

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 304**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010** **E 10777770 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 2433953**

54 Título: **Péptidos permeables para la membrana celular**

30 Prioridad:

20.05.2009 JP 2009122096

26.03.2010 JP 2010071774

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2015

73 Titular/es:

TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku
Tokyo 103-8666, JP

72 Inventor/es:

MORISHITA, MARIKO;
TAKAYAMA, KOZO;
NISHIO, REIJI y
IDA, NOBUO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 546 304 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos permeables para la membrana celular

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo péptido que tiene permeabilidad para la membrana celular y a una composición farmacéutica que comprende al péptido y una sustancia hidrófila fisiológicamente activa.

10 Técnica antecedente

Las células se aíslan del exterior mediante la membrana celular, que es impermeable a sustancias hidrófilas fisiológicamente activas tales como proteínas y ácidos nucleicos. La ausencia de métodos para administrar dichas sustancias hidrófilas fisiológicamente activas al interior de la célula ha impedido el uso clínico de muchas sustancias hidrófilas fisiológicamente activas cuyos sitios de acción se localizan dentro de las células.

Se han comunicado varias técnicas para administrar dichas sustancias hidrófilas fisiológicamente activas impermeables para la célula. El método más popular es uno que confiere hidrofobicidad a una sustancia hidrófila fisiológicamente activa usando un lípido, y, mediante este, puede aumentar la permeabilidad a través de la membrana celular. Además, también se ha notificado una técnica en la que se usa un ligando peptídico para aumentar la permeabilidad.

Un ligando peptídico que tiene una propiedad que permite su transferencia desde el exterior de la célula al interior de la célula sin destruir la membrana celular se denomina un péptido de penetración en la célula. Los ejemplos de péptidos de penetración en la célula bien conocidos incluyen oligoargininas, en los que las argininas están unidas entre sí; Tat (Documento de patente 1), que procede del virus VIH-1; y penetratina (Documento de patente 2), que es un péptido procedente de *Drosophila*. Además de estos, también se han comunicado diversos péptidos de penetración en la célula, tales como aquellos que se caracterizan por la basicidad simple, aquellos que se caracterizan por la anfipaticidad de la estructura primaria o la estructura secundaria del péptido, y aquellos que tienen un mecanismo que no se ha aclarado. Además de la permeabilidad del péptido en sí mismo dentro de la célula, se ha estudiado exhaustivamente su uso para la administración en la célula de una sustancia hidrófila fisiológicamente activa, tal como, un gen al que se unen los péptidos como un vehículo. Sin embargo, aunque estos péptidos han tenido éxito como reactivos para investigación, solamente puede usarse un pequeño número de péptidos para su aplicación clínica. Por lo tanto, los péptidos se han estudiado de diversos modos, y, en cada uso, se están buscando las secuencias con las que se puedan transferir los péptidos en las células de un modo más eficaz.

Se ha informado que una parte de los péptidos de penetración en la célula son capaces de promover la permeación de una sustancia hidrófila fisiológicamente activa a través de la capa de células de epiteliales de la mucosa en los casos en los que estos se administren por vía oral o intranasal junto con la sustancia hidrófila fisiológicamente activa, permitiendo que la sustancia hidrófila fisiológicamente activa pase a la circulación general con una alta eficacia. Se cree que no todos los péptidos de penetración en la célula tienen la capacidad de promover la permeación a través de la mucosa, y que no solamente la permeabilidad a la membrana sino también la dinámica intracelular, la separación de la célula y similares están implicados en la actividad promotora de la permeación. Por lo tanto, se cree que solamente una parte de los péptidos de penetración en la célula, que satisfacen estas condiciones, tiene la capacidad de promover la absorción transmucosal de sustancias hidrófilas fisiológicamente activas. Sin embargo, se ha comunicado que solamente un pequeño número de tipos de péptidos tienen dicha función. Además, los péptidos para los cuales se ha comunicado la capacidad promotora de la absorción transmucosal son aquellos con los que solamente se puede confirmar el efecto en casos en los que se usan en la forma de conjugados con sustancias fisiológicamente activas particulares (Documentos de Patente 2 y 3); y aquellos que requieren, incluso en casos en los que se muestra que la posibilidad de que los péptidos puedan usarse en las formas que no requieran enlaces covalentes con un fármaco, se usan grandes cantidades de los péptidos de penetración en la célula con el fin de obtener un efecto suficiente (Documento de Patente 4). Por lo tanto, sigue habiendo muchos problemas por resolver antes del uso práctico de los péptidos.

En los últimos años, además de los fármacos hidrófilos de bajo peso molecular, que se han usado principalmente hasta el momento, las sustancias hidrófilas fisiológicamente activas están llamando la atención como compuestos candidatos para productos farmacéuticos. Aunque las sustancias hidrófilas fisiológicamente activas han mostrado efectos terapéuticos notables, su poca capacidad de absorción transmucosal ha limitado el método para su administración prácticamente solamente a inyección. Por lo tanto, se desea encarecidamente el desarrollo de una tecnología para permitir la absorción de sustancias hidrófilas fisiológicamente activas con el fin de administrar sustancias hidrófilas fisiológicamente activas sin inyección. En particular, se espera que la técnica de promoción de la absorción usando un péptido de penetración en la célula muestre un nivel más bajo de estimulación para la mucosa en comparación con la técnica de promoción de la absorción que usa tensioactivos, que se ha estudiado exhaustivamente hasta el momento, y el descubrimiento de péptidos de penetración en la célula que causan la promoción de la absorción pueda conducir al desarrollo de una técnica prometedora.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de Patente

- 5 [Documento de Patente 1] JP 10-33186 A
 [Documento de Patente 2] Solicitud de Patente Japonesa PCT abierta a la inspección pública N°. 2002-530059
 [Documento de Patente 3] JP 2004-33186 A
 [Documento de Patente 4] JP 10-95738 A

10 Divulgación de la invención**Problemas a resolver por la invención**

- 15 La presente invención pretende proporcionar un nuevo péptido de penetración en la célula que pueda permitir la permeación de una sustancia hidrófila fisiológicamente activa al interior de la célula.

Medios para resolver los problemas

- 20 Los presentes inventores buscaron secuencias peptídicas que tenían permeabilidad a la membrana y descubrieron nuevas secuencias peptídicas que tienen la permeabilidad deseada para la membrana celular.

La presente invención proporciona péptidos de penetración en la célula y composiciones farmacéuticas, tal como se define en las reivindicaciones.

25 Efecto de la invención

- Mediante la presente invención, es posible la transferencia eficaz de sustancias hidrófilas fisiológicamente activas al interior de las células y es posible una nueva farmacoterapia dirigida de moléculas en la célula. Además, una sustancia hidrófila fisiológicamente activa que se ha podido administrar solamente por inyección puede administrarse mediante administración oral, administración intranasal o similares, permitiendo una farmacoterapia simple y orientada al paciente.
- 30

Breve descripción de los dibujos

- 35 La Fig. 1 es una gráfica que muestra la transferencia de péptidos de penetración en la célula al interior de células HeLa.
 La Fig. 2 es una gráfica que muestra la promoción de la transferencia de insulina al interior de células HeLa mediante péptidos de penetración en la célula.
 La Fig. 3 es una gráfica que muestra la promoción de la transferencia de perlas de poliestireno al interior de células HeLa mediante péptidos de penetración en la célula.
 La Fig. 4 es una gráfica que muestra el nivel de glucosa en sangre como un índice de la absorción intranasal de insulina, que se observó cuando se usó un péptido de penetración en la célula.
 La Fig. 5 es una gráfica que muestra el nivel de insulina en plasma como un índice de la absorción intranasal de insulina, que se observó cuando se usó un péptido de penetración en la célula.
 La Fig. 6 es una gráfica que muestra la biodisponibilidad como un índice de la absorción intranasal de insulina, que se observó cuando se usaron péptidos de penetración en la célula.
 La Fig. 7 es una gráfica que muestra el nivel de interferón- β en plasma como un índice de la absorción intranasal de interferón- β , que se observó cuando se usaron péptidos de penetración en la célula.
 La Fig. 8 es una gráfica que muestra el nivel de exendina-4 en plasma como un índice de la absorción intranasal de exendina-4, que se observó cuando se usaron péptidos de penetración en la célula.
 La Fig. 9 es una gráfica que muestra el nivel de glucosa en sangre como un índice de la absorción intestinal de insulina, que se observó cuando se usaron péptidos de penetración en la célula.
 La Fig. 10 es una gráfica que muestra el nivel de insulina en plasma como un índice de la absorción intestinal de insulina, que se observó cuando se usaron péptidos de penetración en la célula.
 La Fig. 11 es una gráfica que muestra la filtración de LDH como un índice de la toxicidad intranasal de un péptido de penetración en la célula.
 La Fig. 12 muestra imágenes de microscopía confocal de láser que muestran la promoción de la transferencia de insulina dentro de células HeLa por los péptidos de penetración en la célula respectivos. En cada diagrama, A (arriba a la izquierda) muestra la localización de la insulina marcada con rodamina; B (arriba a la derecha) muestra la membrana celular teñida con aceite DiI; C (abajo a la izquierda) muestra una imagen de interferencia diferencial; y A+B (d) (abajo a la derecha) muestra una imagen superpuesta de la imagen A y la imagen B.
 La Fig. 13 es una gráfica que muestra la promoción de transferencia de insulina en células HeLa por péptidos de penetración en la célula.
 La Fig. 14 es una gráfica que muestra el ABC como un índice de la absorción intranasal de insulina, que se observó cuando se usaron péptidos de penetración en la célula.
 La Fig. 15 es una gráfica que muestra la transferencia de péptidos de penetración en la célula dentro de células
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

HeLa.

La Fig. 16 es una gráfica que muestra la promoción de la transferencia de insulina dentro de células HeLa mediante péptidos de penetración en la célula.

5 Mejor modo para llevar a cabo la invención

Los presentes inventores descubrieron novedosamente que un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID N°: 1 (en lo sucesivo en el presente documento citada como SEC ID N°: 1) o su péptido modificado es un péptido de penetración en la célula, completando de este modo la presente invención. Los péptidos de penetración en la célula de la presente invención se describirán detalladamente a continuación.

La permeabilidad de la membrana celular de un péptido de la presente invención significa una propiedad para pasar a través de una membrana lipídica que separa el interior de la célula del exterior de la misma. Puede confirmarse si un péptido tiene o no permeabilidad para la membrana celular uniendo una sustancia fluorescente al péptido y añadiendo el resultado a las células, seguido de la observación de las células por un microscopio confocal de láser o similar para observar si la sustancia fluorescente puede detectarse dentro de las células. Además, la confirmación cuantitativa de la permeabilidad en las células puede llevarse a cabo incorporando la sustancia fluorescente unida al péptido en las células y homogeneizando las células, seguido de la medición de la intensidad de fluorescencia del homogeneizado usando un espectrofotómetro. En la presente memoria descriptiva, en los casos en los que la cantidad de permeación de una sustancia fluorescente (por ejemplo, péptido unido a fluoresceína) en las células no es menos de 3 veces más alta que la cantidad de permeación de una sustancia fluorescente unida a un péptido no permeable para la membrana celular que tenga la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 6 en las células, se considera que el péptido anterior es un péptido de penetración en la célula.

Además, los péptidos de penetración en la célula de la presente invención tienen la propiedad de conferir permeabilidad para la membrana celular a sustancias hidrófilas fisiológicamente activas. En la presente memoria descriptiva, cuando la eficacia de permeación de una sustancia hidrófila fisiológicamente activa marcada fluorescentemente en las células no es menos de 3 veces más alta en los casos en los que la sustancia hidrófila fisiológicamente activa marcada fluorescentemente se une o se mezcla con un péptido y se pone en contacto con células que en los casos en los que la sustancia hidrófila fisiológicamente activa solamente se pone en contacto con las células, se considera que el péptido tiene una propiedad de conceder permeabilidad para la membrana celular a la sustancia hidrófila fisiológicamente activa.

Además, los péptidos de penetración en la célula de la presente invención tienen una propiedad de conferir capacidad de absorción transmucosal (preferentemente capacidad de absorción intestinal o capacidad de absorción intranasal) a las sustancias hidrófilas fisiológicamente activas. Más en particular, incluso en casos en los que una sustancia hidrófila fisiológicamente activa en sí se absorbe difícilmente en el organismo vivo a través de la mucosa, su absorción transmucosal (preferentemente absorción intestinal o absorción intranasal) se promueve poniendo la sustancia hidrófila fisiológicamente activa unida a o mezclada con un péptido de penetración en la célula en contacto con el tejido mucoso (preferentemente tejido intestinal o tejido intranasal).

El péptido de tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID N°: 1 es un nuevo péptido descubierto mediante la exploración de péptidos de penetración en la célula. El tipo de la célula a través de la cual pasa el péptido no está restringido y puede ser bien una célula procariota o una célula eucariota, y el péptido puede pasar preferentemente a través de la membrana celular de una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, aún más preferentemente a través de la membrana de una célula mucosa de un mamífero. El péptido en sí mismo tiene permeabilidad para la membrana celular, y además, mediante unión covalente del péptido con una sustancia hidrófila fisiológicamente activa, puede conferir permeabilidad para la membrana celular a la sustancia hidrófila fisiológicamente activa. Preferentemente, el péptido puede conferir permeabilidad para la membrana celular a una sustancia hidrófila fisiológicamente activa incluso en casos en los que el péptido y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa existan independientemente entre sí en una composición.

Además, un péptido modificado que tenga una secuencia de aminoácidos que sea igual a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 excepto en que uno o varios aminoácidos básicos se sustituyen por otros aminoácidos básicos también es un péptido de penetración en la célula de la presente invención en tanto que el péptido modificado tenga permeabilidad para la membrana celular. En el presente documento, un aminoácido básico significa cualquiera de los aminoácidos arginina, lisina e histidina. El número de aminoácido(s) básico(s) sustituidos(s) es preferentemente de 1 a 7, más preferentemente de 1 a 5, aún más preferentemente de 1 a 3, de manera especialmente preferente 1. En la secuencia de aminoácidos que se ha mutado mediante la sustitución, se conserva preferentemente una secuencia de aminoácidos de no menos de 3 aminoácidos contiguos en la de aminoácidos secuencia original y se conserva más preferentemente una secuencia de aminoácidos de no menos de 5 aminoácidos contiguos en la de aminoácidos secuencia original. Además, en el caso de un péptido modificado producido por la sustitución de un(os) aminoácido(s) básico(s) de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 por otro(s) aminoácido(s) básico(s), la modificación es la más aceptable dado que la sustitución por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades probablemente no cambiará las propiedades generales del péptido. Los ejemplos preferentes del péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma que la

secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 excepto en que se sustituyen uno o varios aminoácidos básicos, teniendo este péptido permeabilidad para la membrana celular, incluyen péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por cualquiera de las SEC ID N°: 2 a 4; 9 a 10 y 13.

5 Además, un péptido modificado que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 excepto porque de 1 a 3, preferentemente de 1 a 2, aún más preferentemente 1 aminoácido(s), que no está(n) limitado(s) a aminoácido(s) básico(s), se sustituye(n), elimina(n), inserta(n) y/o se añade(n) también es/son un péptido de penetración en la célula de la presente invención siempre que el péptido modificado tenga permeabilidad para la membrana celular. En la secuencia de aminoácidos producida
10 mediante sustitución, eliminación, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, se conserva preferentemente una secuencia de aminoácidos de no menos de 3 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos original, y se conserva más preferentemente una secuencia de aminoácidos de no menos de 5 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos original. Además, por ejemplo, en los casos en los que un péptido modificado se produzca por la sustitución de uno o más aminoácidos
15 básicos en la secuencia representada por SEC ID N°: 1 por otro(s) aminoácido(s) básico(s); en casos en los que uno o más aminoácidos hidrófilos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 se sustituyan por otros aminoácidos hidrófilos; y en casos en los que uno o más aminoácidos hidrófilos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 se sustituyan por otros aminoácidos hidrófobos, la modificación es la más aceptable dado que la sustitución por un aminoácido que tiene las mismas propiedades probablemente no cambiará las
20 propiedades totales del péptido. Los ejemplos preferentes del péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 excepto porque de 1 a 3 aminoácidos, que no están limitados a aminoácidos básicos, se sustituyen, eliminan, insertan y/o se añaden, teniendo este péptido permeabilidad para la membrana celular, incluyen péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas por cualquiera de las SEC ID N°: 12 y 15 a 30.

25 Además, los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia inversa de los péptidos anteriormente mencionados también son péptidos de penetración en la célula de la presente invención siempre que estos tengan permeabilidad para la membrana celular. En el presente documento, el péptido que tiene la secuencia inversa significa que la secuencia de los aminoácidos constituyentes está invertida y, por ejemplo, cuando la
30 secuencia de los aminoácidos del extremo N-terminal al extremo C-terminal son arginina, glutamina, isoleucina y lisina, el péptido inverso del mismo significa el péptido cuya secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal al extremo C-terminal es lisina, isoleucina, glutamina y arginina. Los ejemplos particulares de los mismos incluyen un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 5 o 14, que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia inversa del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada
35 por SEC ID N°: 1 y que tiene permeabilidad para la membrana celular.

Como aminoácidos constituyentes de los péptidos de penetración en la célula de la presente invención, pueden usarse los aminoácidos que tengan la configuración de cuerpo L, que son aminoácidos de origen natural, así como aminoácidos que no son de origen natural tales como los derivados producidos mediante modificación parcial de las
40 estructuras de los aminoácidos de origen natural. Por ejemplo, dado que los aminoácidos que tienen la configuración de cuerpo D probablemente no se degradarán por proteasas y, por lo tanto, pueden usarse de un modo eficaz, una parte de la secuencia de aminoácidos del péptido puede tener la configuración de cuerpo D.

Los aminoácidos que constituyen los péptidos de penetración en la célula de la presente invención no se restringen
45 siempre que sean moléculas que tengan un grupo carboxilo y un grupo amino sin importar si estos existen en la naturaleza, y también pueden ser aminoácidos modificados mediante modificaciones post-traduccionales normalmente observadas en el organismo vivo, tales como hidroxilación, fosforilación o glucosilación. La secuencia de aminoácidos está compuesta preferentemente de aminoácidos de origen natural que existen normalmente en células de mamíferos y/o isómeros ópticos de los mismos, y algunos ejemplos de la secuencia de aminoácidos
50 incluyen las que están compuestas de arginina (Arg), lisina (Lys), ácido aspártico (Asp), asparagina (Asn), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), histidina (His), prolina (Pro), tirosina (Tyr), triptófano (Trp), serina (Ser), treonina (Thr), glicina (Gly), alanina (Ala), metionina (Met), cisteína (Cys), fenilalanina (Phe), leucina (Leu), valina (Val), isoleucina (Ile) y/o similares.

55 Los péptidos de penetración en la célula de la presente invención pueden modificarse según sea adecuado mediante métodos conocidos para los expertos en la materia, y más en particular, estos pueden ser derivados químicamente modificados por polietilenglicolación (PEGilación), acetilación del extremo N-terminal, amidación del extremo C-terminal y/o similares. Debería tenerse en cuenta que, en los casos en los que se usa un péptido de penetración en la célula de la presente invención para esta última composición farmacéutica mencionada, el péptido
60 preferentemente no se modifica. Además, los péptidos de penetración en la célula de la presente invención pueden ser bien lineales o circulares.

Los péptidos de penetración en la célula de la presente invención pueden usarse en combinación con otros péptidos conocidos de penetración en la célula. Además, los péptidos de penetración en la célula de la presente invención
65 pueden usarse en forma de péptidos de fusión o proteínas de fusión preparadas fusionando los péptidos con otros péptidos o proteínas mediante este último método mencionado, en tanto que se mantenga la permeabilidad para la

membrana celular.

Los péptidos de penetración en la célula de la presente invención pueden producirse mediante métodos convencionales de síntesis química. Los ejemplos del método de producción incluyen los métodos de síntesis peptídica mediante el método comúnmente usado de fase líquida o el método de fase sólida. Los ejemplos de dichos métodos de síntesis peptídica incluyen el método de elongación por etapas, en el que se une cada aminoácido sucesivamente para elongar una cadena, y el método de la condensación de fragmentos, en el que se sintetizan de modo preliminar fragmentos compuestos de varios aminoácidos seguidos del sometimiento de los fragmentos respectivos a la reacción de acoplamiento. La síntesis de los péptidos de penetración en la célula de la presente invención puede llevarse a cabo por cualquiera de estos métodos.

El método de condensación empleado para la síntesis peptídica anterior también puede llevarse a cabo de acuerdo con diversos métodos conocidos. Los ejemplos particulares del mismo incluyen el método de las azidas, método del anhídrido mixto, método DCC, método del éster activo, método de oxidación-reducción, método DPPA (difenilfosforilacida), DCC+ aditivos (por ejemplo, 1-hidroxibenzotriazol, N-hidroxisuccinimida y N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxiimida) y método de Woodward. El disolvente que puede usarse para cada uno de estos métodos puede seleccionarse de manera adecuada entre los comúnmente usados que se conocen bien por usarse para dichos tipos de reacciones de condensación peptídica. Los ejemplos del disolvente incluyen dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), hexametildisforamida, dioxano, tetrahidrofurano (THF) y acetato de etilo, y mezclas de disolventes de los mismos.

En las reacciones de síntesis peptídica anteriormente descritas, los grupos carboxilo de aminoácidos o péptidos que no están implicados en las reacciones pueden protegerse generalmente mediante esterificación para formar un éster de alquilo inferior tal como un éster de metilo, éster de etilo o éster de *tert*-butilo; o un éster de aralquilo tal como un éster bencílico, éster p-metoxibencílico o un éster p-nitrobencílico. Además, los grupos hidroxilo de aminoácidos que tienen grupos funcionales en sus cadenas laterales, por ejemplo, el grupo hidroxilo de Tyr, pueden estar protegidos mediante un grupo acetilo, grupo bencilo, grupo benciloxicarbonilo, grupo *tert*-butilo o similares, pero dicha protección no se requiere necesariamente. Además, el grupo guanidinio de la Arg puede estar protegido con un grupo protector apropiado tal como un grupo nitro, grupo tosilo, grupo 2-metoxibencenosulfonilo, grupo metilen-2-sulfonilo, grupo benciloxicarbonilo, grupo isoborniloxicarbonilo o un grupo adamantiloxicarbonilo. Las reacciones de desprotección para estos grupos protectores de los aminoácidos, de los péptidos y de los péptidos finalmente obtenidos de la presente invención pueden llevarse a cabo también de acuerdo con los métodos convencionales tales como el método de la reducción catalítica y métodos que usan amoníaco líquido/sodio, fluoruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, cloruro de hidrógeno, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico y ácido metanosulfónico.

Como alternativa, los péptidos de penetración en la célula de la presente invención pueden prepararse mediante métodos convencionales usando técnicas de ingeniería genética. Los péptidos de penetración en la célula de la presente invención obtenidos de este modo pueden purificarse siempre que sea adecuado de acuerdo con métodos usados comúnmente en el campo de la química peptídica, tales como aquellos que usan resinas de intercambio iónico, cromatografía de partición, cromatografía en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y el método de distribución contra corriente.

Como alternativa, los péptidos de penetración en la célula de la presente invención pueden usarse en forma de ácidos nucleicos que codifican los péptidos. Los ejemplos particulares de los ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitación, vectores plasmídicos, vectores virales, fagémidos y transposones que contienen ácidos nucleicos recombinantes que codifican proteínas de fusión con los péptidos de la presente invención y que permiten la expresión de estos péptidos. Además, los ácidos nucleicos recombinantes se usan preferentemente para, por ejemplo, la producción industrial de un péptido de penetración en la célula de la presente invención, o una proteína de fusión con un péptido de penetración en la célula de la presente invención; la introducción de un vector de expresión que codifica un péptido de penetración en la célula de la presente invención en células procedentes de un organismo vivo recogidas del cuerpo; y la administración de un péptido de penetración en la célula de la presente invención para hacer que las células del cuerpo expresen el péptido de penetración en la célula de la presente invención o una proteína de fusión con el mismo. En particular, los ácidos nucleicos recombinantes se usan preferentemente para métodos de producción *in vitro* de péptidos de penetración en la célula de la presente invención o proteínas de fusión con péptidos de penetración en la célula de la presente invención.

El ácido nucleico recombinante significa un ADN o ARN que se ha preparado artificialmente. Los ejemplos del ácido nucleico recombinante incluyen aquellos sintetizados mediante la unión de ácidos nucleicos tales como adenina, citosina, guanina, timina y/o uracilo entre sí; aquellos preparados mediante la escisión de una parte del ADN o ARN contenido en un organismo y la modificación de este mediante la eliminación de una parte de sus bases, uniéndolo con otras bases y/o similares; y aquellos preparados mediante la replicación de estos ácidos nucleicos recombinantes.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un péptido de penetración en la célula y una sustancia hidrófila fisiológicamente activa, y un método de administración de una sustancia hidrófoba

fisiológicamente activa al organismo vivo mediante el uso combinado de un péptido de penetración en la célula de la presente invención y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa.

Debido no solamente al hecho de que los péptidos de penetración en la célula de la presente invención en sí mismos tienen permeabilidad para la membrana celular, sino también al hecho de que los péptidos pueden conferir permeabilidad para la membrana celular a las sustancias hidrófilas fisiológicamente activas, la administración *in vivo* de una sustancia hidrófila fisiológicamente activa a través de la membrana celular es posible mezclando un péptido de penetración en la célula de la presente invención en una composición farmacéutica que comprende como componente eficaz la sustancia hidrófila fisiológicamente activa o mediante la administración de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa y un péptido de penetración en la célula de la presente invención en combinación. Más particularmente, dado que un péptido de penetración en la célula de la presente invención puede no solamente pasar preferentemente a través de la membrana de la célula mucosa sino que también concede capacidad de absorción transmucosal (preferentemente capacidad de absorción intestinal o capacidad de absorción intranasal) a una sustancia hidrófila fisiológicamente activa, es posible la administración *in vivo* de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa a través de la mucosa. La absorción transmucosal de una sustancia hidrófila fisiológicamente activa significa que la sustancia hidrófila fisiológicamente activa administrada a la mucosa pasa a la sangre a través de una capa mucosa, y su resultado puede confirmarse mediante el aumento del nivel en la sangre de la sustancia hidrófoba fisiológicamente activa o la expresión de la actividad farmacológica. El nivel en sangre de una sustancia hidrófila fisiológicamente activa puede medirse mediante un método usado normalmente por los expertos en la materia, tal como un inmunoensayo. La actividad farmacológica puede medirse usando como índice, en el caso de una enzima, su actividad enzimática, o, en el caso de una sustancia que actúa sobre un receptor de la célula, una capacidad para cambiar una función de la célula diana o la cantidad de producción de una sustancia marcadora. Por ejemplo, la actividad farmacológica de la insulina puede medirse usando como índice el nivel de glucosa en sangre del animal al que se le administra insulina.

El péptido de penetración en la célula que confiere permeabilidad para la membrana celular, preferentemente capacidad de absorción transmucosal, a una sustancia hidrófoba fisiológicamente activa no está restringido siempre que el péptido sea el péptido de penetración en la célula de la presente invención anteriormente mencionado, y los ejemplos particulares del mismo incluyen un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 y un péptido modificado producido sustituyendo de 1 a 7, preferentemente de 1 a 5, más preferentemente de 1 a 2 aminoácidos básicos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 por otros aminoácidos básicos, cuyo péptido modificado tiene permeabilidad para la membrana celular. En particular, los ejemplos de un péptido de penetración en la célula de la presente invención que conceden una capacidad de absorción intranasal a una sustancia hidrófila fisiológicamente activa y que se usan preferentemente para una composición farmacéutica para la administración intranasal incluyen un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 y un péptido modificado producido sustituyendo 1 o 2 aminoácido(s) básico(s) representados por SEC ID N°: 1, cuyo péptido modificado tiene permeabilidad para la membrana celular. Los ejemplos particulares de un péptido que es un péptido de penetración en la célula de la presente invención y concede una capacidad de absorción intranasal a una sustancia hidrófila fisiológicamente activa; cuyo péptido es un péptido modificado producido sustituyendo 1 o 2 aminoácidos básicos de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1; cuyo péptido tiene permeabilidad para la membrana celular; se muestran en la Tabla 1. En el péptido modificado, la sustitución de uno o más aminoácidos básicos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 por otros aminoácidos básicos es la más aceptable dado que la sustitución por un aminoácido que tiene las mismas propiedades probablemente no cambiará las propiedades generales del péptido.

[Tabla 1]

SEC ID N°: 1	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	K
Secuencia A	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	K
Secuencia B	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	K
Secuencia C	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	R	W	K	N	K	K
Secuencia D	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	K	W	K	N	K	K
Secuencia E	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	R	N	K	K
Secuencia F	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	R	K
Secuencia G	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	R
SEC ID N°: 10	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	R
SEC ID N°: 9	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	R	K
Secuencia H	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	R	N	K	K
Secuencia I	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	K	W	K	N	K	K
Secuencia J	K	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	R	W	K	N	K	K
Secuencia K	K	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	K
Secuencia L	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	K	R
Secuencia M	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	R	K
Secuencia N	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	R	W	R	N	K	K
Secuencia O	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	R	K	W	K	N	K	K
Secuencia P	R	W	F	R	I	Q	M	Q	I	K	R	W	K	N	K	K
Secuencia Q	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	R	W	K	N	K	R

Secuencia R	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	R	W	K	N	R	K
Secuencia S	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	R	W	R	N	K	K
Secuencia T	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	K	K	W	K	N	K	K
Secuencia U	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	K	W	K	N	K	R
Secuencia V	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	K	W	K	N	R	K
Secuencia W	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	K	W	R	N	K	K
Secuencia X	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	R	N	K	R
Secuencia Y	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	R	N	R	K
Secuencia Z	R	W	F	K	I	Q	M	Q	I	R	R	W	K	N	R	R

- Los ejemplos preferentes de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 excepto en que están sustituidos uno o varios aminoácidos básicos, confiriendo el péptido capacidad de absorción transmucosal a una sustancia hidrófila fisiológicamente activa, incluye
- 5 un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10, y, en particular, los ejemplos preferentes de un péptido que le concede capacidad de absorción intranasal a una sustancia hidrófila fisiológicamente activa incluye un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 9 o 10.
- 10 Además, un péptido de penetración en la célula de la presente invención que es un péptido modificado representado por una secuencia que es la misma que la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1 excepto porque de 1 a 3, más preferentemente de 1 a 2, aún más preferentemente 1 aminoácido(s) no limitado(s) a un aminoácido(s) básico(s) se sustituye(n), elimina(n), inserta(n) y/o se añade(n), en el que un péptido modificado permite la absorción transmucosal de una sustancia hidrófila fisiológicamente activa, también puede usarse para una
- 15 composición farmacéutica de la presente invención. En la secuencia de aminoácidos que se ha mutado mediante la sustitución, eliminación y/o inserción, se conserva preferentemente una secuencia de aminoácidos de no menos de 3 aminoácidos contiguos en la secuencia original, y se conserva más preferentemente una secuencia de aminoácidos de no menos de 5 aminoácidos contiguos en la secuencia original. Además, la sustitución por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades, tal como la sustitución de uno o más aminoácidos básicos por otros
- 20 aminoácidos básicos, sustitución de uno o más aminoácidos hidrófilos por otros aminoácidos hidrófilos, y/o la sustitución de uno o más aminoácidos hidrófobos por otros aminoácidos hidrófobos en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 1, es el cambio más aceptable dado que no es probable que las propiedades generales del péptido cambien en este caso.
- 25 Además, un péptido de penetración de la presente invención que permite la absorción transmucosal de una sustancia hidrófila fisiológicamente activa, siendo el péptido de penetración en la células un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia inversa de los péptidos anteriormente mencionados también puede usarse para una composición farmacéutica de la presente invención.
- 30 La sustancia hidrófila fisiológicamente activa significa una sustancia fisiológicamente activa que tiene una propiedad de hidrofiliidad. La hidrofiliidad significa que la solubilidad en agua es alta, y, en la presente memoria descriptiva, una sustancia se define como hidrófila cuando no menos de 1 µg de la sustancia es soluble en 1 ml de agua. La sustancia fisiológicamente activa significa cualquier sustancia que actúe en un organismo vivo para causar un cambio en el organismo vivo, y los ejemplos de la misma incluyen proteínas que se unen a receptores en células
- 35 específicas y enzimas que tienen afinidades para sustancias en un organismo vivo. Además, la sustancia fisiológicamente activa también puede ser una sustancia que no reaccione directamente con una sustancia en un organismo vivo y, por ejemplo, puede también puede ser una sustancia que puede administrarse a un organismo vivo para un fin médico, tal como el dextrano empleado para aumentar la sangre como una alternativa al plasma. La sustancia fisiológicamente activa es preferentemente un péptido, proteína o ácido nucleico, más preferentemente un
- 40 péptido o una proteína, que sea poco permeable a través de una barrera biológica tal como la membrana celular o una capa constituida por células mucosas. Además, las glucoproteínas en las que las cadenas de azúcar se unen a estas proteínas que son sustancias hidrófilas fisiológicamente activas, y los derivados proteicos producidos por modificación química tales como polietilenglicolación (PEGilación) también se usan preferentemente como sustancias hidrófilas fisiológicamente activas.
- 45 El peso molecular de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa no se restringe, pero en casos en los que el peso molecular es demasiado alto, a veces se impide el paso de la sustancia a través de la membrana plasmática, de modo que el peso molecular es preferentemente de no más de 500.000, más preferente no más de 30.000.
- 50 Los ejemplos particularmente preferentes de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa incluyen hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, insulina, angiotensina, glucagón, péptido similar al glucagón (GLP-1), exendina-4, gastrina, hormona del crecimiento, prolactina (hormona luteotrópica), gonadotropina (hormona gonadotropina), hormona citotrópica, hormona adrenocorticotrópica, hormona estimulante de los melanocitos, vasopresina, oxitocina, protirelina, hormona luteinizante (LH), corticotropina, somatropina, tiotropina (hormona estimulante del tiroides), somatostatina (factor estimulante de la hormona de crecimiento), hormona hipotalámica (GnRH), G-CSF, eritropoyetina, HGF, EGF VEGF, angiopoyetina, interferón-α, interferón-β, interferón-γ, interleucinas, superóxido
- 55 dismutasa (SOD), uroquinasa, lisozima y vacunas y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa es más

preferentemente insulina, calcitonina, hormona paratiroidea, hormona del crecimiento, interferón, interleucina, G-CSF, péptido similar al glucagón (GLP-1) o exendina-4.

En un modo preferente de la presente invención, el péptido de penetración en la célula de la invención y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa forman un conjugado. El "conjugado" en el presente documento se refiere a un estado en el que no menos de 2 sustancias pueden moverse al mismo tiempo, y el conjugado también incluye sustancias unidas entre sí mediante enlaces covalentes, sustancias unidas electrostáticamente entre sí mediante enlaces iónicos y sustancias que no se unen entre sí pero que tienen estructuras espaciales mediante las cuales una de estas puede limitar el movimiento de la otra (o las otras), permitiendo que las sustancias se muevan conjuntamente. Por ejemplo, puede decirse que una partícula tal como una micela, liposoma o macromolécula cuya superficie se modifica con un péptido de la presente invención y que encierra un fármaco biológicamente activo en la misma forma un "conjugado". Los ejemplos del conjugado incluyen uno en el que un péptido de la presente invención y una sustancia hidrófila fisiológicamente activa se unen covalentemente entre sí. Los ejemplos de dicho conjugado incluyen una composición farmacéutica en la que un grupo amino o un grupo carboxilo, o el grupo tiol de la cisteína, de una proteína que es una sustancia hidrófila fisiológicamente activa y un péptido de penetración en la célula de la presente invención se unen covalentemente entre sí.

En casos en los que un péptido de penetración en la célula y una proteína que es una sustancia hidrófila fisiológicamente activa constituyen un conjugado, el conjugado puede prepararse como una proteína de fusión. El sitio de adición del péptido de penetración en la célula de la presente invención no se restringe, y preferentemente, el péptido que tiene permeabilidad para la membrana celular se presenta en el lado externo de la proteína y no afecta en gran medida a la actividad y la función de la proteína después de la fusión. El péptido de penetración en la célula se fusiona preferentemente al extremo N-terminal o C-terminal. El tipo de proteína a fusionar no se restringe, pero, dado que se impide que un fármaco pase a través de la membrana celular en casos en los que su peso molecular sea demasiado alto, el peso molecular de la proteína no es preferentemente mayor de 500.000, más preferente no más de 30.000.

La proteína de fusión con un péptido de penetración en la célula puede producirse mediante un método de síntesis química común. Los ejemplos del Método incluyen un método en el que se mezclan un péptido de penetración en la célula de la presente invención y la insulina conjuntamente y se unen entre sí mediante la adición de un agente condensador, y un método que usa un sintetizador peptídico (por ejemplo, Modelo 433 de Applied Biosystems). Además, la proteína de fusión puede producirse basándose en la información de la secuencia de ácidos nucleicos usando una técnica de ingeniería genética de acuerdo con un método convencional. Los ejemplos del método incluyen un método en el que se incorporan una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de penetración en la célula de la presente invención y una proteína a fusionar en un vector de expresión génica que tiene un promotor para la expresión proteica, seguido de la producción de una proteína de fusión.

Además, en otro modo preferente de la presente invención, el péptido de penetración en la célula y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa se usan en un estado en el que estos no se unen covalentemente entre sí. Incluso en casos en los que el péptido de penetración en la célula y la sustancia fisiológicamente activa no forman un conjugado por enlaces covalentes cuando se administra una composición farmacéutica de la presente invención, puede obtenerse un efecto deseado mediante un proceso en el que el péptido de penetración en la célula y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa se mezclan entre sí después de su administración y entonces el péptido y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa forman un conjugado mediante enlaces iónicos, acción hidrófoba y/o acción de carga. Dado que, en dichos casos, no es necesaria la modificación directa de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa, la actividad biológica originalmente retenida por la sustancia hidrófila fisiológicamente activa no está afectada, lo que es preferente.

En la presente invención, la mucosa a través de la cual es posible absorción transmucosal de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa no se limita, y los ejemplos de la misma incluyen la mucosa del ojo, de la cavidad nasal, de la hipoglótis, pulmonar, de la cavidad oral, de la piel, de la vagina y del intestino. La mucosa es preferentemente mucosa de la cavidad nasal o del intestino. Además, el método de administración para la absorción transmucosal de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa mediante la presente invención no se limita, y los ejemplos del método de administración incluyen la administración oral, nasal, rectal y percutánea y la administración mediante inyección. El método de administración es preferentemente administración oral, nasal o rectal.

En la presente invención, la dosis y el número de dosis para la administración de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa y el péptido de penetración en la célula a un organismo vivo puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa, de la forma de dosificación, de la edad del paciente, del peso corporal y de la gravedad de los síntomas y habitualmente, se administran a una dosis de 0,01 a 50 mg, preferentemente de 0,1 a 20 mg por adulto por día en términos del contenido de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa. La relación entre la mezcla del péptido de penetración en la célula y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa no se restringe, y la relación se determina preferentemente dependiendo del tipo de sustancia hidrófila fisiológicamente activa mezclada y el modo de mezclado del péptido de penetración en la célula y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa. Con el fin de conferir una acción suficiente a la sustancia hidrófila fisiológicamente activa, se usa el péptido de penetración en la célula, en cualquier modo de mezclado, en cualquier

cantidad preferentemente no de no menos de 1 vez mayor, más preferentemente no menos de 2 veces mayor que la cantidad molar de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa a la que se le permite actuar. Esto significa que, en casos en los que el péptido de penetración en la célula y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa estén formando un conjugado mediante enlaces covalentes, no menos de un péptido de penetración en la célula está

unido a cada sustancia hidrófila fisiológicamente activa, y, en casos en los que estos se usan independientemente, contiene no menos de 1 mol del péptido de penetración en la célula con respecto a 1 mol de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa usada.

En la presente invención, el modo de administración de la sustancia hidrófila fisiológicamente activa y el péptido de penetración en la célula a un animal (incluyendo un ser humano) no se restringe particularmente. Por ejemplo, estos pueden administrarse siempre que estén en el estado desecado o en la forma de una solución, o pueden rellenarse cápsulas con ellos junto con un vehículo seguido de la administración de la cápsula. Además, aquellos que están en estado seco pueden disolverse o dispersarse en agua en primer lugar y después administrarse.

Los ejemplos de la forma de la composición farmacéutica de la presente invención incluyen formas en polvo compuestas por el péptido de penetración en la célula y la sustancia hidrófila fisiológicamente activa así como adyuvantes farmacéuticamente aceptables; las formas líquidas están compuestas de una mezcla con un medio, tal como agua, y una base farmacéuticamente aceptable distinta del medio, y similares; y las formas sólidas o semisólidas están compuestas de una combinación con una base farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de la base incluyen diversas sustancias orgánicas e inorgánicas que se usan comúnmente como materiales de formulación, tales como vehículos, lubricantes, aglutinantes, disgregantes, disolventes, solubilizantes, agentes suspensores, agentes isotónicos, agentes tamponadores, agentes emolientes y potenciadores de la absorción. Los ejemplos particulares de los mismos incluyen agua, disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímeros de carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilato sódico, alginato sódico, dextrano hidrosoluble, carboximetil almidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerol, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina sérica humana (HSA), manitol sorbitol, lactosa y tensioactivos aceptables como aditivos farmacéuticos.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse preferentemente en combinación no solamente con aditivos sencillos sino también con técnicas de administración avanzadas. Por ejemplo, con el fin de administrar una composición farmacéutica de la presente invención al tracto intestinal mediante administración oral, se prefiere encapsular la composición farmacéutica en una cápsula entérica o en hidroxipropilcelulosa mucoadhesiva o Hidrogel Inteligente de ácido poli(metacrílico) injertado con poli(etilenglicol) P(MAA-g-EG), o similares, con el objetivo de evitar la degradación del péptido y el fármaco por enzimas digestivas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Evaluación de la Permeabilidad de los Péptidos en las Células

<Método>

En medio DMEM complementado con FBS al 10 %, se sembraron 0,2 ml de células HeLa en una placa de 96 pocillos de fondo de vidrio, y se cultivaron las células a 37 °C durante de 48 a 72 horas para permitir que las células se adhirieran a la superficie del fondo. Después de lavar 3 veces con 200 µl de PBS, se añadieron 50 µl de medio DMEM que contenía cada uno de los péptidos de las SEC ID N°: 1 a 6 marcados con fluoresceína en el extremo aminoterminal (síntesis por condensación mediante Sigma-Genosys) a una concentración de 5 µM y FBS a una concentración final del 10 % en cada pocillo. Se incubó la placa en un incubador con CO₂ durante 3 horas y después de lavó 3 veces con medio DMEM complementado con FBS al 10 %, seguido por la adición de 50 µl de una solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM NaCl 100 mM, SDS al 1 %, 100 µg/ ml de proteinasa K) y 1 hora de incubación a temperatura ambiente, para descomponer las células y los péptidos incorporados en las células. Se recuperó la solución de lisis completa, y se midió la cantidad de fluoresceína incorporada en las células usando un aparato de medición de la intensidad de fluorescencia (HORIBA FLUOROMAX-3) a una longitud de onda de excitación de 494 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 512 nm.

<Resultados>

La cantidad de fluoresceína incorporada en las células con respecto a la cantidad de fluoresceína añadida a cada pocillo se muestra en la Fig. 1. Para cada valor, se muestran el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 3 veces. Al contrario que con el péptido aleatorio de SEC ID N°: 6, que se incorporó con dificultad en las células y por lo tanto no es un péptido de penetración en la célula, los péptidos marcados con fluoresceína de las SEC ID N°: 1 a 5, que son péptidos de la presente invención, se incorporaron en las células con eficacias no menos de 10 veces más altas que el péptido aleatorio de SEC ID N°: 6.

Ejemplo 2: Evaluación de la Proporción de Insulina Transferida en las Células

<Método>

En medio DMEM complementado con FBS al 10 %, se sembraron 0,2 ml de células HeLa en una placa de 96 pocillos de fondo de vidrio, y se cultivaron las células a 37 °C durante de 48 a 72 horas para permitir que las células se adhirieran a la superficie del fondo. Después de lavar 3 veces con 200 µl de PBS, se añadieron 50 µl de medio DMEM que contenía cada uno de los péptidos de SEC ID N°: 1 a 6 marcados con fluoresceína en el extremo amino terminal (síntesis efectuada por encargo por Sigma-Genosys) a una concentración final de 5 µM, insulina humana marcada con rodamina a una concentración de 100 µg/ml y FBS al 10 % a cada pocillo. Se incubó la placa en un incubador con CO₂ durante 3 horas y después de lavó 3 veces con medio DMEM complementado con FBS al 10 %, seguido por la adición de 50 µl de una solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM NaCl 100 mM, SDS al 1 %, 100 µg/ ml de proteinasa K) y 1 hora de incubación a temperatura ambiente, para descomponer las células y la insulina marcada con rodamina incorporada en las células. Se recuperó la solución de lisis completa, y se midió la cantidad de insulina marcada con rodamina incorporada en las células usando un aparato de medición de la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 555 nm y una longitud de onda de fluorescencia 580 nm.

Además, del mismo modo, se añadió una solución que contenía insulina humana marcada con rodamina y cada uno de los péptidos de las SEC ID N°: 1 a 6 a células HeLa y se incubó el resultado, seguido de lavados 3 veces con 300 µl de medio DMEM complementado con FBS al 10 %, 3 horas de fijación con una solución de paraformaldehído al 4 % y lavados 3 veces con 300 µl de PBS. A continuación, se incubaron las células en solución de aceite DiD al 5 % (Molecular probes, Inc.) durante toda la noche, y se observó la localización de la insulina marcada con rodamina usando un microscopio confocal de láser (FV-1000, Olympus Corporation).

La insulina marcada con rodamina se preparó mediante el siguiente método. Se disolvieron 20 mg de insulina humana en 0,5 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y después se añadieron 3 ml de PBS y 0,5 ml de hidróxido de sodio 0,1 N a los mismos para neutralizar la solución. La solución resultante se sometió a intercambio de soluciones usando una columna desalinizadora (columna PD-10), para obtener 5 ml de una solución de NaHCO₃ 50 mM (concentración de insulina, 4 mg/ ml). A la solución resultante se le añadieron 4 mg de NHS-rodamina (Pierce) disueltos en 0,5 ml de DMSO, y se permitió que la reacción alcanzara la temperatura ambiente durante toda la noche. A la solución de reacción se le añadieron 0,5 ml de Tris-HCl 1 M (pH 8), y se permitió que la mezcla resultante reaccionara adicionalmente a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de una desalinización contra agua usando una columna PD-10 y añadiendo agua hasta obtener una solución en un volumen final de 10 ml (2 mg/ml en términos de la concentración de insulina).

<Resultados>

La cantidad de insulina marcada con rodamina incorporada en las células con respecto a la cantidad de insulina marcada con rodamina añadida a cada pocillo se muestra en la Fig. 2. Cada valor se representa como el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 3 veces. Aunque la adición de la insulina marcada con rodamina sola y la adición de la insulina marcada con rodamina junto con el péptido que tiene la secuencia aleatoria mostrada en SEC ID N°: 6 con respecto a las células dio como resultado una incorporación prácticamente nula de la rodamina marcada con insulina en las células, la adición de la insulina marcada con rodamina junto con los péptidos de las SEC ID N°: de 1 a 5, que son péptidos de la presente invención, dio como resultado la incorporación de insulina marcada con rodamina en las células que tenían eficacias no menos de 50 veces más altas que el péptido aleatorio de SEC ID N°: 6.

Los resultados de la observación usando un microscopio confocal de láser después de la adición de cada uno de los péptidos de las SEC ID N°: 1 a 6 junto con la insulina marcada con rodamina se muestran en la Fig. 12. Al contrario que con el péptido aleatorio de SEC ID N°: 6, que no es un péptido de penetración en la célula y no permitió la permeación de la insulina marcada con rodamina en las células, se confirmó que los péptidos de penetración en la célula de las SEC ID N°: 1 a 5 de la presente invención habían permitido la permeación de la insulina marcada con rodamina en las células.

Ejemplo 3: Evaluación de la Promoción de Transferencia de Perlas de Poliestireno en las Células

<Método>

En medio DMEM complementado con FBS al 10 %, se sembraron 0,2 ml de células HeLa en una placa de 96 pocillos de fondo de vidrio, y se cultivaron las células a 37 °C durante de 48 a 72 horas para permitir que las células se adhirieran a la superficie del fondo. Después de lavar 3 veces con 200 µl de PBS, se añadieron 50 µl de medio DMEM que contenía cada uno de los péptidos de SEC ID N°: 1 a 6 marcados con fluoresceína en el extremo amino terminal (síntesis efectuada por encargo por Sigma-Genosys) a una concentración final de 1 µM, se añadieron perlas fluorescentes de poliestireno (Perlas microscópicas en Microesferas Fluorescentes Carboxiladas, 0,1 µm; fabricadas por Molecular probes, Inc.) a una concentración final de 1 µg/pocillo y FBS al 10 % a cada pocillo. Se incubó la placa en un incubador con CO₂ durante 3 horas y después de lavó 3 veces con medio DMEM complementado con FBS al 10 %, seguido por la adición de 50 µl de una solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM NaCl 100 mM, SDS al

1 %, 100 µg/ ml de proteinasa K) y 1 hora de incubación a temperatura ambiente, para descomponer las células. Se recuperó la solución de lisis completa, y se midió la cantidad de perlas fluorescentes de poliestireno incorporadas en las células usando un aparato de medición de la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 580 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 605 nm.

<Resultados>

La cantidad de perlas fluorescentes de poliestireno incorporadas en las células con respecto a la cantidad de perlas fluorescentes de poliestireno añadidas a cada pocillo se muestra en la Fig. 3. Para cada valor, se muestran el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 3 veces. Aunque la adición de las perlas fluorescentes de poliestireno solamente y la adición de las perlas junto con el péptido aleatorio de SEC ID N°: 6, que no es un péptido de penetración en la célula, a las células dio como resultado una incorporación prácticamente nula de las perlas en las células, la adición de las perlas junto con los péptidos de las SEC ID N°: 1 a 5, que son péptidos de la presente invención, dio como resultado la recuperación de no menos del 0,7 % de las perlas de poliestireno añadidas.

Ejemplo 4: Administración Intranasal de Insulina

<Método>

Se colocó una cantidad específica de insulina en polvo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf) y se disolvió en HCl 0,1 N, seguido de la adición de la misma cantidad de NaOH 0,1 N para preparar una solución de insulina. Se prepararon una solución de insulina solamente y 40 µl de una solución mixta para cada experimento de administración, en el que solución mixta se preparó disolviendo el péptido de SEC ID N°: 1 cuya secuencia de aminoácidos total está constituida por aminoácidos que tienen la configuración de cuerpo L (síntesis efectuada por encargo por Sigma-Genosys) en PBS y combinando la solución resultante con la solución de insulina anteriormente mencionada de modo que la solución mixta contuviera insulina (1 UI/kg) y cada péptido a una concentración de 0,5 mM. A una rata SD macho que tenía un peso corporal de aproximadamente 200 g que se había sometido a ayuno durante 24 horas, se le inyectaron por vía intraperitoneal 50 mg/kg de pentobarbital para la anestesia, seguida de una incisión en el cuello para exponer la tráquea. Se insertó un tubo de polietileno (INTRAMEDIC PE205, Clay Adams) en la tráquea, y se escindió una parte del esófago, seguido de la inserción de un tubo que tenía el mismo diámetro cuidadosamente a partir de la porción de la incisión del esófago en una coana de modo que no se dañaron los tejidos. La punta del tubo a insertar en la coana se selló de modo preliminar con algodón absorbente y un adhesivo. Para impedir fugas de la solución de fármaco, el canal nasopalatino de la apertura de la región maxilar a la cavidad oral se cerró con un adhesivo sintético ("Aron alfa A" fabricado por Daiichi-Sankyo Company, Limited). Antes de la administración, y 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos después de la administración de la mezcla preparada de insulina y el péptido o de insulina solamente, se recogieron 0,25 ml de sangre de la vena cervical y se sometieron a la medición del nivel de glucosa en sangre usando un aparato para la medición del nivel de glucosa en sangre "Novo Assist Plus" (Novo Nordisk Pharma Ltd.). La sangre restante se sometió a centrifugación para separar el plasma sanguíneo y se midió el nivel de insulina en plasma usando un kit de EIA (Revis). Se calculó la biodisponibilidad por comparación con el caso de la administración subcutánea de insulina.

<Resultados>

El cambio en el nivel de la glucosa en sangre con el mismo tiempo después de la administración se muestra en la Fig. 4, y el cambio en el nivel de la insulina en sangre con el mismo tiempo después de la administración se muestra en la Fig. 5. Para cada valor, se muestran el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 3 o 6 veces. En ratas a las que solamente se les administró insulina por vía intranasal, el aumento en el nivel de insulina en sangre se pudo confirmar con dificultad, pero en ratas a las que se les administró insulina junto con el péptido de SEC ID N°: 1, se observó transferencia de insulina en sangre inmediatamente después de la administración. Además, se observó la disminución del nivel de glucosa en sangre, que es una actividad farmacológica debida a la transferencia de insulina en la sangre, cuya disminución en el nivel de glucosa en sangre correspondía al nivel de insulina en sangre.

Ejemplo 5: Administración Intranasal de Insulina 2

<Método>

Se preparó la insulina mediante el mismo método que en el Ejemplo 4, y se prepararon una solución de insulina solamente y 40 µl de una solución mixta para cada experimento de administración, en la que la solución mixta se preparó disolviendo el péptido de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 7 (oligoarginina) o SEC ID N°: 8 (penetratina) cuya secuencia de aminoácidos total está constituida por aminoácidos que tienen la configuración de cuerpo L (síntesis efectuada por encargo por Sigma-Genosys) en PBS y combinando la solución resultante con la solución de insulina anteriormente mencionada de modo que la solución mixta contuviera insulina (1 UI/kg) y cada péptido a una concentración de 0,5 mM. Se administró cada solución mixta a ratas por el mismo método tal como se describe en el

Ejemplo 4, y se llevaron a cabo la recogida de sangre y la medición con respecto al tiempo, midiendo de este modo el nivel de insulina en sangre, seguido del cálculo de la biodisponibilidad por comparación con el caso de la administración subcutánea de insulina.

5 <Resultados>

El nivel promedio y la desviación típica de la biodisponibilidad calculada por la evaluación en 3 veces mediante la administración de insulina solamente o la solución mixta de insulina y cada uno de los péptidos de las SEC ID N^o: 1, 7 y 8 se muestran en la Fig. 6. El péptido de penetración en la célula de la presente invención que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N^o: 1 mostró una biodisponibilidad mayor que aquella de los péptidos de penetración en la célula conocidos representados por las SEC ID N^o: 7 y 8.

Ejemplo 6: Administración Intranasal de Interferón β

15 <Método>

Con enfriamiento en hielo, se añadió 1 ml de PBS complementado con Tween 20 al interferón β humano de tipo silvestre ("Feron" fabricado por Toray Industries, Inc.) para alcanzar una concentración de 6.000.000 UI/ml, y se prepararon alícuotas de 100 μ l de esta solución, seguido de la adición de 566 μ l de PBS complementado con Tween 20 a la alícuota para preparar una solución de 900.000 UI/ml. Se prepararon una solución de interferón β solamente y 40 μ l de una solución mixta para cada experimento de administración, en el que solución mixta se preparó disolviendo el péptido de SEC ID N^o: 1 o 4 cuya secuencia de aminoácidos total está constituida por aminoácidos que tienen la configuración de cuerpo L (síntesis efectuada por encargo por Sigma-Genosys) en PBS y combinando la solución resultante con la solución de interferón β anteriormente mencionada tal que la solución mixta contuviera interferón β (0,18310⁶ UI/kg) y cada péptido a una concentración de 0,5 mM. La evaluación se llevó a cabo por el mismo método tal como se describe en el Ejemplo 4. Se midió el nivel de interferón β en plasma mediante el "kit de ELISA para interferón β humano" (Kamakura Techno-Science Inc.).

30 <Resultados>

El cambio en el nivel de interferón β en plasma después de la administración se muestra en la Fig. 7. Para cada valor, se muestran el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 3 veces. Aunque las ratas a las que se les administró interferón β solamente por vía intranasal únicamente mostraron un pequeño aumento en el nivel de interferón β en sangre, las ratas a las que se les administró interferón β junto con el péptido de SEC ID N^o: 1 o SEC ID N^o: 4 mostraron transferencia de interferón β en la sangre inmediatamente después de la administración.

Ejemplo 7: Administración Intranasal de Exendina-4

40 <Método>

Se prepararon una solución de exendina-4 (síntesis de la construcción por Sigma-Genosys) solamente, y 40 μ l de una solución mixta para cada experimento de administración, en la que solución mixta se preparó disolviendo el péptido de SEC ID N^o: 1 o SEC ID N^o: 4 cuya secuencia de aminoácidos total está constituida por aminoácidos que tienen la configuración de cuerpo L (síntesis efectuada por encargo por Sigma-Genosys) en PBS y combinando la solución resultante con la solución de exendina-4 anteriormente mencionada de modo que la solución mixta contuviera exendina-4 (0,25 mg/kg) y cada péptido a una concentración de 0,5 mM. La evaluación se llevó a cabo por el mismo método tal como se describe en el Ejemplo 4. El nivel de exendina-4 en plasma se midió mediante el método de ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) de tipo sándwich usando un anticuerpo monoclonal anti-exendina-4 como fase sólida, y un anticuerpo policlonal anti-exendina-4 marcado con biotina y estreptavidina-HRP para la detección.

50 <Resultados>

El cambio en el nivel de exendina-4 en sangre después de la administración se muestra en la Fig. 8. Para cada valor, se muestran el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 3 veces. Aunque las ratas a las que se les administró exendina-4 solamente por vía intranasal prácticamente no mostraron ningún aumento en el nivel de exendina-4 en sangre, las ratas a las que se les administró exendina-4 junto con el péptido de SEC ID N^o: 1 o SEC ID N^o: 4 mostraron transferencia de exendina-4 en la sangre inmediatamente después de la administración.

60 Ejemplo 8: Administración Intestinal de Insulina

<Método>

Se preparó una solución de insulina por el mismo método que en el Ejemplo 4. Se prepararon una solución de insulina solamente y 500 μ l de una solución mixta para cada experimento de administración, en la que la solución mixta se preparó disolviendo el péptido de SEC ID N^o: 1 cuya secuencia de aminoácidos total se constituye por

aminoácidos que tienen la configuración de cuerpo L (síntesis efectuada por encargo por Sigma-Genosys) en PBS y combinando la solución resultante con la solución de insulina anteriormente mencionada de modo que la solución mixta contuviera insulina (50 UI/kg) y cada péptido a una concentración de 0,5 mM. A una rata SD macho que tenía un peso corporal de aproximadamente 200 g que se había sometido a ayuno durante 24 horas, se le inyectaron por vía intraperitoneal 50 mg/kg de pentobarbital para la anestesia, seguido de la apertura del abdomen en la línea media para exponer el tracto intestinal. Se insertó un tubo de silicona en una posición a una distancia de 2 a 3 cm de la unión ileocecal hacia el íleo, y se insertó una aguja de alimentación en una posición aproximadamente 10 cm por encima del mismo. Además, se pasaron las suturas a través de un área de 6 cm entre estos. A partir de la aguja de alimentación, se alimentó con 20 ml de suero salino tamponado con fosfato (PBS) a pH 7,4 precalentado a 37 °C a una velocidad de flujo de 5 ml/min para permitir la descarga del contenido, y se tapó el tubo de silicona, seguido de la administración de 1 ml de PBS precalentado a 37 °C a partir de la aguja de alimentación y manteniéndolo retenido durante 20 minutos. Después de la administración, la aguja de alimentación se tapó rápidamente y el tracto intestinal se devolvió a la cavidad abdominal, seguido del cierre del sitio de la incisión con una grapa y permitiendo a la rata permanecer en reposo. Después de la retención, se retiraron los tapones de la aguja de alimentación y el tubo de silicona, y se alimentó con 20 ml de PBS precalentado a 37 °C en el bucle a una velocidad de flujo de 5 ml/min para permitir la descarga de los contenidos, seguido de la ligación del área de 6 cm a través de la cual ha pasado la sutura de modo preliminar, para formar un bucle. A este bucle se le administraron 0,5 ml de la solución de insulina solamente o la mezcla de insulina y el péptido de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 4 y se devolvió el tracto intestinal a la cavidad abdominal, seguido del cierre del sitio de la incisión con una grapa y permitiendo a la rata permanecer en reposo. Durante el experimento, se fijó a la rata sobre su espalda sobre una placa caliente mantenida a 37 °C mediante una bomba que ponía en circulación agua caliente para regular la temperatura corporal. Antes de la administración y 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos después de la administración, se recogieron 0,25 ml de sangre de la vena cervical y se sometieron a la medición del nivel de glucosa en sangre usando un aparato para la medición del nivel de glucosa en sangre "Novo Assist Plus" (Novo Nordisk Pharma Ltd.). La sangre restante se sometió a centrifugación para separar el plasma sanguíneo y se cuantificó el nivel de insulina mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas. También se llevó a cabo la recogida de sangre y la medición para las ratas a las que se les administró la misma cantidad de la solución de insulina solamente por vía subcutánea del mismo modo.

<Resultados>

El cambio en el nivel de la glucosa en sangre con el mismo tiempo después de la administración se muestra en la Fig. 9, y el cambio en el nivel de la insulina en la sangre con el mismo tiempo después de la administración se muestra en la Fig. 10. Para cada valor, se muestran el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 3 o 6 veces. En comparación con el caso de la administración de la insulina solamente como un control, se observaron el aumento evidente en el nivel de insulina en sangre y la disminución evidente del nivel de glucosa en sangre en los casos de administración combinada del péptido de SEC ID N°: 1 o 4 y la insulina (Fig. 9 y Fig. 10).

Ejemplo 9: Evaluación del Daño de la Cavidad Nasal

<Método>

Se preparó la insulina por el mismo método que en el Ejemplo 4, se administraron solo insulina; insulina y péptido aleatorio de SEC ID N°: 1; o una solución de ácido taurodesoxicólico al 5 % (p/v) por vía intranasal. Quince minutos más tarde, se lavó la cavidad nasal con 10 ml de PBS calentado a 37 °C a una velocidad de flujo de 2 ml/min. Se recuperó la solución de lavado y se midió la actividad de LDH filtrada en la solución usando un kit para la medición de la actividad de LDH (Pointe Scientific, Inc.).

<Resultados>

La actividad de LDH de la solución de lavado se muestra en la Fig. 11. Para cada valor, se muestran el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 3 veces. En comparación con el caso de la administración de taurodesoxicolato de sodio al 5 % (p/v), la liberación de LDH a partir de la cavidad nasal fue significativamente más baja en ratones a los que se les administró la solución mixta del péptido de SEC ID N°: 1 e insulina, y la liberación en este último caso fue tan baja como en los casos en los que solamente se había administrado PBS o insulina.

Ejemplo 10: Evaluación de la Proporción de Insulina Transferida en las Células 2

<Método>

La evaluación de la promoción de la transferencia de insulina en células HeLa se llevó a cabo del mismo modo que en el Ejemplo 2 excepto porque se usaron los péptidos de las SEC ID N°: 1, 6 y 9 a 11 cuyos extremos amino terminales no están marcados (síntesis efectuada por encargo por Sigma-Genosys). El tiempo de incubación en un incubador con CO₂ fue 5 horas, y la cantidad de insulina marcada con insulina incorporada en las células se midió usando un aparato de medición de la intensidad de fluorescencia.

<Resultados>

La cantidad de insulina marcada con rodamina incorporada en las células con respecto a la cantidad de insulina marcada con rodamina añadida a cada pocillo se muestra en la Fig. 13. Para cada valor, se muestran el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 3 veces. En los casos en los que se añadió el péptido aleatorio de SEC ID N°: 6 u 11 de los que se ha confirmado que no son un péptido de penetración en la célula, a las células, únicamente, no más del 0,05 % de la insulina marcada con rodamina añadida se incorporó en las células, mientras que en los casos en los que se añadieron el péptido de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 9 o 10 conjuntamente, se incorporó no menos del 0,7 % de la insulina marcada con rodamina añadida en las células.

Ejemplo 11: Administración Intranasal de Insulina 2

<Método>

Se preparó la insulina por el mismo método que en el Ejemplo 4, y se prepararon una solución de insulina solamente y 40 µl de una solución mixta para cada experimento de administración, en la que la solución mixta se preparó disolviendo el péptido de SEC ID N°: 1, 9 o 10 cuya secuencia total de aminoácidos se constituye por aminoácidos que tenían la configuración de Cuerpo L (síntesis efectuada por encargo por Sigma-Genosys) en PBS y combinando la solución resultante con la solución de insulina anteriormente mencionada de modo que la solución mixta contuviera insulina (1 UI/kg) y cada péptido a una concentración de 0,5 mM. Se administró cada solución mixta a ratas por el mismo método tal como se describe en el Ejemplo 4, y se llevaron a cabo la recogida de sangre y la medición con respecto al tiempo, midiendo de este modo el nivel de insulina en sangre, seguido del cálculo del ABC (área bajo la curva de concentración en sangre-tiempo) basándose en el cambio del nivel en sangre (µU/ ml) con respecto al tiempo (minutos).

<Resultados>

El valor promedio y el error típico del ABC se calculó por la evaluación en 3 o 6 veces en la que la insulina solamente; o la mezcla del péptido de SEC ID N°: 1 o la SEC ID N°: 9 o 10 y la insulina; que se administraron se muestran en la Fig. 14. En los casos en los que se administró el péptido de penetración en la célula de SEC ID N°: 1, 9 o 10 junto con la insulina, se observó una absorción intranasal significativamente más alta en comparación con el caso en el que se administró insulina solamente.

Ejemplo 12: Evaluación de la Proporción de Insulina Transferida en las Células 3

<Método>

La evaluación de la promoción de la transferencia de insulina en células HeLa se llevó a cabo del mismo modo que en el Ejemplo 2 usando los péptidos de SEC ID N°: 6 y 12 a 30 cuyos extremos amino terminales están marcados con fluoresceína (síntesis efectuada por encargo por Sigma-Genosys). El tiempo de incubación en un incubador con CO₂ fue 5 horas, y la cantidad de insulina marcada con insulina incorporada en las células se midió usando un aparato de medición de la intensidad de fluorescencia. Además, la cantidad de fluoresceína incorporada en las células se midió por el mismo método que en el Ejemplo 1.

<Resultados>

La cantidad de fluoresceína incorporada en las células con respecto a la cantidad de fluoresceína añadida a cada pocillo se muestra en la Fig. 15. Para cada valor, se muestran el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 2 veces. Aunque únicamente aproximadamente el 0,2 % de la fluoresceína añadida se incorporó en las células en el caso del péptido de SEC ID N°: 6 que tiene una secuencia aleatoria, no menos del 0,8 % de la fluoresceína añadida se incorporó en las células en todos los casos de los péptidos de penetración en las células de las SEC ID N°: 12 a 30 de la presente invención.

La cantidad de insulina marcada con rodamina incorporada en las células con respecto a la cantidad de insulina marcada con rodamina añadida a cada pocillo se muestra en la Fig. 16. Para cada valor, se muestran el valor promedio y el error típico obtenido mediante la evaluación en 2 veces. Aunque únicamente aproximadamente el 0,2 % de la insulina marcada con rodamina añadida se incorporó en las células en el caso del péptido aleatorio de SEC ID N°: 6, que no es un péptido de penetración en la célula, mientras que no menos del 1 % se incorporó en las células en todos los casos en los que los péptidos de penetración en la célula de las SEC ID N°: 12 a 30 de la presente invención se añadieron junto con la insulina.

Aplicabilidad industrial

Mediante la presente invención, se hace posible la introducción de una sustancia hidrófila fisiológicamente activa en la célula, lo cual ha sido difícil hasta el momento, y puede esperarse el desarrollo de una nueva tecnología médica. Más en particular, dado que puede obtenerse una formulación que permite la administración transmucosal de una

sustancia hidrófila fisiológicamente activa usando un péptido de penetración en la célula de la presente invención, el dolor y las molestias de los pacientes, que han causado las formulaciones convencionales (por ejemplo, las soluciones inyectables) que comprenden sustancias hidrófilas fisiológicamente activas, pueden mejorar en gran medida y por lo tanto puede realizarse el cuidado médico orientado al paciente en sitios clínicos. Además, los péptidos de penetración en la célula de la presente invención pueden cambiar fundamentalmente el concepto de las formulaciones que comprenden sustancias hidrófilas fisiológicamente activas, conduciendo a la creación de formulaciones que marcan un hito.

TEXTO LIBRE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

10 SEC ID Nº: 1 a 5 Péptidos de penetración en la célula de la presente invención;
 SEC ID Nº: 6 Péptido aleatorio;
 SEC ID Nº: 7 Oligoarginina
 SEC ID Nº: 8 Penetratina;
 SEC ID Nº: 9 a 10 Péptidos de penetración en la célula de la presente invención;
 SEC ID Nº: 11 Péptido aleatorio 2;
 SEC ID Nº: 12 a 30 Péptidos de penetración en la célula de la presente invención.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Péptidos de penetración en la célula

20 <130> 10030

<160> 30

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cpps original

35 <400> 1

Arg Trp Phe Lys Ile Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

<210> 2
 40 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> parcialmente modificada de r a k

<400> 2

Lys Trp Phe Lys Ile Gln Met Gln Ile Lys Lys Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

50 <210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> parcialmente modificada de k a r

<400> 3

5

Arg Trp Phe Arg Ile Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Arg Asn Arg Arg
1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> parcialmente modificada de r a k, de k a r

15

<400> 4

Lys Trp Phe Arg Ile Gln Met Gln Ile Lys Lys Trp Arg Asn Arg Arg

1

5

10

15

20

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> parcialmente modificada inversa

<400> 5

Lys Lys Asn Lys Trp Arg Arg Ile Gln Met Gln Ile Lys Phe Trp Arg
1 5 10 15

30

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido aleatorio

40

<400> 6

Glu Tyr Asp Leu Ser Thr Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys
1 5 10

45

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> oligo-arginina

<400> 7

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

55

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> *Drosophila*

 $\langle 400 \rangle$ 8

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> parcialmente modificada 1
<400> 9

Lys Trp Phe Lys Ile Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Arg Lys
1 5 10 15

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> parcialmente modificada 2

<400> 10

Lys Trp Phe Lys Ile Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Arg
1 5 10 15

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido aleatorio 2

<400> 11

Gly Leu Asp Lys Ser Ser Tyr Arg Ile Asp Thr Phe Ala Ala His Glu
1 5 10 15

Val Ala Gly Cys
20

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cpps original y c

<400> 12

Arg Trp Phe Lys Ile Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

5 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> parcialmente modificada de r a k, de k a r y C

<400> 13

Lys Trp Phe Arg Ile Gln Met Gln Ile Lys Lys Trp Arg Asn Arg Arg
1 5 10 15

Cys

15 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> parcialmente modificada inversa y C

25 <400> 14

Lys Lys Asn Lys Trp Arg Arg Ile Gln Met Gln Ile Lys Phe Trp Arg
1 5 10 15

Cys

30 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> parcialmente modificada de 2A y C

<400> 15

Arg Ala Phe Lys Ile Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

40 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> parcialmente modificada de 3A y C

<400> 16

Arg Trp Ala Lys Ile Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> parcialmente modificada de 5A y C

15

<400> 17

Arg Trp Phe Lys Ala Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

<210> 18

20

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> parcialmente modificada de 6A y C

<400> 18

Arg Trp Phe Lys Ile Ala Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

30

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> parcialmente modificada de 7A y C

<400> 19

40

Arg Trp Phe Lys Ile Gln Ala Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

<210> 20

<211> 17

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> parcialmente modificada de 8A y C

$\langle 400 \rangle$ 20

Arg Trp Phe Lys Ile Gln Met Ala Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

<210> 21

 $\langle 211 \rangle$ 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> parcialmente modificada de 9A y C

<400> 21

Arg Trp Phe Lys Ile Gln Met Gln Ala Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> parcialmente modificada de 12A y C

<400> 22

Arg Trp Phe Lys Ile Gln Met Gln Ile Arg Arg Ala Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> parcialmente modificada de 14A y C

<400> 23

Arg Trp Phe Lys Ile Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Ala Lys Lys
1 5 10 15

Cys

<210> 24

<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> parcialmente modificada de 8Q a P y c

<400> 24

Arg Trp Phe Lys Ile Gln Met Pro Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

10 **Cys**

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> parcialmente modificada de Q a R y C

20 <400> 25

Arg Trp Phe Lys Ile Arg Met Arg Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

25 <210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cabeza parcialmente modificada A y C

<400> 26

Arg Ala Ala Lys Ala Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Lys Lys
1 5 10 15

Cys

35 <210> 27
<211> 17
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cola parcialmente modificada A y C

<400> 27

45 **Arg Trp Phe Lys Ile Gln Ala Gln Ala Arg Arg Ala Lys Asn Lys Lys**
1 5 10 15

Cys

	<210>	28	
	<211>	17	
	<212>	PRT	
5	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	IWFM fijo parcialmente modificada 1 y C	
10	<400>	28	
		Arg Trp Phe Lys Ile Arg Met Lys Ile Arg Gln Trp Gln Asn Lys Lys	
		1 5 10 15	
	Cys		
15	<210>	29	
	<211>	17	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
20	<223>	IWFM fijo parcialmente modificada 2 y C	
	<400>	29	
		Arg Trp Phe Gln Ile Lys Met Arg Ile Gln Arg Trp Lys Asn Lys Lys	
		1 5 10 15	
	Cys		
25	<210>	30	
	<211>	13	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	parcialmente eliminada y C	
	<400>	30	
35		Phe Lys Ile Gln Met Gln Ile Arg Arg Trp Lys Asn Cys	
		1 5 10	

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de penetración en la célula que es uno cualquiera de (A) a (D) a continuación:

- 5 (A) un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1,
(B) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma que la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 excepto en que uno o varios aminoácidos básicos están sustituidos con otros aminoácidos básicos, teniendo este péptido permeabilidad por la membrana celular;
 - 10 (C) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma que la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 excepto en que se sustituyen, eliminan, insertan y/o añaden de 1 a 3 aminoácidos, teniendo este péptido permeabilidad por la membrana celular;
 - (D) un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la secuencia inversa de cualquiera de (A) a (C), teniendo este péptido permeabilidad por la membrana celular.
- 15 2. El péptido de penetración en la célula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido (B) tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2 a 4, 9 a 10 y 13.
3. El péptido de penetración en la célula de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido (C) tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 12 y 15 a 30,
- 20 4. El péptido de penetración en la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho péptido (D) tiene la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 5 o 14,
5. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de penetración en la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y una sustancia hidrófila fisiológicamente activa.
- 25 6. Una composición farmacéutica para administración oral, comprendiendo dicha composición farmacéutica el péptido de penetración en la célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y una sustancia hidrófila fisiológicamente activa.
- 30 7. Una composición farmacéutica para la administración intranasal, comprendiendo dicha composición farmacéutica el péptido de penetración en la célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y una sustancia hidrófila fisiológicamente activa.
- 35 8. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que dicha sustancia hidrófila fisiológicamente activa es un péptido, una proteína o un ácido nucleico.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que dicha sustancia hidrófila fisiológicamente activa se selecciona del grupo que consiste en hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, insulina, angiotensina, glucagón, péptido similar al glucagón (GLP-1), exendina-4, gastrina, hormona del crecimiento, prolactina (hormona luteotrópica), gonadotropina (hormona gonadotrópica), hormona citotrópica, hormona adrenocorticotrópica, hormona estimulante de los melanocitos, vasopresina, oxitocina, protirelina, hormona luteinizante (LH), corticotropina, somatotropina, tirotropina (hormona estimulante del tiroides), somatostatina (factor estimulante de la hormona de crecimiento), hormona hipotalámica (GnRH), G-CSF, eritropoyetina, HGF, EGF VEGF, angiopoyetina, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , interleucinas, superóxido dismutasa (SOD), urocinasa, lisozima y vacunas.
- 40
- 45

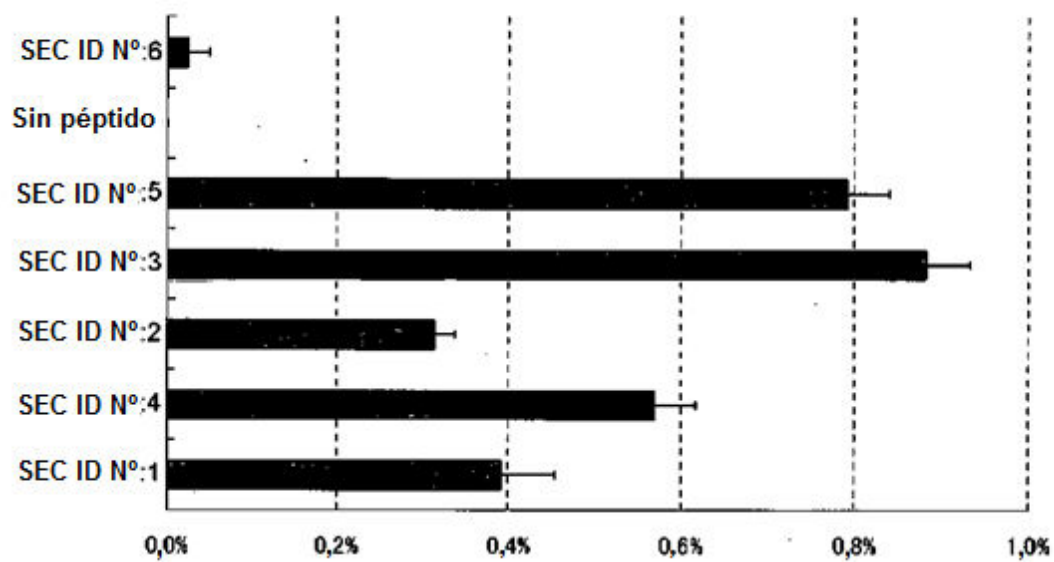


Fig.1

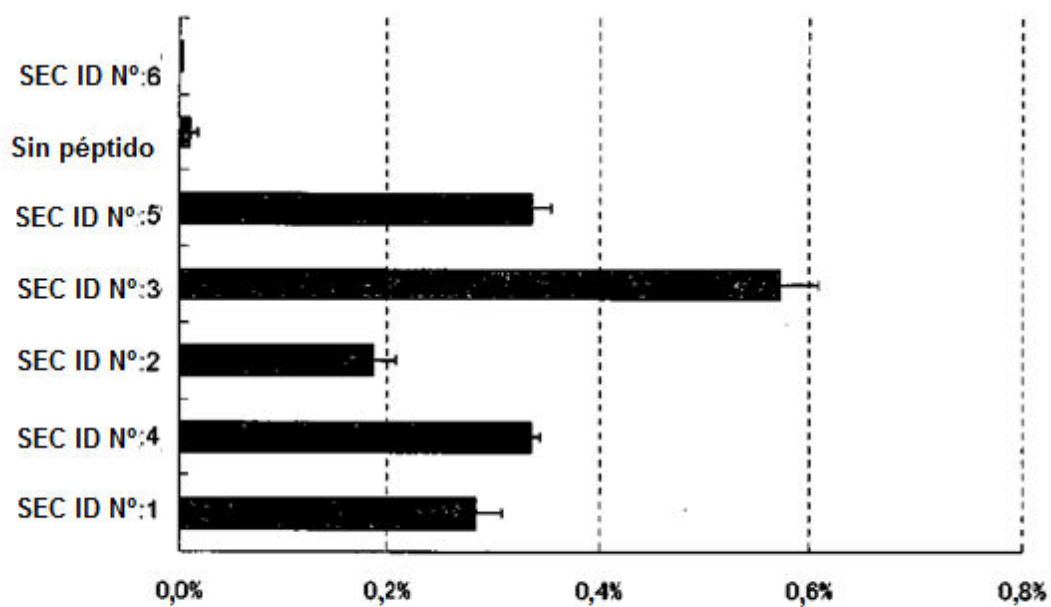


Fig.2

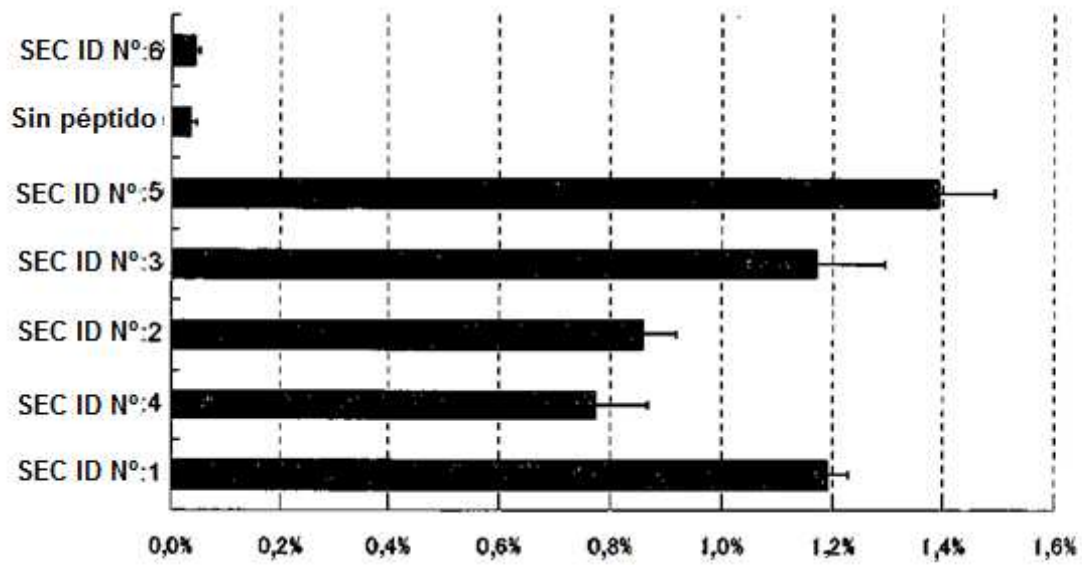


Fig.3

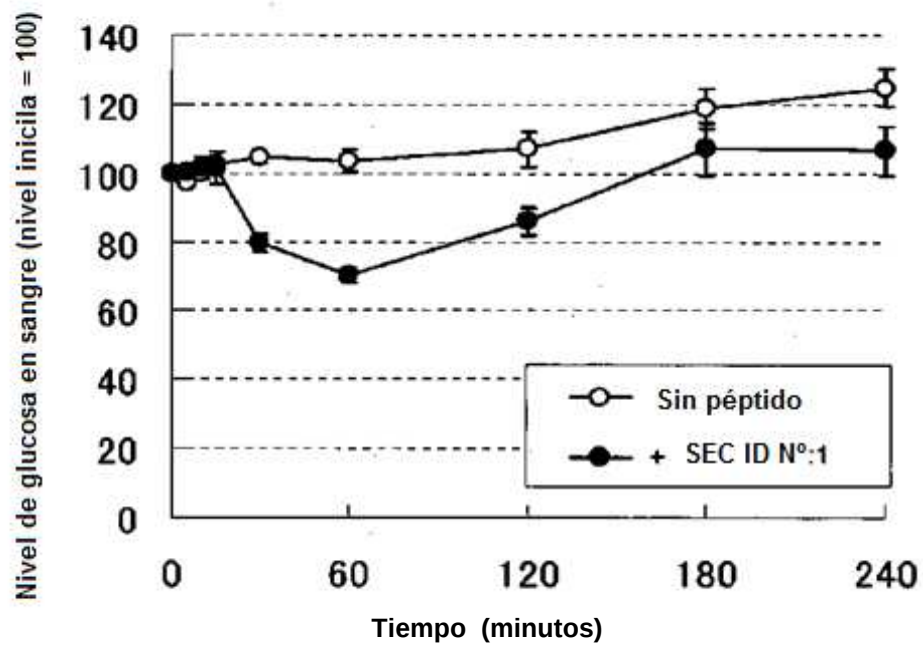


Fig.4

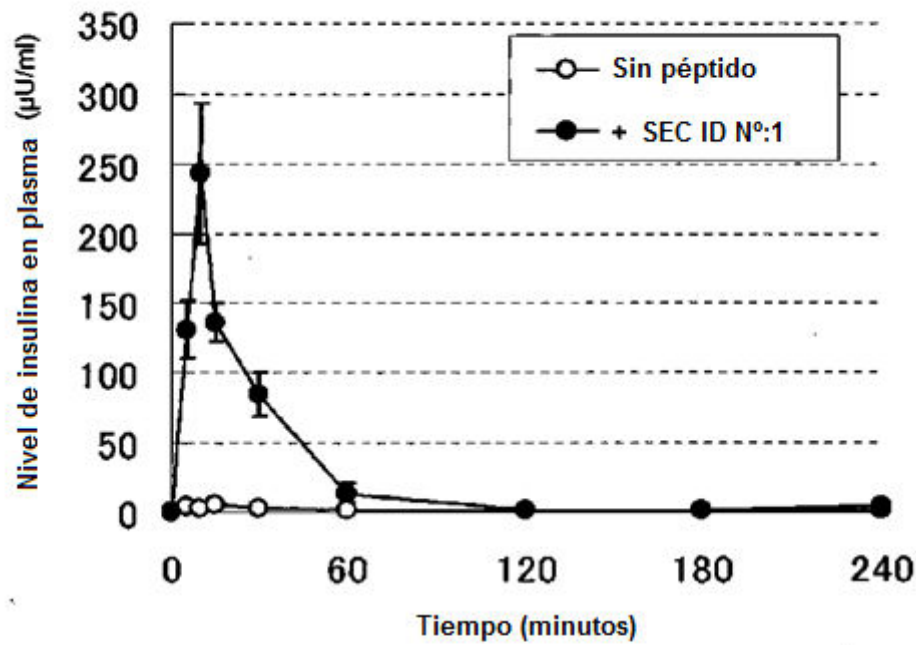


Fig.5

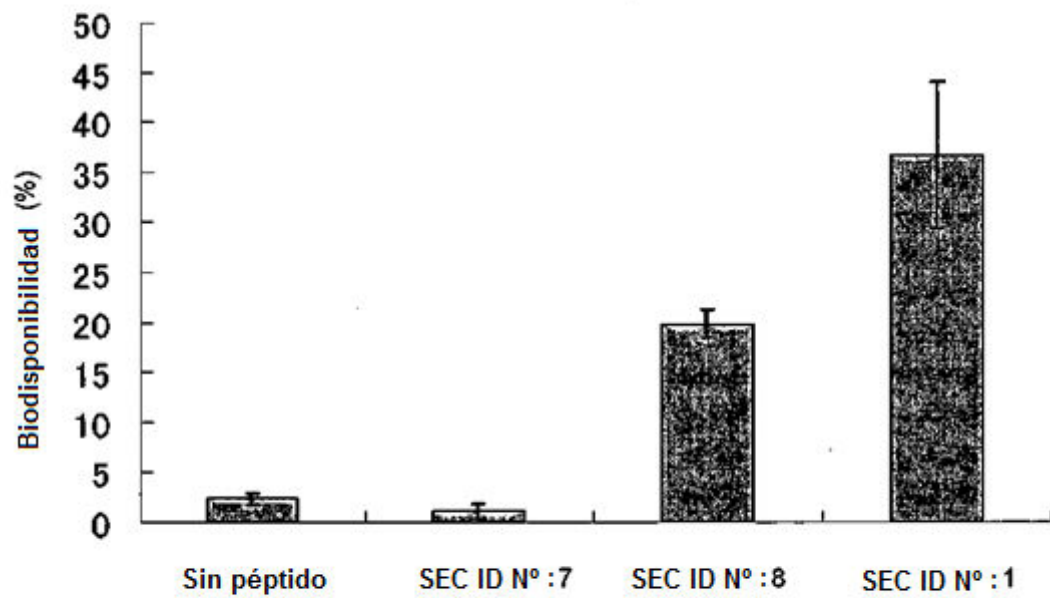


Fig.6

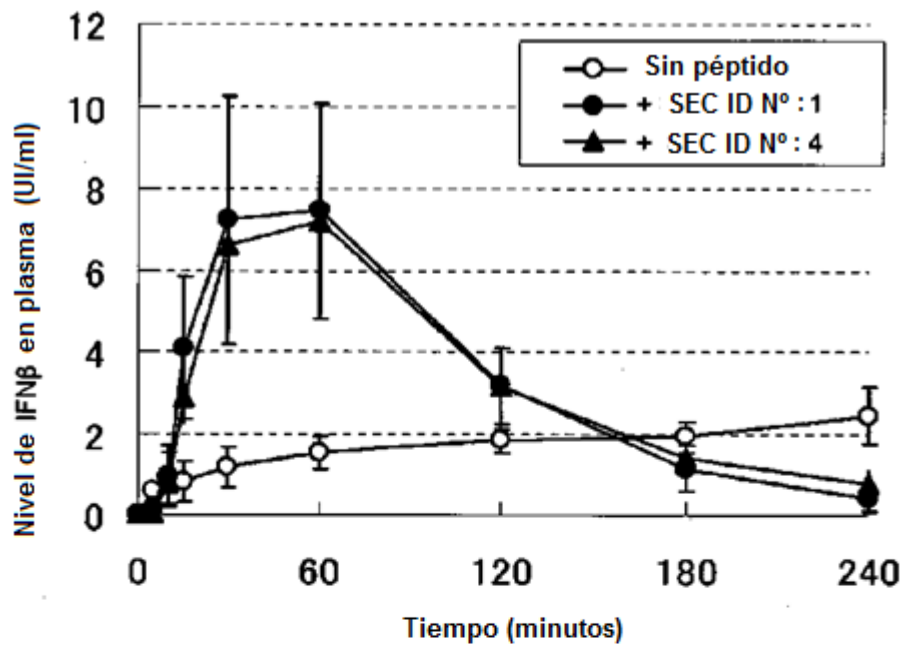


Fig.7

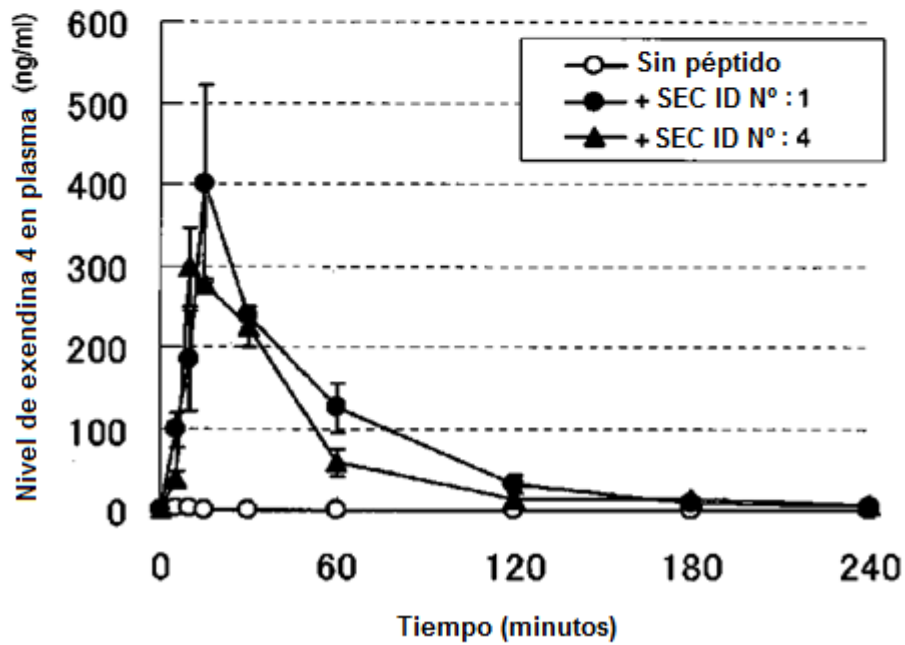


Fig.8

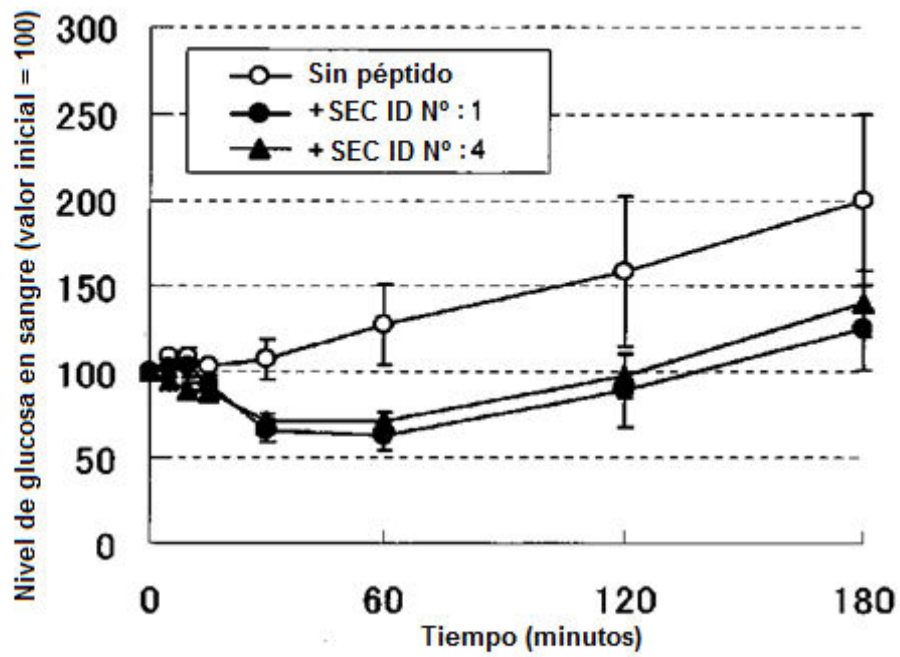


Fig.9

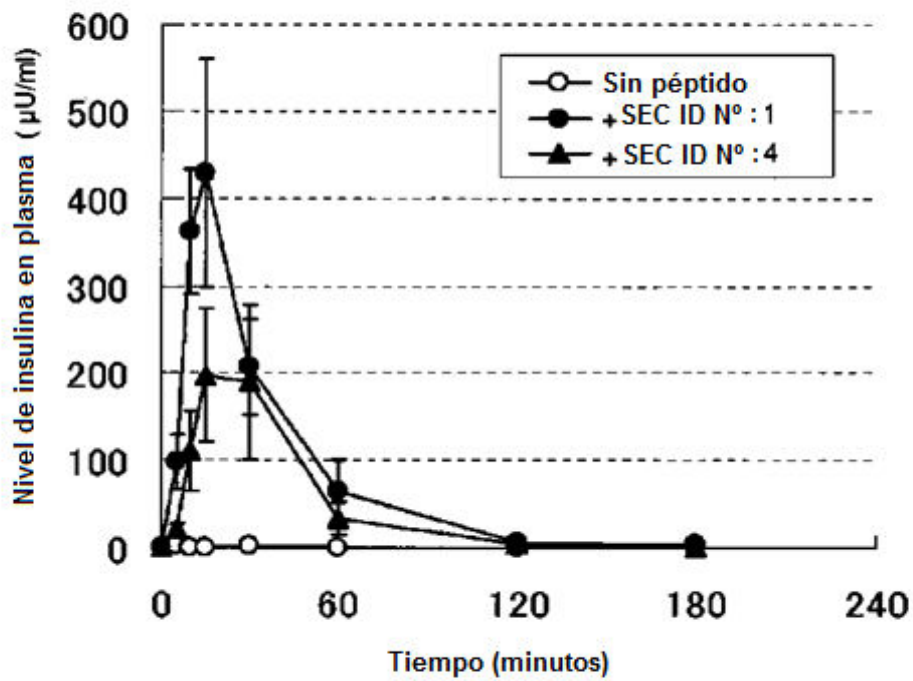


Fig.10

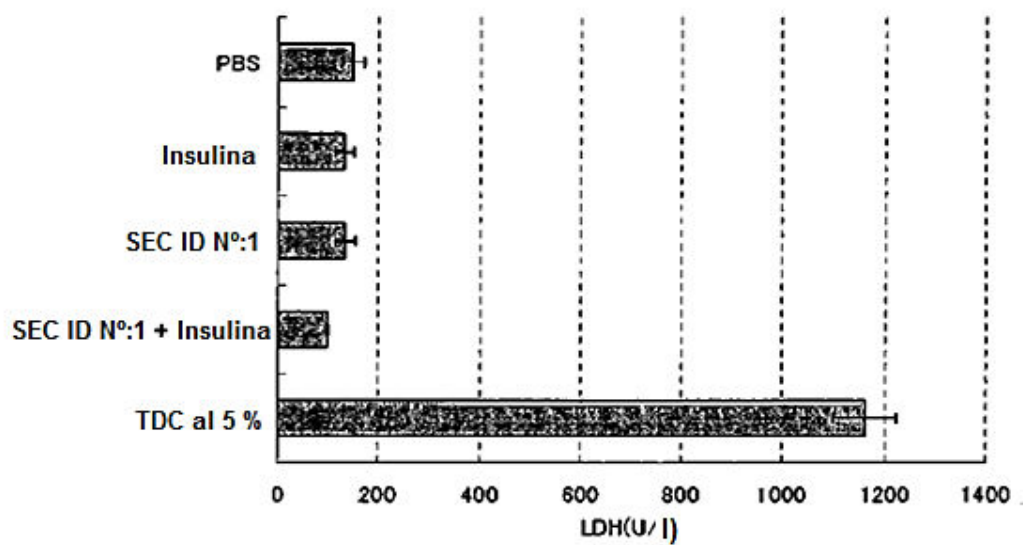


Fig.11

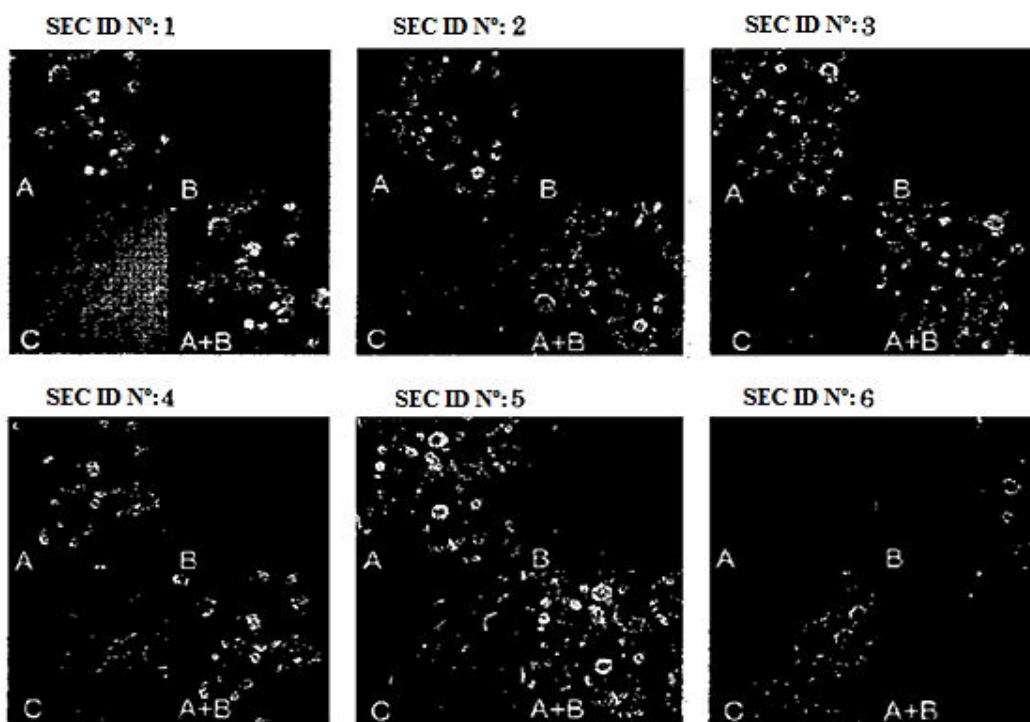


Fig.12

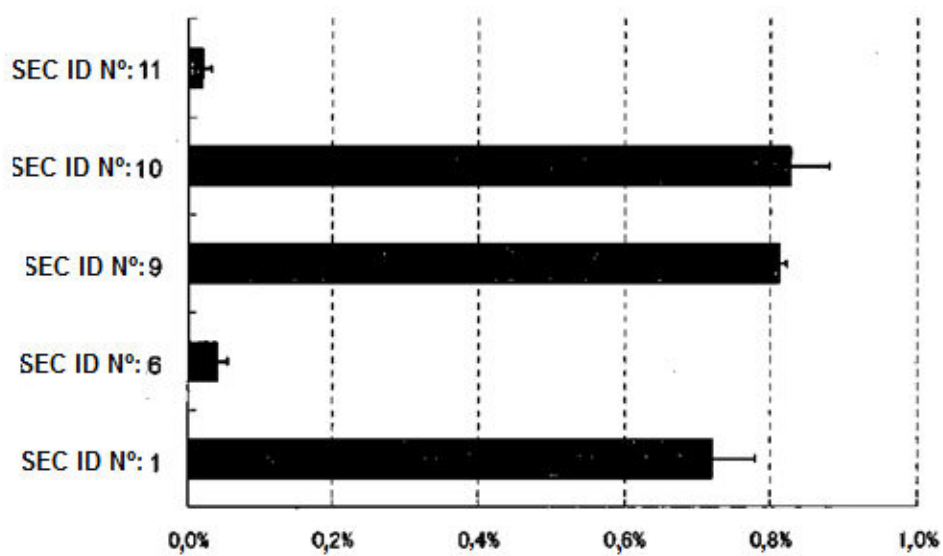


Fig.13

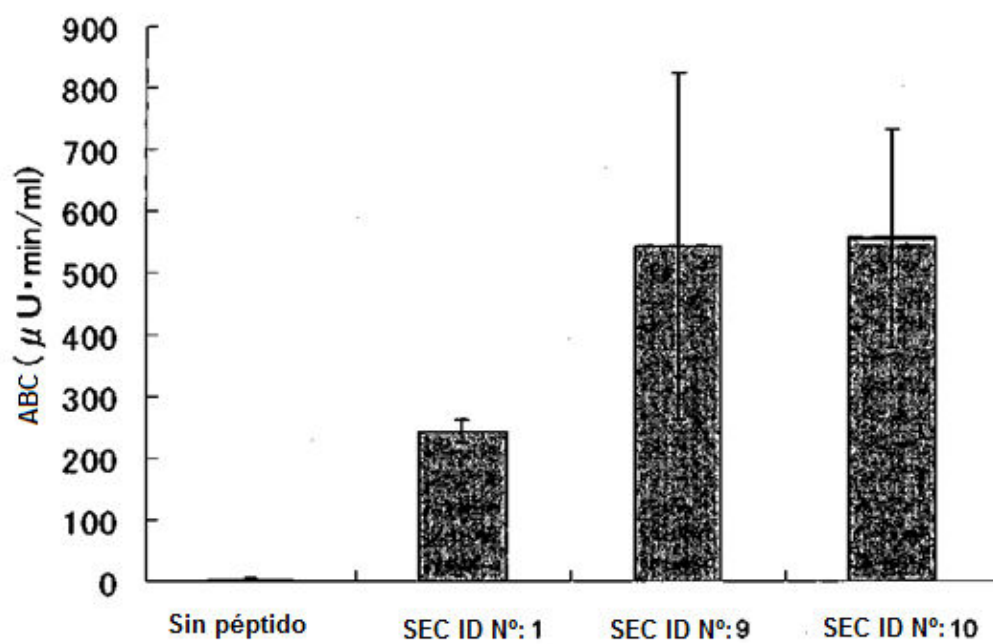


Fig.14

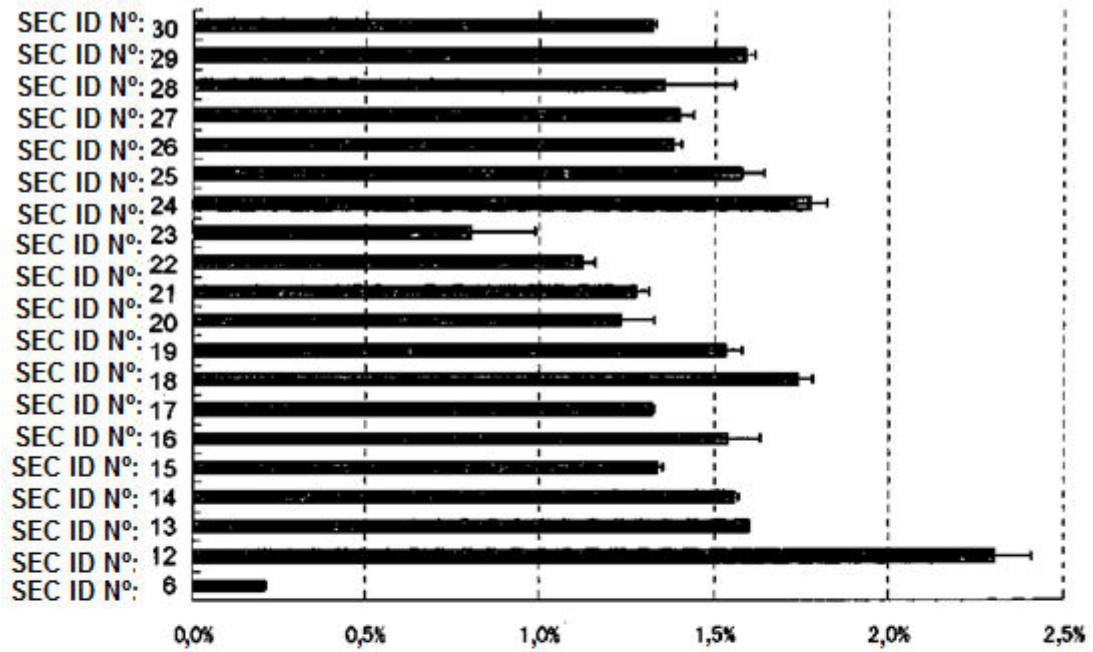


Fig.15

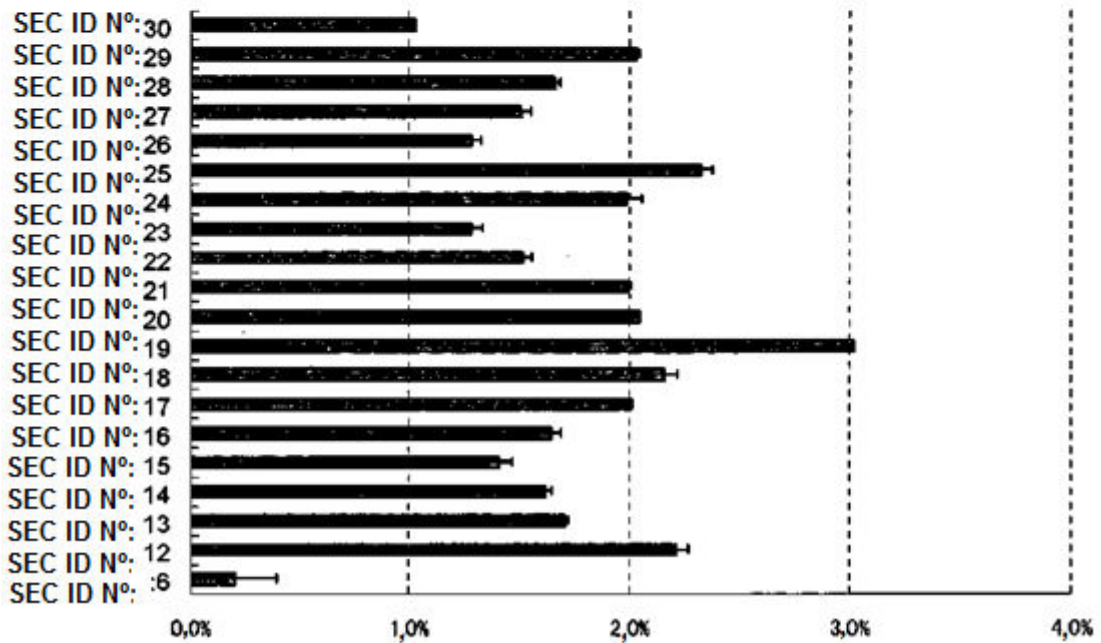


Fig.16