親水性生理活性物質に鼻腔吸収性を付与し、経鼻投与用医薬組成物に好ましく使用される本発明の細胞膜透過性ペプチドとしては、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列の塩基性アミノ酸の1または2個を置換、欠失、挿入または付加させた改変ペプチドであって、かつ細胞膜透過性を有するペプチドが挙げられる。親水性生理活性物質に鼻腔吸収性を付与する本発明の細胞膜透過性ペプチドであって、配列番号1で表されるアミノ酸配列の塩基性アミノ酸を1または2個置換、欠失、挿入または付加させた改変ペプチドであって、かつ細胞膜透過性を有するペプチドの具体例を表1に示す。なお、改変ペプチドにおいて配列番号1で表されるアミノ酸配列の塩基性アミノ酸が別の塩基性アミノ酸に置き換わる場合、同一の特性を持つペプチドへの置換はペプチド全体の特性が変化しにくいいため、最も許容される。

[0041]

[表1]

配列番号1	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	K
配列A	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	K
配列B	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	K
配列C	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	R	W	K	N	K	K
配列D	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	K	W	K	N	K	K
配列E	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	R	N	K	K
配列F	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	R	K
配列G	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	R
配列番号10	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	R
配列番号9	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	R	K
配列H	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	R	N	K	K
配列I	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	K	W	K	N	K	K
配列J	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	R	W	K	N	K	K
配列K	K	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	K
配列L	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	R
配列M	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	R	K
配列N	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	R	W	R	N	K	K
配列O	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	K	W	K	N	K	K
配列P	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	K	R	W	K	N	K	K
配列Q	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	R	W	K	N	K	R
配列R	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	R	W	K	N	R	K
配列S	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	R	W	R	N	K	K
配列T	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	K	W	K	N	K	K
配列U	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	K	W	K	N	K	R
配列V	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	K	W	K	N	R	K
配列W	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	K	W	R	N	K	K
配列X	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	R	N	K	R
配列Y	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	R	N	R	K
配列Z	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	R	R

[0042] 配列番号1で表されるアミノ酸配列のうち、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ親水性生理活性物質の経粘膜吸収性を有するペプチドの好ましい例としては、配列番号4、配列番号9、配列番号10のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられ、特に、親水性生理活性物質の経鼻吸収性を有するペプチドの好ましい例としては、配列番号9または10で表されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

[0043] また、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、塩基性アミノ酸に限らず1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個、さらに好ましくは1個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加された配列で表される改変ペプチドであって、親水性生理活性物質を経粘膜吸収させる本発

明の細胞膜透過性ペプチドについても、本発明の医薬組成物に使用することができる。なお、置換、欠失または挿入により変異した配列において、もとのアミノ酸配列の3つ以上のアミノ酸の連続した並びが保存されていることが好ましく、5つ以上のアミノ酸の連続した並びが保存されていることはより好ましい。さらに、配列番号1で表されるアミノ酸配列の塩基性アミノ酸が別の塩基性アミノ酸に置き換わる場合、親水性アミノ酸が別の親水性アミノ酸に置き換わる場合、疎水性アミノ酸が別の疎水性アミノ酸に置き換わる場合など、同一の特性を持つペプチドへの置換はペプチド全体の特性は変化しにくいいため、最も許容されうる相違である。

[0044] また、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドの逆配列で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列の逆配列で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列の逆配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列において、塩基性アミノ酸に限らず1～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列の逆配列で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列の逆配列において、塩基性アミノ酸に限らず1～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなるペプチドであって、親水性生理活性物質を経粘膜吸収させる本発明の細胞膜透過性ペプチドについても、本発明の医薬組成物に使用することができる。

[0045] 親水性生理活性物質とは、親水性の特徴を有する生理活性物質のことを表す。親水性とは水への溶解度が高いことを表し、ここでは水1mlあたり1 μ g以上溶解する物質を親水性と定義する。また、生理活性物質とは、生体に作用し生体に変化を及ぼす物質全般を示し、特定の細胞の受容体に結合するタンパク質や、生体内の物質に親和性を有する酵素が例示され、さらに生

体内物質と直接の反応を起こさない物質であっても良く、例えば、血漿の代わりとして増血用途に用いられるデキストランなど、医療用途として生体に投与されうる物質であってもよい。好ましくは、細胞膜や経粘膜構成細胞層などの生体バリアの透過性に乏しいペプチド、タンパク質または核酸であり、より好ましくはペプチドまたはタンパク質である。また、これらの親水性生理活性物質であるタンパク質に糖鎖が結合した糖タンパク質や、ポリエチレングリコール（PEG）化などの化学的な修飾を行った誘導体タンパク質に関しても親水性生理活性物質として好適に用いられる。

[0046] 親水性生理活性物質の分子量は特に限定されるものではないが、細胞膜を通過するうえで分子量が大きすぎると障害となる場合があり、分子量は好ましくは500,000以下、より好ましくは30,000以下である。

[0047] 親水性生理活性物質の具体例としては、副甲状腺ホルモン（PTH）、カルシトニン、インスリン、アンジオテンシン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド（GLP-1）、エキセジン4、ガストリン、成長ホルモン、プロラクチン（黄体刺激ホルモン）、ゴナドトロピン（性腺刺激ホルモン）、サイトロピックホルモン、副腎皮質刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、バソプレシン、オキシトシン、プロチレリン、黄体形成ホルモン（LH）、コルチコトロピン、ソマトロピン、チロトロピン（甲状腺刺激ホルモン）、ソマトスタチン（成長ホルモン刺激因子）、視床下部ホルモン（GnRH）、G-CSF、エリスロポエチン、HGF、EGF、VEGF、アンジオポエチン、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、インターロイキン類、スーパーオキシドジムスターゼ（SOD）、ウロキナーゼ、リゾチーム、ワクチン等が好ましい例として挙げられ、より好ましくはインスリン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン、成長ホルモン、インターフェロン類、インターロイキン類、G-CSF、グルカゴン様ペプチド（GLP-1）、エキセジン4である。

[0048] 本発明では、細胞膜通過性ペプチドと親水性生理活性物質はコンジュゲートを形成することは好ましい態様の1つである。ここでいう「コンジュゲ

ト」とは、2つ以上の物質が同時に動きうる状態を表し、その物質間が共有結合により結合しているもの、イオン結合により静電的に結合しているもの、また結合が存在しない場合であっても立体構造により他方がもう他方の動きを制限し共に動きうる状態にしたものも含まれる。例えば本発明のペプチドを表面に修飾したミセル、リポソーム、高分子などの微粒子の中に生物学的に活性な薬物が封入されているものも「コンジュゲート」を形成していることに含まれる。例を挙げると本発明のペプチドと親水性生理活性物質が共有結合で結ばれているものである。例えば親水性生理活性物質であるタンパク質のアミノ基、カルボキシル基やシステインのもつチオール基と本発明の細胞膜通過性ペプチドが共有結合により結合している医薬組成物である。

[0049] 細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質であるタンパク質をコンジュゲートとする場合には、融合タンパク質として作成してもよい。本発明の細胞膜透過性ペプチドを付与する位置としては特に場所は限定されないが、細胞膜通過性を有するペプチドがタンパク質の外側に提示されており、かつ融合させたタンパク質の活性、機能への影響が低いことが好ましく、N末端またはC末端に融合させることが好ましい。融合させるタンパク質の種類としては特に限定されるものではないが、細胞膜を通過するために分子量が大きすぎる薬物は障害となるため、分子量は好ましくは500,000以下、より好ましくは30,000以下である。

[0050] 細胞膜透過性ペプチドとの融合タンパク質を製造する場合は、一般的な化学合成法により行うことができる。例を示すと、本発明の細胞膜透過性ペプチドとインスリンを混合し縮合剤を添加して結合させる方法や、ペプチド合成装置（例えばApplied Biosystems Medel 433）を用いる方法である。また塩基配列情報に基づいて遺伝子工学的手法を用いて常法により製造することもできる。例を挙げると、タンパク質発現プロモーターを有する遺伝子発現ベクターに本発明の細胞膜透過性ペプチドおよび融合させるタンパク質をコードする塩基配列を組み込み製造する方法である。

[0051] また、本発明では、細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質は、それ

ぞれが共有結合で連結されていない状態で使用されることも好ましい態様の1つである。本発明の医薬組成物を投与する時点で細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質が共有結合によるコンジュゲートを形成していない場合でも、投与後に細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質が混合され、イオン結合や、疎水的作用、電荷的作用によりペプチドと親水性生理活性物質がコンジュゲートを形成することにより目的とする効果を得ることができる。特にこの場合は、親水性生理活性物質への直接修飾が必要無いため、親水性生理活性物質が本来有する生理活性効果への影響が無く好ましい。

[0052] 本発明において、親水性生理活性物質を経粘膜吸収しうる粘膜は特に限定されないが、例をあげれば、目、鼻腔、舌下、肺、口腔、皮膚、膣、腸の粘膜であり、好ましくは鼻腔または腸の粘膜である。また、本発明により親水性生理活性物質を経粘膜吸収させる場合の投与方法についても特に限定されず、経口、経鼻、経腸、経皮、注射投与が挙げられるが、好ましくは経口、経鼻または経腸投与である。

[0053] 本発明において、親水性生理活性物質と細胞膜透過性ペプチドを生体に投与する際の投与量や投与回数は、親水性生理活性物質、投与形態、患者の年齢、体重、症状の重篤度によって適宜選択されうるが、通常成人1日あたり親水性生理活性物質含量として0.01~50mg、好ましくは0.1~20mgの範囲で投与されうる。その際、細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質の配合比率については特に限定されず、配合する親水性生理活性物質の種類、細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質の配合様態により決定することが好ましいが、親水性生理活性物質に十分な作用を付与するために、いずれの配合様態においても作用させる親水性生理活性物質のモル量に対して1倍以上の細胞膜透過性ペプチドを用いることが好ましく、2倍以上の細胞膜透過性ペプチドを用いることがより好ましい。これは細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質が共有結合でコンジュゲートを形成している場合には親水性生理活性物質それぞれに1つ以上の細胞膜透過性ペプチドが結合されている状態を示し、独立した状態で用いる場合は、用いる親水性生

理活性物質のモル量を1とした場合、1以上のモル量の細胞膜透過性ペプチドを含んでいる状態で作用させることを示す。

- [0054] 本発明において、親水性生理活性物質と細胞膜透過性ペプチドを動物（ヒトを含む）に投与する場合の具体的形態に制限はない。例えば、乾燥状態のものあるいは溶液状のものをそのまま投与したり、あるいは賦形剤とともにカプセルに充填して投与したり、さらには乾燥状態のものを水に一旦溶解分散させてから投与したりすることができる。
- [0055] 本発明の医薬組成物は、細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質に加えて、薬学的に許容される添加剤からなる粉末形態、あるいは、水等の媒体および該媒体以外の薬学的に許容される基剤との混合物等からなる液状形態、さらには、薬学的に許容される基剤との組み合わせにより固形化または半固形化した形態等が挙げられる。前記基剤としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機物質が挙げられ、例えば賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤、吸収促進剤等が挙げられる。例を挙げると水、医薬的に許容される有機溶媒、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、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、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（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。
- [0056] また、単純な添加剤に留まらず高度な送達技術との併用も好適に行うことができる。例えば経口投与により本発明の医薬組成物を腸管に送達することを目的として、腸溶性のカプセルや粘膜附着性のヒドロキシプロピルセルロースやスマートハイドロゲルpoly(methacrylic acid) grafted with poly(et

hylene glycol) P(MAA-g-EG)などに包含した医薬組成物とすることは、消化酵素によるペプチドおよび薬物の分解回避の上で好ましい。

実施例

[0057] 実施例 1 : 細胞内へのペプチド移行性評価

<方法>

HeLa細胞を、10% FBSを含むDMEM培地中で96ウェルガラスボトムプレートに0.2ml播種し、37°Cで48~72時間培養して底面に細胞を接着させた。200 μ l PBSで3回洗浄後、アミノ末端にフルオレセイン標識した配列番号1~6のペプチド(シグマジェノシス社委託合成)を終濃度5 μ M、および終濃度10% FBSを含むDMEM培地50 μ lを各ウェルに加えた。CO₂インキュベーターにて3時間インキュベーションした後、10% FBSを含むDMEM培地で3回洗浄し、50 μ lの溶解溶液(10mM Tris-HCl、5mM EDTA、100mM NaCl、1% SDS、100 μ g/mlプロテイナーゼK)を加え、室温で1時間インキュベーションし、細胞および細胞に取り込まれたペプチドを分解した。分解溶液は全量を回収し、蛍光強度測定装置(HORIBA FLUOROMAX-3)で細胞に取り込まれたフルオレセイン量を励起波長494nm、蛍光波長512nmで測定した。

[0058] <結果>

各ウェルに添加した量に対する細胞に取り込まれたフルオレセイン量を図1に示す。それぞれの値は3連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。配列番号6のランダムペプチドがほとんど細胞に取り込まれなかった、すなわち細胞膜透過性ペプチドでなかったのに対し、本発明のペプチドである配列番号1~5のペプチドのフルオレセイン標識体は配列番号6のランダムペプチドの10倍以上の効率で細胞内に取り込まれた。

[0059] 実施例 2 : 細胞内へのインスリン移行促進性評価

<方法>

HeLa細胞を、10% FBSを含むDMEM培地中で96ウェルガラ

スポットプレートに0.2 ml 播種し、37°Cで48~72時間培養して底面に細胞を接着させた。200 μ l PBSで3回洗浄後、アミノ末端にフルオレセイン標識した配列番号1~6のペプチド（シグマジェノシス社委託合成）を終濃度5 μ M、およびローダミン標識ヒトインスリン終濃度100 μ g/ml)で含む10% FBSを含むDMEM培地50 μ lを各ウェルに加えた。CO₂インキュベーターにて3時間インキュベーションした後、10% FBSを含むDMEM培地で3回洗浄した後、50 μ lの溶解溶液（10 mM Tris-HCl、5 mM EDTA、100 mM NaCl、1% SDS、100 μ g/mlプロテイナーゼK）を加え、室温で1時間インキュベーションし、細胞および細胞に取り込まれたローダミン標識インスリンを分解した。分解溶液は全量を回収し、蛍光強度測定装置で細胞に取り込まれたローダミン標識インスリン量を励起波長555 nm、蛍光波長580 nmで測定した。

[0060] また、同様の方法でHeLa細胞にローダミン標識ヒトインスリンおよび配列番号1~6で示されるペプチドを含む溶液を加えインキュベーションした後、10% FBSを含むDMEM培地300 μ lで3回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド溶液で3時間固定し、300 μ l PBSで3回洗浄した。その後5% DiD 'Oil溶液（モルキュラープローブ社）で一晩インキュベーションし、共焦点レーザー顕微鏡（オリンパス社FV-1000）でローダミン標識インスリンの局在を観察した。

[0061] ローダミン標識インスリンは、以下の方法で作製した。20 mgのヒトインスリンを0.5 mlの0.1 N 塩酸に溶解後、3 mlのPBSおよび0.5 mlの0.1 N 水酸化ナトリウムを加えて中和した。これを脱塩カラム（PD-10カラム）を用いて溶液置換し、50 mM NaHCO₃溶液5 ml（インスリン濃度4 mg/ml）を得た。0.5 ml DMSOに溶解した4 mgのNHS-ローダミン（ピラス社）をこれに添加し、室温で終夜反応させた。1 M Tris-HCl（pH8）0.5 mlを加えてさらに室温で30分間反応させた後、PD-10カラムを用いて水に対して脱塩し

、さらに水を加えて最終量10ml（インスリン濃度として2mg/ml）の溶液を得た。

[0062] <結果>

各ウェルに添加した量に対する細胞に取り込まれたローダミン標識インスリン量を図2に示す。それぞれの値は3連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。ローダミン標識インスリンのみ、または配列番号6のランダムな配列を持つペプチドと共に細胞に添加した場合、ほとんど細胞に取り込まれなかったのに対し、本発明のペプチドである配列番号1～5のペプチドを添加したものでは、ランダムペプチドである配列番号6のペプチドを用いた場合に比べ50倍以上の効率でローダミン標識インスリンが細胞内に取り込まれた。

[0063] また、共焦点レーザー顕微鏡でそれぞれ配列番号1～6のペプチドをローダミン標識インスリンと共に添加し、観察した結果を図12に示す。細胞膜透過性ペプチドでない配列番号6のランダムペプチドがローダミン標識インスリンを細胞内部に移行させなかったのに対し、配列番号1～5の本発明の細胞膜透過性ペプチドはローダミン標識インスリンを細胞内部に移行させていることが確認できた。

[0064] 実施例3：細胞内へのポリスチレンビーズ移行促進性評価

<方法>

HeLa細胞を10% FBSを含むDMEM培地中で96ウェルガラスボトムプレートに0.2ml播種し、37℃で48～72時間培養して底面に細胞を接着させた。200μl PBSで3回洗浄後、アミノ末端にフルオレセイン標識した配列番号1～6で示されるペプチド（シグマジェノシス社委託合成）を終濃度1μMおよび蛍光ポリスチレンビーズ（モルキュラープローブ製Fluorospheres Carboxylated Microbeads 0.1μm）終濃度1μl/ウェル、および10% FBSを含むDMEM培地50μlを各ウェルに加えた。CO₂インキュベーターにて3時間インキュベーションした後、10% FBSを含むDMEM培

地で3回洗浄した後、50 μ lの溶解溶液（10 mM Tris-HCl、5 mM EDTA、100 mM NaCl、1% SDS、100 μ g/ml プロテイナーゼK）を加え、室温で1時間インキュベーションし、細胞を分解した。分解溶液は全量を回収し、蛍光強度測定装置で細胞に取り込まれた蛍光ポリスチレンビーズ量を励起波長580 nm、蛍光波長605 nmで測定した。

[0065] <結果>

各ウェルに添加した量に対する細胞に取り込まれた蛍光ポリスチレンビーズ量を図3に示す。それぞれの値は3連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。蛍光ポリスチレンビーズのみ、または細胞膜透過性ペプチドでない配列番号6のランダムペプチドと共に細胞に添加した場合、ほとんど細胞に取り込まれなかったのに対し、本発明のペプチドである配列番号1～5のペプチドを添加したものでは、添加した量の0.7%以上の蛍光ポリスチレンビーズが回収された。

[0066] 実施例4：インスリンの経鼻投与

<方法>

インスリン（WAKO社）粉末を1.5 mlチューブ（エッペンドルフ社）に一定量計りとり、0.1 N HClに溶解した後、同量の0.1 N NaOHを加えインスリン溶液を作製した。インスリン溶液単独、または全アミノ酸配列がL体の配列番号1のペプチド（シグマジェノシス社委託合成）をPBSに溶解し、前述のインスリン溶液と合わせ、それぞれの投与実験においてインスリン（1 IU/kg）、それぞれのペプチド0.5 mMの40 μ l混合溶液を調製した。24時間絶食した体重約200 gのSD系雄性ラットにペントバルビタール50 mg/kgを腹腔内注射することにより麻酔した後、頸部を切開し気管を露出した。ポリエチレンチューブ（INTRAMEDIC PE205, Clay Adams）を気管に挿入し、次に食道を一部切開し同径のチューブを食道の切開部から後鼻孔へむけて慎重に組織に傷をつけぬよう挿入した。後鼻孔へ挿入するチューブの先端を予め脱脂綿と

接着剤で密栓した。薬液の漏れを防ぐために口腔に開いている上顎部の鼻口蓋管を合成接着剤（第一三共株式会社製“アロンアルファA”）で閉じた。そして、調製したインスリン、ペプチド混合液またはインスリンのみを投与前および投与後5、10、15、30、60、120、180、240分後に頸静脈より0.25mlを採血し、血糖値測定装置“ノボアシストプラス”（ノボ社）を用いて血糖値の測定を行った。残りの血液は遠心分離により血漿を分離させ、血漿中インスリン濃度をEIAキット（レビス社）により測定した。生物学的利用能（バイオアベイラビリティ）はインスリン皮下投与時との比較により算出した。

[0067] <結果>

投与後の血中グルコース濃度推移を図4に血中インスリン濃度推移を図5に示す。それぞれの値は3連または6連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。インスリンのみを経鼻投与したラットでは血中のインスリン濃度上昇はほとんど確認できないのに対し、インスリンと共に配列番号1のペプチドを投与したラットでは投与直後よりインスリンの血中移行が認められた。またインスリンの血中移行に伴う薬理活性である血糖値の低下も認められ、血中のインスリン濃度に対応する血糖値低下が確認された。

[0068] 実施例5：インスリンの経鼻投与2

<方法>

実施例4と同様の方法にてインスリンを調整し、インスリン溶液単独、あるいは全アミノ酸配列がL体の配列番号1、配列番号7（オリゴアルギニン）または配列番号8（ペネトラチン）のペプチド（シグマジェノシス社委託合成）をPBSに溶解し、前述のインスリン溶液と合わせ、それぞれの投与実験においてインスリン（1IU/kg）、それぞれのペプチド0.5mMの40μl混合溶液を調製した。それぞれの混合溶液を実施例4に記載と同じ方法でラットに投与し、経時的に採血、測定を行い、血漿中のインスリン濃度を測定し、インスリン皮下投与時との比較により生物学的利用能（バイオアベイラビリティ）を算出した。

[0069] <結果>

3連で行った評価におけるインスリン単独、あるいは配列番号1, 7または8のペプチドとインスリンの混合液を投与した場合のバイオアベイラビリティの平均値および標準誤差を図6に示す。配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する本発明の細胞膜透過性ペプチドは、配列番号7または8の既知の細胞膜透過性ペプチドに対して、有意に高いバイオアベイラビリティを示した。

[0070] 実施例6：インターフェロン β の経鼻投与

<方法>

氷冷下、ヒト天然型インターフェロン β （東レ株式会社製“フェロン”）にTwee n 20添加PBSを1ml加え、6,000,000IU/mlとし、この溶液を100 μ l分取し、Twee n 20添加PBSを566 μ l加えて900,000IU/ml溶液とした。インターフェロン β 単独、あるいは全アミノ酸配列がL体の配列番号1または4のペプチド（シグマジェノシス社委託合成）をPBSに溶解し、前述のインターフェロン β 溶液と合わせ、それぞれの投与実験においてインターフェロン β （ 0.18×10^6 IU/kg）、それぞれのペプチド0.5mMの40 μ l混合溶液を調製し、実施例4に記載の方法と同じ方法で評価を行った。血漿中インターフェロン β 濃度は“ヒトインターフェロン β ELISAキット”（株式会社鎌倉テクノサイエンス）により測定した。

[0071] <結果>

投与後の血漿中インターフェロン β 濃度推移を図7に示す。それぞれの値は3連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。インターフェロン β のみを経鼻投与したラットでは血中のインターフェロン β 濃度上昇は低かったのに対し、インターフェロン β と共に配列番号1または4のペプチドを投与したラットでは投与直後よりインターフェロン β の血中移行が認められた。

[0072] 実施例7：エキセンジン4の経鼻投与

<方法>

エキセンジン4（シグマジェノシス社委託合成）単独、または全アミノ酸配列がL体の配列番号1または配列番号4のペプチド（シグマジェノシス社委託合成）をPBSに溶解し、前述のエキセンジン4溶液と合わせ、それぞれの投与実験においてエキセンジン4（0.25mg/kg）、それぞれのペプチド0.5mMの40μl混合溶液を調製し、実施例4に記載の方法と同じ方法で評価を行った。血漿中エキセンジン4濃度は抗エキセンジン4モノクローナル抗体を固相に、ビオチン標識抗エキセンジン4ポリクローナル抗体およびストレプトアビジン-HRPを検出に用いる、サンドイッチ法ELISA（酵素免疫測定法）により測定した。

[0073] <結果>

投与後の血漿中エキセンジン4濃度推移を図8に示す。それぞれの値は3連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。エキセンジン4のみを経鼻投与したラットでは血中のエキセンジン4濃度の上昇はほとんど見られなかったのに対し、エキセンジン4と共に配列番号1または4のペプチドを投与したラットでは投与直後よりエキセンジン4の血中移行が認められた。

[0074] 実施例8：インスリンの腸管投与

<方法>

実施例4と同様の方法でインスリン溶液を調製した。インスリン単独、または全アミノ酸配列がL体の配列番号1または4のペプチド（シグマジェノシス社委託合成）をPBSに溶解し、前述のインスリン溶液と合わせ、それぞれの投与実験においてインスリン（50IU/kg）、それぞれのペプチド0.5mMの500μl混合溶液を調製した。24時間絶食した体重約200gのSD系雄性ラットにペントバルビタールナトリウム50mg/kgを腹腔内注射することにより麻酔した後、正中線に沿って開腹し、腸管を露出した。回盲接合部から2-3cm回腸よりの部分からシリコンチューブを、およびその上部約10cmの部分からゾンデを挿入し、さらに内側6cmの部分に縫合糸を通した。ゾンデから、あらかじめ37℃に加温したpH7.4のリン酸生理緩衝液（PBS）20mlを流速5ml/minで流し込ん

で内容物を排出させた後、シリコンチューブに栓をして、ゾンデからあらかじめ37°Cに加温したPBSを1ml投与し、30分貯留させた。投与後は速やかにゾンデに栓をして、腸管を腹腔内に戻して切開部をクリップで閉じ安静にした。貯留後、ゾンデおよびシリコンチューブの栓をはずし、ループ内にあらかじめ37°Cに加温したPBS20mlを流速5ml/minで流し込んで内容物を排出させた後、あらかじめ縫合糸を通した6cmの部分を結紮してループを作成した。このループ内にインスリン溶液単独、またはインスリンおよび配列番号1または配列番号4のペプチド混合溶液0.5mlを投与し、腸管を腹腔内に戻し、切開部をクリップで閉じ安静にした。実験中のラットは、温水循環ポンプにより37°Cに加温したホットプレート上に背位で固定し体温調節を行った。投与前および投与後5、10、15、30、60、120、180分後に頸静脈より0.25mlを採血し、血糖値測定装置“ノボアシストプラス”（ノボ社）を用いて血糖値の測定を行った。残りの血液は遠心分離により血漿に分離し、酵素免疫測定法によりインスリン濃度を定量した。同量のインスリン溶液のみを皮下に投与したラットについても、同様にして採血、測定を行なった。

[0075] <結果>

投与後の血中グルコース濃度推移を図9に血中インスリン濃度推移を図10に示す。それぞれの値は3連～6連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。コントロールのインスリン単独の投与時と比較して、配列番号1または4のペプチドとインスリンを併用投与することにより、血中インスリン濃度の明らかな上昇、および血糖値の明らかな低下が認められた（図9および図10）。

[0076] 実施例9：鼻腔傷害性評価

<方法>

実施例4と同様の方法でインスリン単独、またはインスリンおよび配列番号1のペプチド、または5%（w/v）のタウロデオキシコール酸溶液を鼻腔投与した。15分後、鼻腔を10mlの37°Cに加温したPBSで2ml/

minで洗浄した。洗浄溶液は回収し、溶液中に漏洩したLDH活性をLDH活性測定キット（Pointe scientific社）で測定した。

[0077] <結果>

洗浄溶液のLDH活性を図11に示す。それぞれの値は3連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。5% タウロデオキシコール酸ナトリウムと比較し、配列番号1のペプチドとインスリン混合溶液を投与したマウス鼻腔からのLDH放出は有意に低く、PBSやインスリン単独を投与した場合と同程度に低かった。

[0078] 実施例10：細胞内へのインスリン移行促進性評価2

<方法>

配列番号1, 6, 9~11のアミノ末端未標識ペプチド（シグマジェノシス社委託合成）を用いる以外は実施例2と同様の方法によりHeLa細胞へのインスリン移行促進性評価を行った。CO₂インキュベーターでのインキュベーション時間は5時間とし、蛍光強度測定装置で細胞に取り込まれたローダミン標識インスリン量を測定した。

[0079] <結果>

各ウェルに添加した量に対する細胞に取り込まれたローダミン標識インスリン量を図13に示す。それぞれの値は3連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。細胞膜透過性ペプチドでないことが確認されている配列番号6または11のランダムペプチドを細胞に共添加した場合には添加した量の0.05%以下のローダミン標識インスリンしか細胞に取り込まれなかったのに対し、本発明の細胞膜透過性ペプチドである配列番号1または配列番号9または10のペプチドを共添加したものでは、添加したローダミン標識インスリンの0.7%以上が細胞に取り込まれた。

[0080] 実施例11：インスリンの経鼻投与2

<方法>

実施例4と同様の方法にてインスリンを調整し、インスリン溶液単独、または全アミノ酸配列がL体の配列番号1, 9, 10のペプチド（シグマジェ

ノシス社委託合成)をPBSに溶解し、前述のインスリン溶液と合わせ、それぞれの投与実験においてインスリン(1 IU/kg)、それぞれのペプチド0.5 mMの40 μ l混合溶液を調製した。それぞれの混合溶液を実施例4に記載と同じ方法でラットに投与し、経時的に採血、測定を行い、血漿中のインスリン濃度を測定し、血中濃度(μ U/ml)と時間(分)の推移を元にAUC(薬物血中濃度-時間曲線下面積)を算出した。

[0081] <結果>

3連または6連で行った評価におけるインスリン単独、および、配列番号1、配列番号9または10のペプチドとインスリンの混合液を投与した場合のAUCの平均値および標準誤差を図14に示す。配列番号1、9、10の細胞膜透過性ペプチドとインスリンを併用投与した場合は、インスリン単独を投与した場合に対して、有意に高いインスリンの鼻腔吸収性を示した。

[0082] 実施例12：細胞内へのインスリン移行促進性評価3

<方法>

実施例2と同様の方法を用いて配列番号6、12~30のアミノ末端にフルオレセイン標識したペプチド(シグマジェノシス社委託合成)を用いてHeLa細胞へのインスリン移行促進性評価を行った。CO₂インキュベーターでのインキュベーション時間は5時間とし、蛍光強度測定装置で細胞に取り込まれたローダミン標識インスリン量を測定した。また、実施例1と同様の方法で細胞に取り込まれたフルオレセイン量を測定した。

<結果>

各ウェルに添加した量に対する細胞に取り込まれたフルオレセイン量を図15に示す。それぞれの値は2連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。配列番号6で示すランダムな配列を持つペプチドでは、添加したフルオレセイン量の0.2%程度しか細胞内に取り込まれなかったのに対し、配列番号12~30で示される本発明の細胞膜透過性ペプチドでは、いずれも0.8%以上が細胞内に取り込まれた。

[0083] また、各ウェルに添加した量に対する細胞に取り込まれたローダミン標識

インスリン量を図16に示す。それぞれの値は2連で行った評価の平均値と標準誤差を示す。細胞膜透過性ペプチドでない配列番号6のランダムペプチドでは、添加したローダミン標識インスリン量の0.2%程度しか細胞内に取り込まれなかったのに対し、配列番号12~30の本発明の細胞膜透過性ペプチドを共添加した場合にはいずれも1%以上が細胞内に取り込まれた。

産業上の利用可能性

[0084] 本発明により、これまで困難であった親水性生理活性物質の細胞内導入が容易になり、新たな医療技術の展開が期待できる。具体的には、本発明の細胞膜透過性ペプチドにより親水性生理活性物質を経粘膜投与可能な製剤が得られるため、従来の親水性生理活性物質を含む製剤（例えば、注射剤）が与える患者の苦痛、不便を大幅に改善することにより医療現場における患者本位の医療を実現するだけでなく、これまでの親水性生理活性物質製剤の概念を根底から変え、画期的製剤の創製につながる。

配列表フリーテキスト

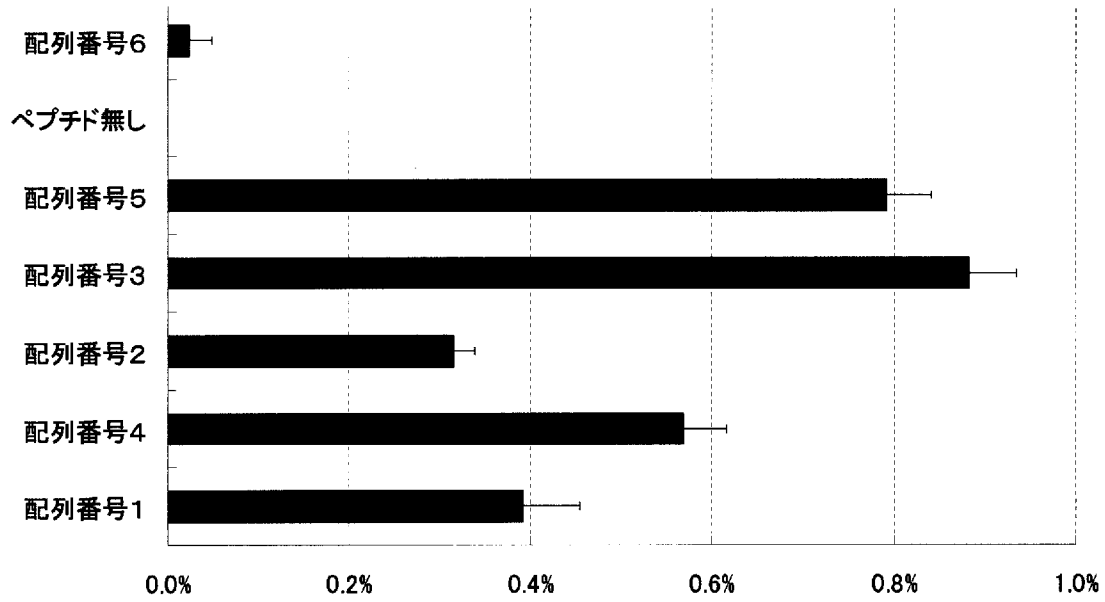
[0085] 配列番号1~5 本発明の細胞膜透過性ペプチド
配列番号6 ランダムペプチド
配列番号7 オリゴアルギニン
配列番号8 ペネトラチン
配列番号9~10 本発明の細胞膜透過性ペプチド
配列番号11 ランダムペプチド2
配列番号12~30 本発明の細胞膜透過性ペプチド

請求の範囲

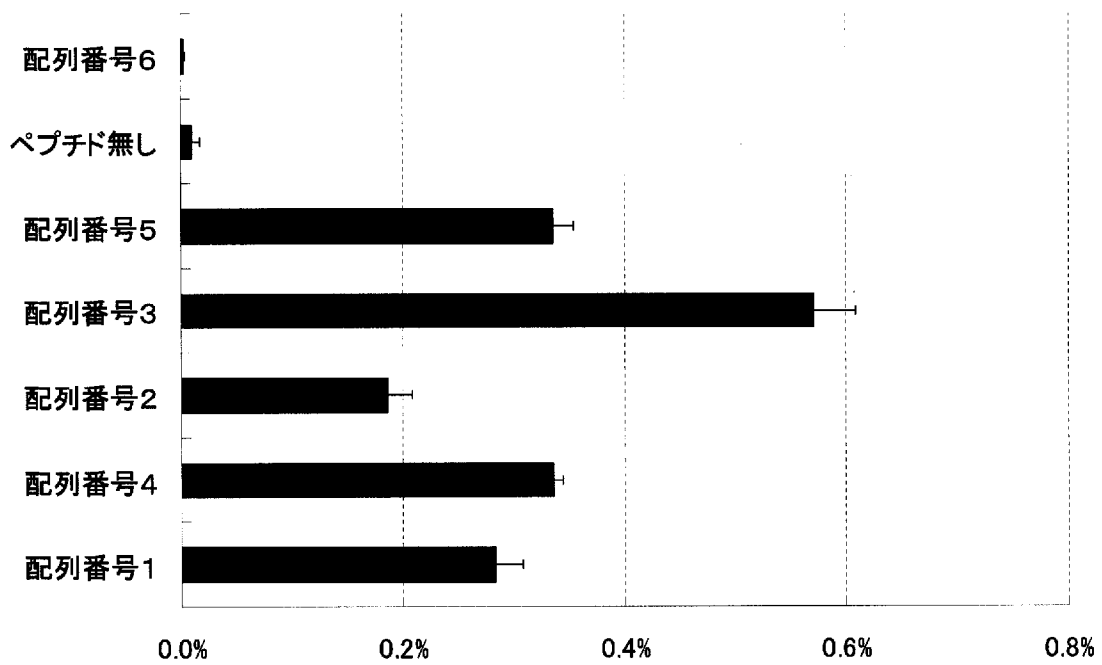
- [請求項1] 以下の（A）～（D）のいずれかの細胞膜透過性ペプチド。
- （A）配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。
- （B）配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチド。
- （C）配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチド。
- （D）（A）～（C）のいずれかの逆配列で表されるアミノ酸配列、（A）の逆配列で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個の塩基性アミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列、あるいは（A）の逆配列で表されるアミノ酸配列において、1～5個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞膜透過性を有するペプチド。
- [請求項2] 前記（B）のペプチドが配列番号2～4，9～10，13のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の細胞膜透過性ペプチド。
- [請求項3] 前記（C）のペプチドが配列番号12，15～30のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる、請求項1または2に記載の細胞膜透過性ペプチド。
- [請求項4] 前記（D）のペプチドが配列番号5または14で表されるアミノ酸配列からなる、請求項1～3のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチド。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質を含む、医薬組成物。
- [請求項6] 請求項1～4のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質を含む、経口投与用医薬組成物。

- [請求項7] 請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の細胞膜透過性ペプチドと親水性生理活性物質を含む、経鼻投与用医薬組成物。
- [請求項8] 親水性生理活性物質がペプチド、タンパク質または核酸である、請求項 5 ～ 7 のいずれかに記載の医薬組成物。

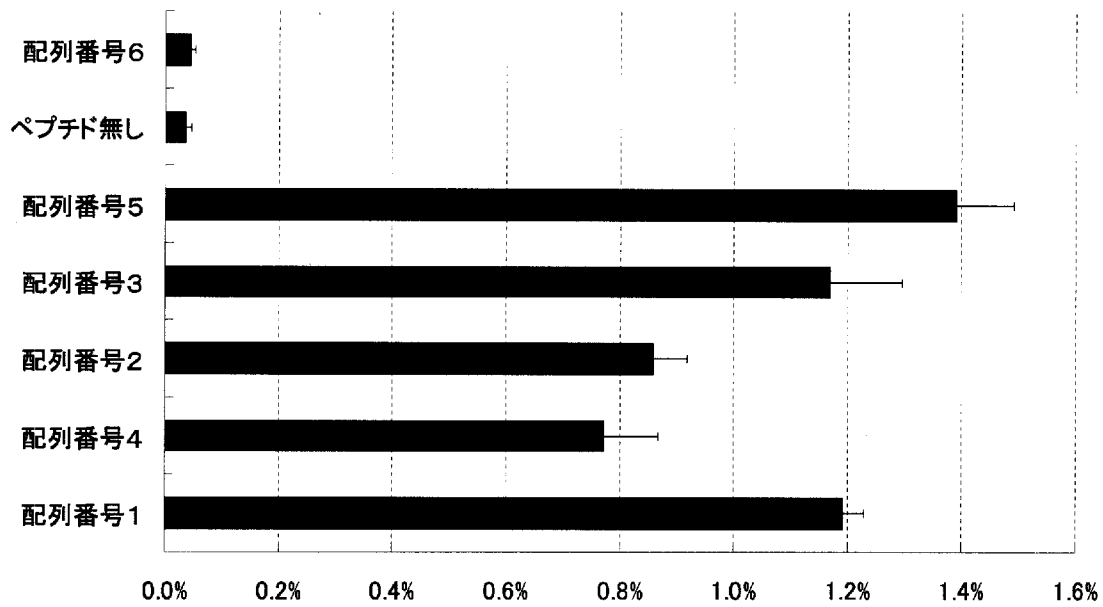
[図1]



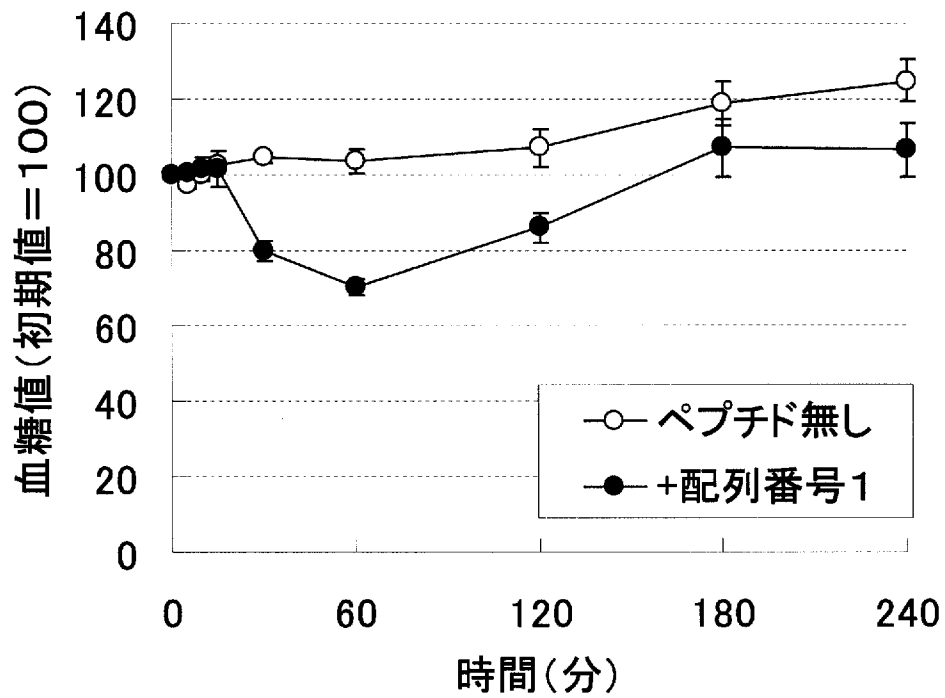
[図2]



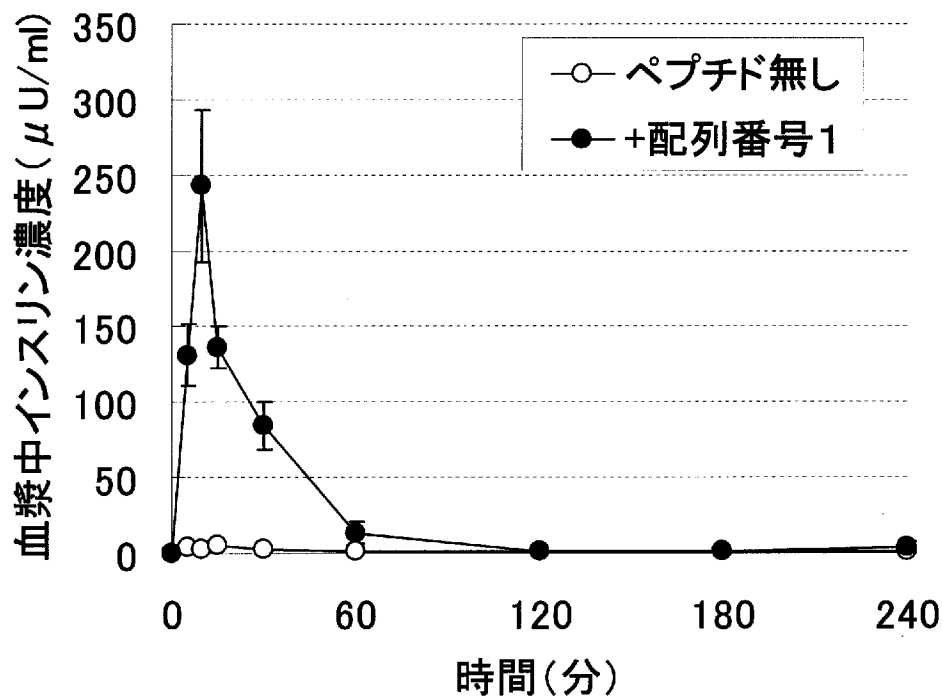
[図3]



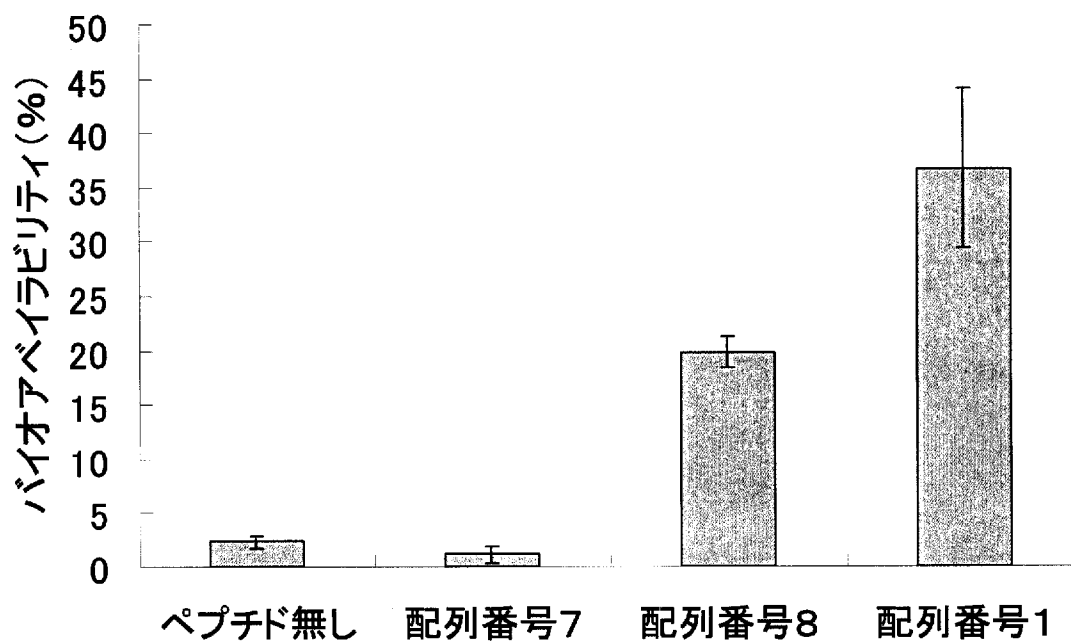
[図4]



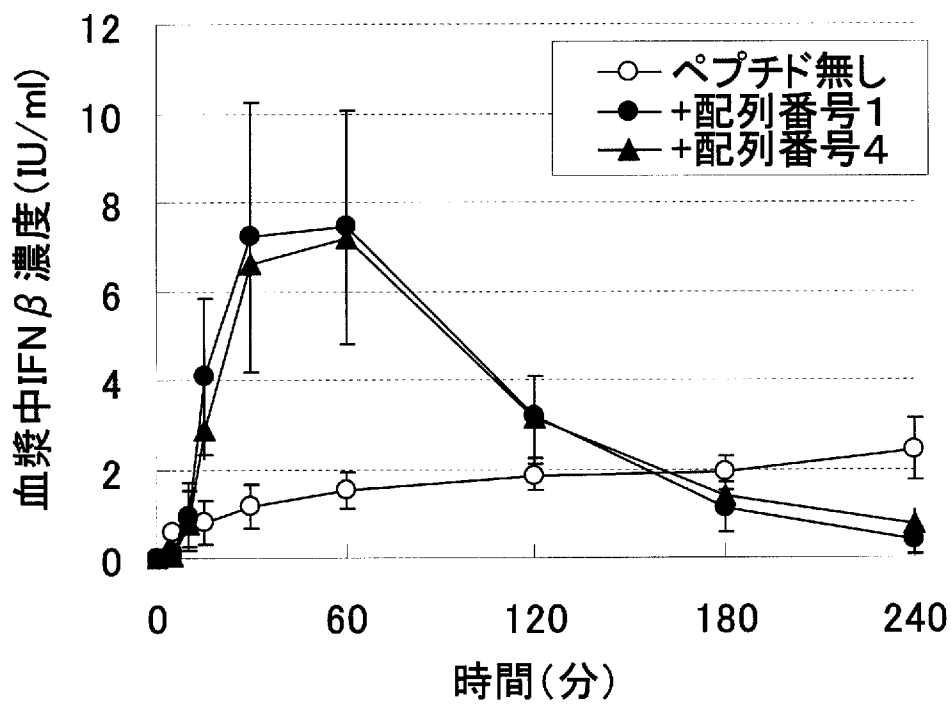
[図5]



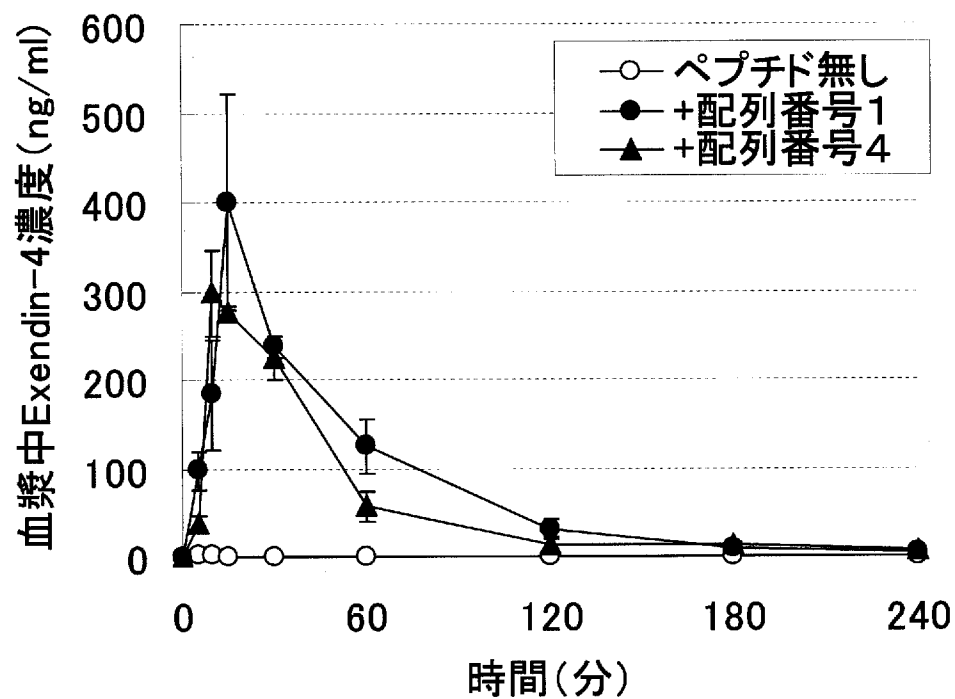
[図6]



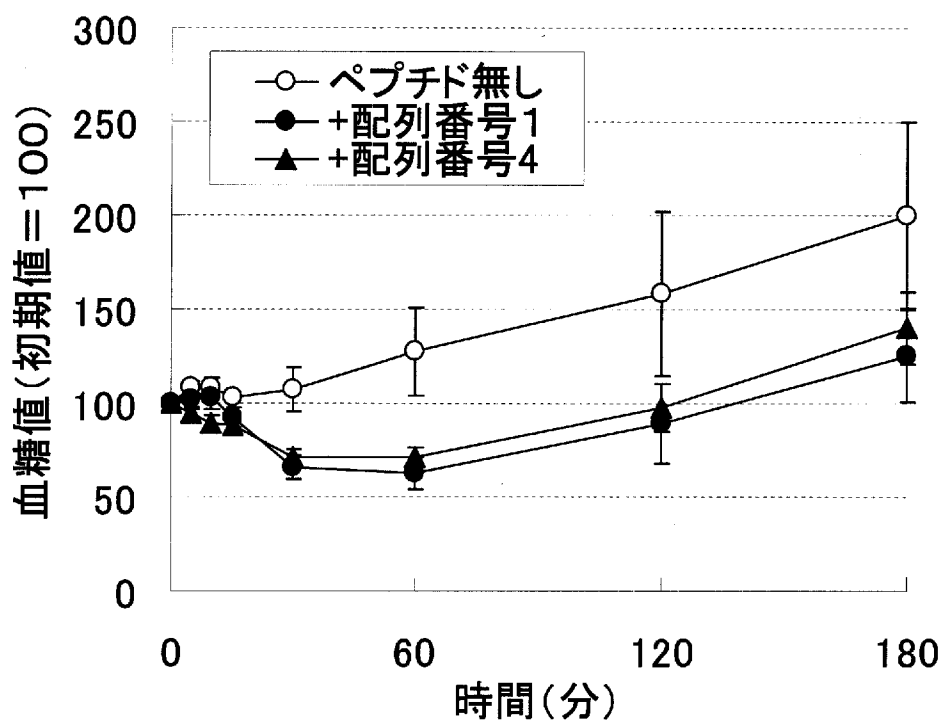
[図7]



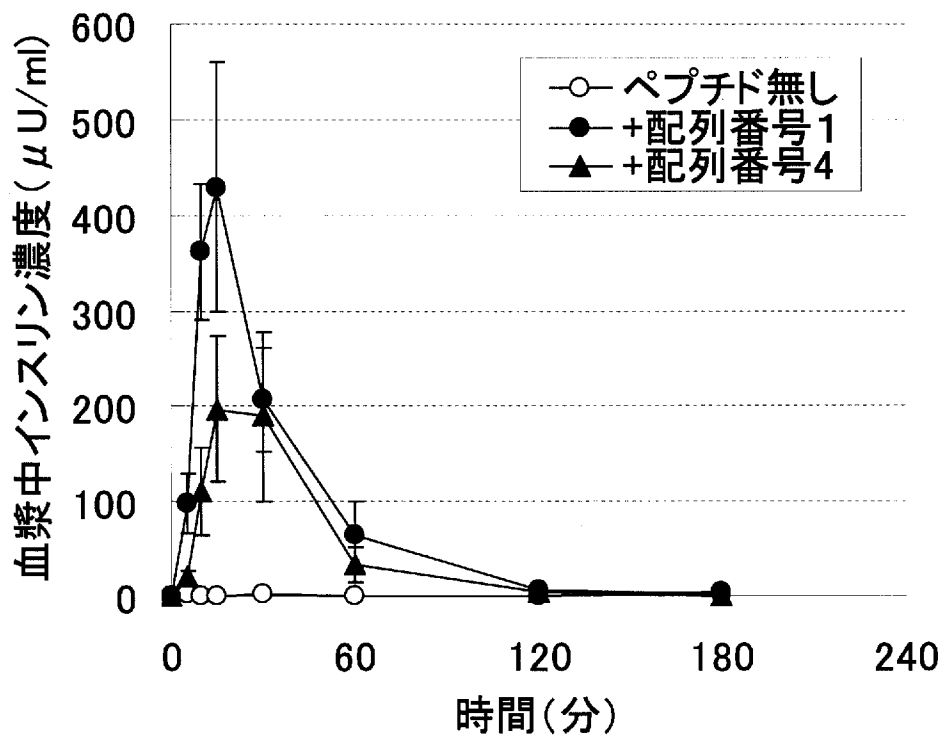
[図8]



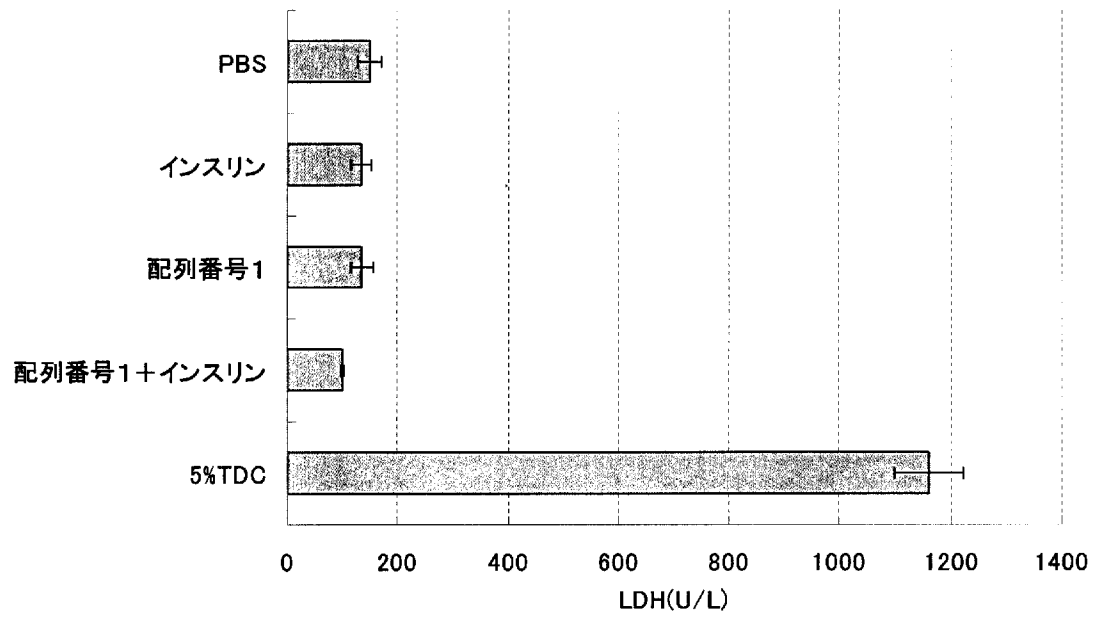
[図9]



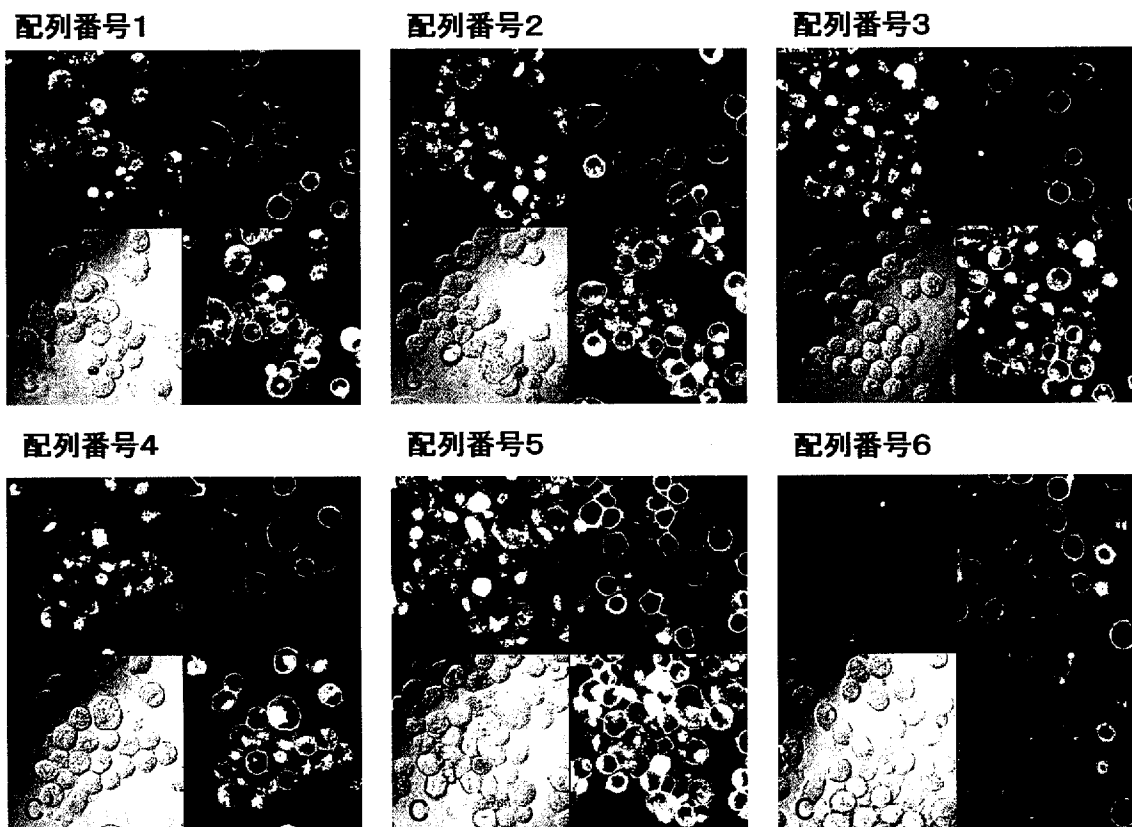
[図10]



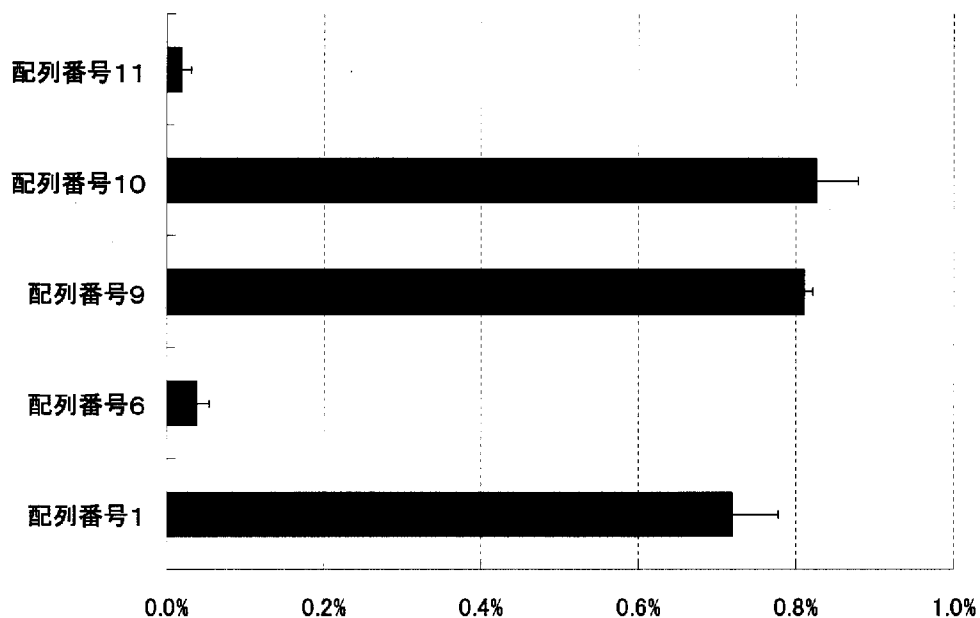
[図11]



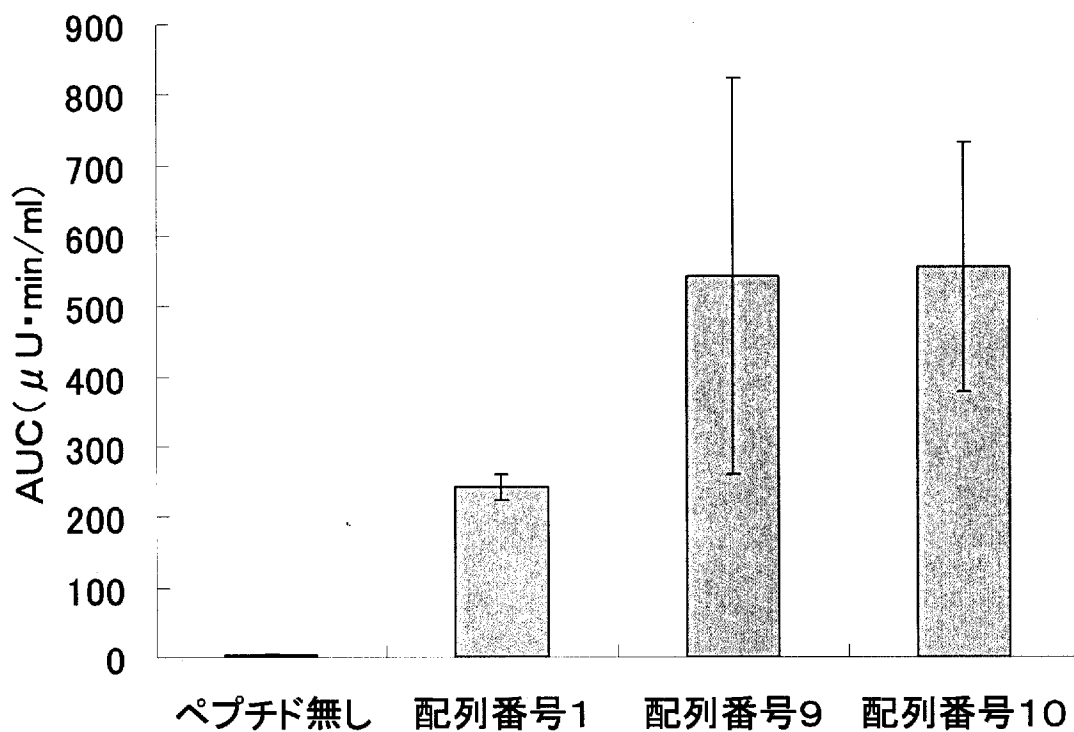
[図12]



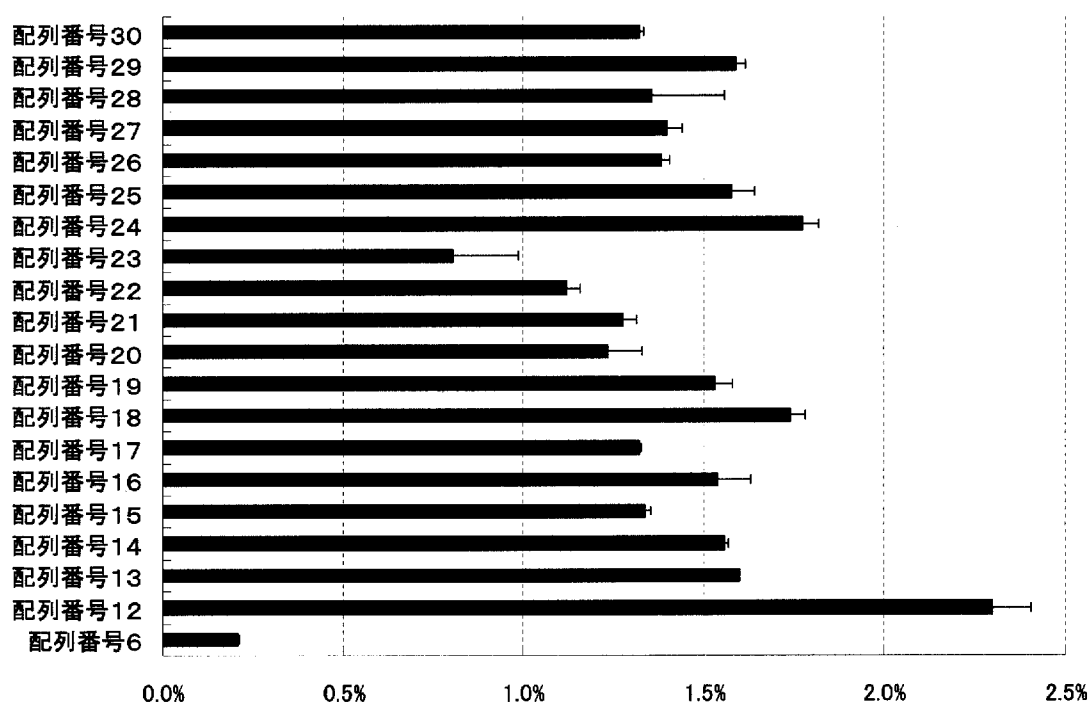
[図13]



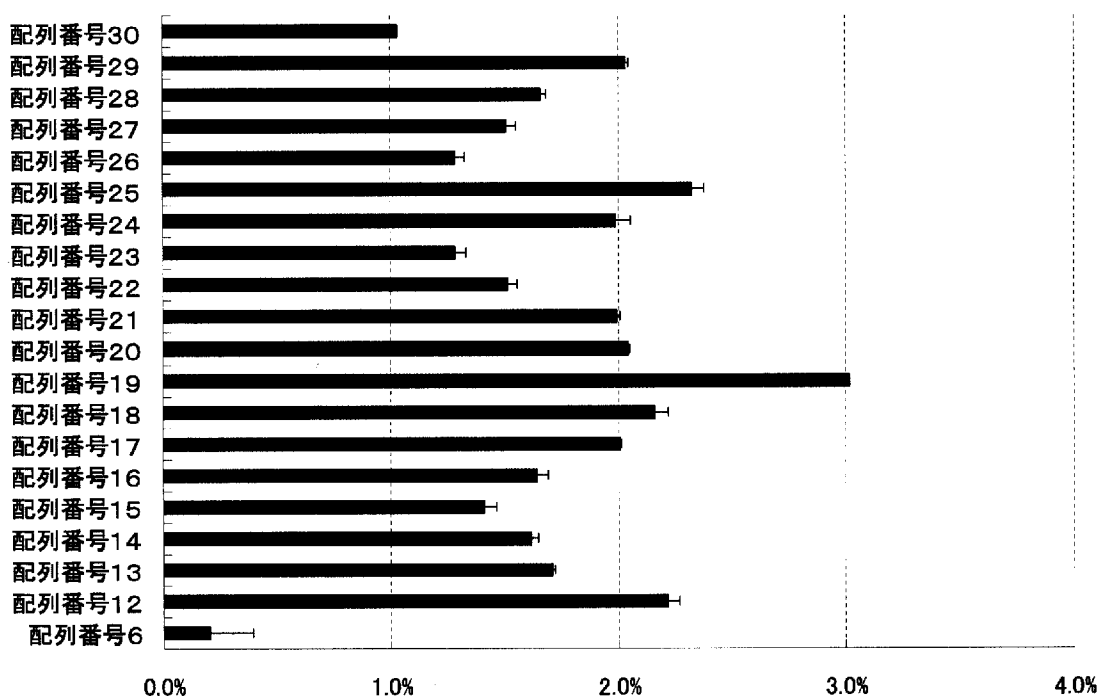
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/08(2006.01) i, A61K9/38(2006.01) i, A61K38/28(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)

C07K7/08, A61K9/38, A61K38/28

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KHAFAGY, el-S. et al., Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin, J.Control.Release, 2009.01, Vol.133, No.2, p.103-108	1-8
A	Yoshiaki TERASAWA et al., "Bio Yakubutsu no Koritsuteki Shokakan Kyushu o Mezasita Shinki Saibomaku Toka Peptide no Kaihatsu", Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Japan, 30 April 2009 (30.04.2009), vol.69, no.Suppl., p.95	1-8
P, X	KHAFAGY, el-S. et al., Structural requirements of penetratin absorption enhancement efficiency for insulin delivery, J.Control.Release, 2010.05.10, Vol.143, No.3, p.302-310	1-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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
09 August, 2010 (09.08.10)Date of mailing of the international search report
24 August, 2010 (24.08.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058420

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	KHAFAGY, el-S. et al., The role of intermolecular interactions with penetratin and its analogue on the enhancement of absorption of nasal therapeutic peptides, Int.J.Pharm., 2010.03.30, Vol.388, No.1-2, p.209-212	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K7/08(2006.01) i, A61K9/38(2006.01) i, A61K38/28(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 (IPC))
 Int.Cl. C07K7/08, A61K9/38, A61K38/28

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
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010年

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)
 CA/REGISTRY (STN), PubMed, JSTPlus (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 請求項の番号
A	KHAFAGY, el-S. et al., Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin, J. Control. Release, 2009. 01, Vol. 133, No. 2, p. 103-108	1-8
A	寺澤 義明 他, バイオ薬物の効率的消化管吸収を目指した新規細胞膜透過ペプチドの開発, 薬剤学, 2009. 04. 30, Vol. 69, No. Suppl., p. 95	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 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</p>	<p>の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</p>
---	---

国際調査を完了した日 09.08.2010	国際調査報告の発送日 24.08.2010
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/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) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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 請求項の番号
P, X	KHAFAGY, el-S. et al., Structural requirements of penetratin absorption enhancement efficiency for insulin delivery, J. Control. Release, 2010. 05. 10, Vol. 143, No. 3, p. 302-310	1-8
P, X	KHAFAGY, el-S. et al., The role of intermolecular interactions with penetratin and its analogue on the enhancement of absorption of nasal therapeutic peptides, Int. J. Pharm., 2010. 03. 30, Vol. 388, No. 1-2, p. 209-212	1-8