(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5103748号
(P5103748)

(45)発行日　平成24年12月19日(2012.12.19)　(24)登録日　平成24年10月12日(2012.10.12)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 47/42	(2006.01)	A61K 47/42	
A61K 38/28	(2006.01)	A61K 37/26	
A61K 38/22	(2006.01)	A61K 37/24	
A61K 38/21	(2006.01)	A61K 37/66	H
A61P 3/10	(2006.01)	A61P 3/10	

請求項の数 5　(全 12 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-34041(P2006-34041)
(22)出願日　平成18年2月10日(2006.2.10)
(65)公開番号　特開2006-257074(P2006-257074A)
(43)公開日　平成18年9月28日(2006.9.28)
審査請求日　平成21年1月14日(2009.1.14)
(31)優先権主張番号　特願2005-38850(P2005-38850)
(32)優先日　平成17年2月16日(2005.2.16)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000003159
東レ株式会社
東京都中央区日本橋室町２丁目１番１号
(72)発明者　森下　真莉子
東京都品川区荏原２－４－４１　星薬科大学薬剤学教室
(72)発明者　高山　幸三
東京都品川区荏原２－４－４１　星薬科大学薬剤学教室
(72)発明者　井田　伸夫
神奈川県鎌倉市手広１１１１番地　東レ株式会社　基礎研究所先端融合研究所内
(72)発明者　青木　孝夫
神奈川県鎌倉市手広１１１１番地　東レ株式会社　基礎研究所先端融合研究所内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
生理活性タンパク質を、活性を保持した状態で腸管内から血中に移行させる医薬組成物であって、成分として等電点が５．５以下の生理活性タンパク質およびカチオン性ペプチドであるプロタミンあるいはその部分ペプチドあるいはその誘導体（ただし、アルギニンオリゴマーを除く。）を含有し、生理活性タンパク質とカチオン性ペプチドが共有結合で連結されていない腸管吸収性医薬組成物。
【請求項２】
カチオン性ペプチドと生理活性タンパク質の混合比が、モル比（（カチオン性ペプチドのモル数）／（生理活性タンパク質のモル数））として３０００以下である請求項１記載の腸管吸収性医薬組成物。
【請求項３】
生理活性タンパク質の分子量が、３００００以下である請求項１または２に記載の腸管吸収性医薬組成物。
【請求項４】
生理活性タンパク質が、インスリン、成長ホルモン、等電点が５．５以下のインターフェロン類、等電点が５．５以下のインターロイキン類、およびＧ－ＣＳＦから選ばれる請求項１～３のいずれかに記載の腸管吸収性医薬組成物。
【請求項５】
プロタミンあるいはその部分ペプチドあるいはその誘導体（ただし、アルギニンオリゴ

マーを除く。）が魚類由来である、請求項１～４のいずれかに記載の腸管吸収性医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、生理活性タンパク質の活性を保持した状態で腸管内から血中に移行させるための医薬組成物に関する。

【背景技術】

【０００２】

これまでに、ペプチドやタンパク質からなるいくつかの生理活性物質が臨床現場に登場し、医薬品として使用されて顕著な治療効果を示している。しかしながら、現在その投与方法はほとんどの場合注射剤に限られている。これは、ペプチドやタンパク質は経口投与をした際には消化管に存在するプロテアーゼによる分解を受け、また腸管からの吸収効率が低いために経口投与されたペプチドやタンパク質のごく一部しか血中に到達しないことが主な理由となっている。特に後者については、腸管は本来生体にとって有害な物質を体内に入れないための障壁としての役割を担っているために、腸管上皮細胞層は本質的にペプチド、タンパク質のようなある程度以上の分子量を有する親水性の物質を透過させにくい性質を有しており、この障壁を越えて生理活性タンパク質を血中に移行させることは非常に困難と考えられている。

【０００３】

薬剤を注射投与することは、特に治療が頻回、長期にわたる場合には患者および医師にとって大きな負担であり、このため生理活性ペプチドやタンパク質を経口投与可能にするための様々な方法が検討されてきた。例えば添加物として界面活性剤などを共存させて人工的に腸管の浸透性を向上させる方法が試みられているが、非特異的に腸管透過性を上げる物質を用いることは生体にとって有害な物質も体内に流入する危険性を排除できない。

【０００４】

近年、特定の配列を有するカチオン性ペプチドが、親水性であるにもかかわらず細胞膜を透過する性質を有することが見いだされてきている。中でもＨＩＶ－１　Ｔａｔタンパク質の部分ペプチドや、６－９個のアルギニン残基からなるオリゴマーペプチドは、細胞膜を効率よく透過して細胞内に移行することが示されており、このような細胞透過性のペプチドに蛋白質、ＤＮＡ、糖などをコンジュゲート化することで目的物質を効率よく細胞内に取り込ませることが可能であることが報告されている（特許文献１、２参照）。

【０００５】

このような細胞透過性ペプチドと薬剤のコンジュゲートを用いることで経口投与した薬剤を腸壁を透過させて血中へ移行させることは、可能性として提示はされているものの、実証には到っていない。これは、腸壁を透過させて薬剤を血中に移行させることは、腸壁細胞層を構成する上皮細胞の管腔側の刷子縁膜と血管側の側底膜の２つのバリアを透過する必要があり、細胞内への侵入とは異なった機能が必要とされることに起因すると考えられる。また、細胞透過性ペプチドと薬剤を共有結合させたコンジュゲートを用いる場合の問題点としては、コンジュゲート化によって薬剤の構造が変化してしまうということがあげられる。特に薬剤が生理活性ペプチドやタンパク質の場合には、ペプチド／タンパク質の特定の部位にのみ選択的に透過性ペプチドを共有結合させることは困難であるため、結合したペプチド／タンパク質の中には高い確率で生理活性発現に重要な部位が修飾を受けて活性が低下したもの出現することが予想される。特に分子量の小さな生理活性ペプチド／タンパク質の場合には修飾の影響をより受けやすいと考えられる。

【０００６】

また、生理活性タンパク質に共有結合修飾を行わずに腸管吸収性を向上させる試みとして、透過性キャリアとして分子内に疎水性部分を有する低分子量のアミノ酸誘導体を共存させる方法が報告されている（特許文献２参照）が、この方法では共存させるアミノ酸誘

導体中の疎水性部分と細胞膜との非特異的かつ受動的な弱い作用で取り込みが起こると考えられ、高い効率で生理活性タンパク質を血中に移行させることは困難であり、必然的に用いるキャリアの量が非常に多くなってしまう。このことは、生体成分ではない修飾アミノ酸誘導体であるキャリアを大量に生体に投与することによる望ましくない影響への懸念につながる。また大量のキャリアを必要とすることはコストの点からも望ましくない。

【特許文献１】特開２００１－１９９９９７号公報
【特許文献２】特表２００３－５２３９８４号公報
【特許文献３】特表平８－５０９４７４号公報

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
本発明の目的は、生理活性タンパク質を経口または経腸投与して、活性を保持した状態で血中に移行させうる医薬組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】
【０００８】
上記課題を克服するために、本発明者らは、通常の条件では経口投与による血中移行性の低い生理活性タンパク質に対して、その透過性を向上させる手段を検討した結果、生理活性タンパク質とカチオン性ペプチドが共有結合されていない組成物が有効であることを見いだした。
【０００９】
すなわち、本発明は以下のような構成を有する。
【００１０】
生理活性タンパク質を、活性を保持した状態で腸管内から血中に移行させる医薬組成物であって、成分として等電点が５．５以下の生理活性タンパク質およびカチオン性ペプチドであるプロタミンあるいはその部分ペプチドあるいはその誘導体（ただし、アルギニンオリゴマーを除く。）を含有し、生理活性タンパク質とカチオン性ペプチドが共有結合で連結されていない腸管吸収性医薬組成物。

【発明の効果】
【００１１】
本発明により、生理活性タンパク質の経口または経腸投与が可能となり、従来の注射による投与法に比べ、簡便で患者に優しい薬物治療が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】
【００１３】
カチオン性ペプチドは、少なくとも一つの塩基性のアミノ酸（アルギニンまたはリジンまたはヒスチジン）を含有し、中性条件下で正荷電を有するペプチドをいう。ペプチドの長さは５０アミノ酸残基以下が好ましく、さらに好ましくは長さが２０アミノ酸残基以下、さらに好ましくは１０アミノ酸残基以下のものが用いられる。ペプチドを構成する全アミノ酸の中で、塩基性のアミノ酸の占める割合は３０％以上であることが好ましく、さらに好ましくは５０％以上、さらに好ましくは７０％以上が塩基性のアミノ酸から構成される。
【００１５】
カチオン性ペプチドを構成するアミノ酸は、天然に存在するアミノ酸の他に、天然のアミノ酸の構造を一部改変した誘導体など非天然のアミノ酸も使用されうる。例えば、立体配置がＤ体のアミノ酸は、腸管中に存在する蛋白分解酵素による分解を受けにくいことから有効に使用されうる。
【００１６】
本発明において用いられるカチオン性ペプチドは、プロタミンあるいはその部分ペプチドあるいはその誘導体（ただし、アルギニンオリゴマーを除く。）である。
【００１７】
本発明において用いられるカチオン性ペプチドは、通常のペプチド合成の方法を用いて

合成することが可能である。あるいは大腸菌などの微生物、動物細胞、昆虫細胞などに目的とするペプチドを含む配列をコードする遺伝子を導入して発現させて作製することも可能である。あるいは、天然に存在するペプチドを単離または単離後分解して用いることも可能である。例えば、サケ、ニシンなどの魚類の精巣から単離されるプロタミンは、注射薬として安全に使用されている実績のあるカチオン性ペプチドであり、安価に単離精製することが可能であることから、本発明において好適に用いられる。また、本発明において用いられるカチオン性ペプチドは、単一のペプチドとしてもまたは２種以上のペプチドの混合物としても使用することができる。

【００１８】

生理活性タンパク質としては、カチオン性ペプチドと良好な複合体を形成して高い効率で腸管を透過するには等電点が５．５以下の生理活性タンパク質が用いられる。本発明で使用される等電点が５．５以下の生理活性タンパク質としては、ペプチドホルモン、酵素タンパク質、抗体、ワクチンなどがあり、例えば、インスリン、グルカゴン様ペプチド（ＧＬＰ－１）、ガストリン、成長ホルモン、オキシトシン、プロチレリン、Ｇ－ＣＳＦ、エリスロポエチン、ＥＧＦ、等電点が５．５以下のインターフェロン類（例えば、インターフェロンα、インターフェロンγ）、等電点が５．５以下のインターロイキン類、スーパーオキサイドジスムターゼ（ＳＯＤ）等をあげることができるが、インスリン、成長ホルモン、等電点が５．５以下のインターフェロン類、等電点が５．５以下のインターロイキン類、およびＧ－ＣＳＦであることが好ましく、さらに、インスリンは頻回投与が必要な比較的分子量の小さいタンパク質であり、等電点が５．５以下でカチオン性ペプチドと良好な複合体を形成しうることから特に好適に使用されうる。

【００１９】

これら生理活性タンパク質は、天然のタンパク質またはペプチドであっても、その配列の一部を改変した誘導体であっても構わない。また、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）化などの化学的な修飾を行った誘導体であっても構わない。

【００２０】

生理活性タンパク質の大きさは、特に限定されるものではないが、十分高い腸管透過効率を得るためには分子量が３００００以下であることが望ましく、１００００以下であることがさらに望ましい。

【００２２】

本発明でいう生理活性タンパク質が活性を保持した状態で腸管内から血中に移行するとは、血中に移行した生理活性タンパク質が通常その活性を測定する条件において、例えば、酵素であれば酵素活性、細胞の受容体に作用する物質であれば受容体との結合能あるいは標的細胞の機能を変化させる能力などを保持していることをいう。血中に移行した生理活性タンパク質の活性を、免疫学的測定などにより測定しうるその存在量に対する比で表した比活性で見たときに、（血中移行後の生理活性タンパク質が保持している比活性）／（腸管透過前の生理活性タンパク質の比活性）の値が０．１以上であることが望ましく、０．５以上であることがさらに望ましい。

【００２３】

本発明で用いられるカチオン性ペプチドは、その量が多すぎると腸管に対して非特異的な障害作用を示す可能性があり、またコストの面でも投与量が少ないことが望ましい。このため、本医薬組成物における生理活性タンパク質とカチオン性ペプチドの混合比は、（カチオン性ペプチドの分子数）／（生理活性タンパク質の分子数）の数値として、３０００以下であることが望ましく、より好ましくは１０００以下であり、より好ましくは２００以下である。

【００２４】

本発明の医薬組成物は、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム

、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。

【００２５】

本発明の医薬組成物は、溶液、固体、粉末状などの種々の形態で使用されうるが、安定性及び取扱いの容易さから、例えば、凍結乾燥等の方法で固形状あるいは粉末状にした形態が好ましく、粉末または固形製剤であることが好ましい。

【００２６】

経口投与に用いられる医薬組成物としては、好ましくは腸溶性製剤として、例えば腸溶性カプセル等に充填するか、あるいは錠剤として打錠された後、腸溶性コーティングを行うなどの方法によって腸溶性の経口投与用医薬組成物として使用される。

【００２７】

本発明の医薬組成物を、動物（ヒトを含む）に経口または経腸投与する方法には、特にその具体的形態に制限はない。例えば、経口剤としては、乾燥状態のものあるいは溶液状のものをそのまま服用したり、あるいはそれを賦形剤とともにカプセルに充填して服用したり、さらには乾燥状態のものを水に一旦もどして分散させてから服用したりすることができる。坐剤の形態を利用して直腸等に直接的に投与することもできる。生理活性タンパク質を動物に投与する方法は、経口または経腸投与することが好ましい。

【００２８】

本発明により、これまで注射剤として用いられてきた生理活性タンパク質の経口経腸投与が可能となり、患者の苦痛、不便を大幅に改善する薬剤を提供することが出来る。これらの注射剤が患者に与える苦痛や通院の不便を改善することは医療現場における患者本位の医療を実現するだけではなく、これまでのタンパク質製剤の概念を根底から変え、画期的製剤の創製につながる。

【実施例】

【００２９】

以下に実施例を示すが、本発明はこれら実施例により限定されるものでない。

【００３０】

参考例１

オリゴアルギニンペプチドによるインスリンin vivo（ラット）腸管吸収促進効果。

【００３１】

＜方法＞

１．インスリン溶液の調製

ヒトリコンビナントインスリン（和光純薬）１．９２３mg（＝５０IU＝０．３３μmol）を秤量し、０．１M塩酸５０μlに溶解した。これにメチルセルロース（ＭＣ）添加リン酸生理緩衝液ｐＨ７．４（ＰＢＳ）１．２mlおよび０．１ＭＮａＯＨ溶液５０μlを加えて中和し、さらにＭＣ添加ＰＢＳ１．２ｍｌを加えて総容量を２．５ｍｌとした。（インスリン濃度０．７６９mg/ml＝２０IU/ml）。

【００３２】

２．インスリン－アルギニン６ｍｅｒペプチド混合液の調製

Ｌ－アルギニン６ｍｅｒペプチドまたはＤ－アルギニン６ｍｅｒペプチド（シグマジェノシス社にて合成）それぞれ２．５mg（２．６μmol）または５mg（５．２μmol）を秤量し、上記１で作製したインスリン溶液０．５ｍｌ（インスリン０．３８５mg＝０．０６６μmol）を添加して溶解し、オリゴアルギニンペプチド－インスリン混合溶液とした。コントロール（オリゴアルギニンペプチド無し）については、インスリン溶液そのものを投与に用いた。

【００３３】

３．ラット腸管吸収実験

２４時間絶食した体重約２００ｇのＳＤ系雄性ラットにペントバルビタールナトリウム５０mg/kgを腹腔内注射することにより麻酔した後、正中線に沿って開腹し、腸管を露出した。回盲接合部から２－３cm回腸よりの部分からシリコンチューブを、およびその上部約１０cmの部分からゾンデを挿入し、さらに内側６cmの部分に縫合糸を通した。

【００３４】

ゾンデから、あらかじめ３７℃に加温したリン酸生理緩衝液ｐＨ７．４（ＰＢＳ）40mlを流速５ml/minで流し込んで内容物を排出させた後、シリコンチューブに栓をして、ゾンデからあらかじめ３７℃に加温したＰＢＳ１mlを投与し、３０分貯留させた。投与後は速やかにゾンデに栓をして、腸管を腹腔内に戻して切開部をクリップで閉じ安静にした。

【００３５】

貯留後、ゾンデおよびシリコンチューブの栓をはずし、ループ内にあらかじめ３７℃に加温したＰＢＳ２０mlを流速５ml/minで流し込んで内容物を排出させた後、あらかじめ縫合糸を通した６cmの部分を結紮してループを作成した。このループ内に、２．で調製したオリゴアルギニンペプチド－インスリン混合溶液０．５mlを投与し、腸管を腹腔内に戻し、切開部をクリップで閉じ安静にした。

【００３６】

実験中のラットは、温水循環ポンプにより３７℃に加温したホットプレート上に背位で固定し体温調節を行った。

【００３７】

投与前および投与後５、１０、１５、３０、６０、１２０、１８０、２４０分後に頸静脈より０．２５mlを採血し、ノボアシストプラスを用いて血糖値の測定を行った。残りの血液は遠心分離により血漿に分離し、酵素免疫測定法によりインスリン濃度を定量した。

【００３８】

＜結果＞

Ｌ－アルギニン６ｍｅｒ、Ｄ－アルギニン６ｍｅｒペプチドいずれについても、コントロールのインスリンのみの投与と比べて、血中インスリン濃度の明らかな上昇、および血糖値の明らかな低下が認められた（図１、２）。

【００３９】

実施例１

サケプロタミンによるインスリンin vivo（ラット）腸管吸収促進効果。

【００４０】

＜方法＞

サケプロタミン（シグマ社製）２１．５ｍｇ（５μmol）を秤量した。実施例１と同様にして調製したインスリン溶液０．５ｍｌを添加して溶解し、インスリン－サケプロタミン混合溶液とした。ラット腸管吸収の評価は、実施例１と同様の方法で行った。

【００４１】

＜結果＞

サケプロタミン－インスリン混合溶液を投与することにより、コントロールのインスリンのみの投与と比べて、血中インスリン濃度の明らかな上昇、および血糖値の明らかな低下が認められた（図３，４）。

【００４２】

参考例２

オリゴアルギニンペプチドによるin vitroインスリン回腸粘膜透過促進効果。

【００４３】

＜方法＞

１．インスリン溶液の調製

ヒトリコンビナントインスリン（和光純薬）２６．１ｍｇを秤量し、０．１Ｍ ＨＣｌ溶液 ３００μｌを加え溶かした後、Krebs-Ringer Buffer ３．９ｍｌ及び ０．１Ｍ ＮａＯＨ溶液 ３００mlを加えて４．５ｍｌとしインスリン溶液（１mM）とした。

【００４４】

２．インスリン－アルギニン６ｍｅｒペプチド混合液の調製
Ｌ－アルギニン６ｍｅｒペプチド２．１mgを秤量し、上記で作製したインスリン溶液５５０μlに溶解して、インスリン－オリゴアルギニンペプチド混合溶液とした（アルギニンペプチド濃度４mM、インスリン濃度１mM。）。

【００４５】

３．回腸粘膜透過実験
２４時間絶食した体重約 ２００ｇのWistar系雄性ラットにペントバルビタールナトリウム 50mg/kgを腹腔内注射することにより麻酔し、腸管組織を摘出し常法に従い筋層剥離後、Ussing chamberに装着し、donor及びreceiver側にKrebs-Ringer Buffer ５ｍｌを加えた。膜を２０分間安定させた後、donor側から２mlを採取すると同時に、インスリンおよびオリゴアルギニンペプチド混合溶液２mlを加えた。（反応時濃度：インスリン０．４mM、オリゴアルギニンペプチド１．６mM。）これを開始時(０分)とし以降、１０、１５、３０、６０、９０、１２０、１５０、１８０分後にreceiver側より １００μlをサンプリング(同容量のKrebs-Ringer Bufferで置換)し、酵素免疫測定法にてインスリン濃度を測定した。

【００４６】

＜結果＞
インスリン－オリゴアルギニンペプチド混合溶液を用いた場合には、コントロールのインスリンのみの溶液を用いた場合と比較して、インスリンの回腸粘膜透過性の明らかな促進が認められた（図５）。

【００４７】

実施例２
サケプロタミンによるin vivo（マウス）インスリン腸管吸収促進効果。

【００４８】

＜方法＞
ヒトリコンビナントインスリン（和光純薬）４mgを秤量し、０．１M塩酸２００μlに溶解した。これにリン酸生理緩衝液ｐＨ７．４（ＰＢＳ）１．２mlおよび０．１ＭＮａＯＨ溶液２００μlを加えて中和し、さらにＰＢＳを加えて総容量を１０．５ｍｌとした。（インスリン濃度０．３８ｍｇ／ｍｌ）。

【００４９】

サケプロタミン（シグマ社製）１７．５ｍｇに、上記で調製したインスリン溶液０．２ｍｌ（７６μｇ）を添加して溶解し、インスリン－サケプロタミン混合溶液とした。

【００５０】

２４時間絶食させたBALB/c系雄マウスにペントバルビタールナトリウム溶液15ｍｇ／ｋｇを腹腔内に注射することにより麻酔した後、正中線に沿って開腹し腸管を露出した。回盲接合部から２－３ｃｍ回腸寄りの部分からシリコンチューブを、およびその上部１０ｃｍの部分からゾンデを挿入し、シリコンチューブとゾンデの内側２ｃｍの部分にそれぞれ縫合糸を通した。

【００５１】

シリコンチューブから腸管内へあらかじめ３７℃に加温したＰＢＳ溶液２０ｍｌを通過させ腸管内を洗浄した後、ゾンデ側の縫合糸を結紮してシリコンチューブより作成したインスリン－サケプロタミン混合液０．２ｍｌを投与し、シリコンチューブ側の縫合糸を結紮してループを形成させた後、腸管を腹腔内に戻し切開部をクリップで閉じ安静にした。実験中のマウスは、３７℃加温マットにより背位で固定し体温調整を行った。

【００５２】

投与前、および投与後３０、６０、９０、１２０、１５０分後に尾動脈より２０μｌの血液を採取し富士ドライケム（富士フィルム社）を用いて血中グルコース濃度を測定した。また血液の一部を５０００ｒｐｍ、１０分間遠心して得た血漿を、インスリンＥＬＩＳＡキット（矢内原研究所）を用いて血液中のインスリン濃度を定量した。

【００５３】

＜結果＞
プロタミンとインスリンの混合液をマウス腸管に投与することにより、コントロールのインスリンのみの投与と比べて、マウス血中のインスリン濃度の明らかな上昇、および血糖値の明らかな低下が認められた（図６、７）。
【００５４】
参考例３
オリゴアルギニンペプチドによるインスリンの腸管上皮細胞（Ｃａｃｏ２）単層透過促進効果。
【００５５】
＜方法＞
１．蛍光色素（フルオレセイン）標識インスリンの調製
ヒトリコンビナントインスリン（和光純薬）１０ｍｇを秤量し、０．１Ｍ ＨＣｌ溶液２５０μｌに溶解した後、ＰＢＳ ２．５ｍｌ及び ０．１Ｍ ＮａＯＨ溶液 ２５０μｌを加えて３ｍｌとした。この溶液を、脱塩カラム（アマシャム社ＰＤ－１０）を用いて脱塩し、６ｍｌの５０ｍＭ炭酸水素ナトリウム溶液とした。（インスリン濃度１．６７ｍｇ／ｍｌ）。この溶液に、４．８ｍｇのＮＨＳ－フルオレセイン（ピアス社）を０．６ｍｌの５０ｍＭ炭酸水素ナトリウム溶液に溶解した液を全量添加し、２５℃で４時間反応させた。さらに１Ｍのトリス塩酸緩衝液（ｐＨ８）０．６ｍｌを添加して３０分間反応させた後、脱塩カラムを用いて１０ｍｌの純水に対して脱塩し、未反応のＮＨＳ－フルオレセインを除去することで、フルオレセイン標識インスリン水溶液を得た。
【００５６】
２．Ｃａｃｏ２細胞単層透過試験
１０％の胎仔ウシ血清を添加したＤ－ＭＥＭ培地中で、３７℃、５％のCO_2の条件下に、Ｃａｃｏ－２細胞をトランスウェル（Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ）（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製、メンブレン直径１２ｍｍ、培養面積１．０ｃｍ^2、孔サイズ０．４μｍ）フィルター上で培養した。２日～３日ごとに培地を交換して２１日間培養することで十分に分化した細胞単層を得た。
フィルター上の細胞単層をＨＢＳＳ溶液で洗浄後、フルオレセイン標識インスリン０．７７ｍｇ／ｍｌおよびオリゴアルギニンペプチド（Ｌ－アルギニン６ｍｅｒ）を０、１．２５または５ｍｇ／ｍｌの濃度で含むＨＢＳＳ溶液を０．５ｍｌをａｐｉｃａｌ側に添加し、３０、６０、１２０分後にｂａｓｏｌａｔｅｒａｌ側の透過液（容量１．５ｍｌ）から０．１ｍｌを回収して５．５倍に希釈後、蛍光プレートリーダーにて透過したフルオレセインインスリンに由来する蛍光（励起波長４９０ｎｍ、検出波長５２０ｎｍ）を測定した。既知濃度のフルオレセインインスリン溶液の蛍光測定値をもとに、透過液サンプル中のフルオレセインインスリンの濃度を算出した。
【００５７】
インスリンの透過率は、以下の式
ｂａｓｏｌａｔｅｒａｌ側に透過したインスリン総量（μｇ）／ａｐｉｃａｌ側に添加したインスリン総量（μｇ）ｘ１００（％）
で算出した。
【００５８】
＜結果＞
オリゴアルギニンペプチド（Ｌ－Ａｒｇ６ｍｅｒ）の添加により、透過するインスリン量の明らかな増大が認められた（表１）。
【００５９】

【表１】

表１　インスリンのＣａｃｏ２単層透過性に対する
オリゴアルギニンペプチド添加の影響

反応時間	Ｌ－Arg6mer添加濃度 (mg/ml)	透過液中インスリン濃度(μg/ml)＊	透過率 (%)＊
30分	0	1.65	0.097
	1.25	3.68	0.215
	5	3.95	0.231
60分	0	5.47	0.320
	1.25	9.90	0.579
	5	11.56	0.676
120分	0	15.24	0.891
	1.25	25.07	1.465
	5	31.41	1.835

＊各条件ともn=3 測定の平均値

【００６０】

参考例４

オリゴアルギニンペプチドによるインターフェロンin vivo（ラット）腸管吸収促進効果。

【００６１】

＜方法＞

Ｌ－アルギニン６ｍｅｒペプチド５mgおよびインターフェロンβ（東レ製）を含有するＰＢＳ溶液０．５ｍｌを調製し、実施例１と同様にして全量をラット腸管内に投与した。投与するインターフェロンβ量は、ラット体重ｋｇあたり２．２５ｘ１０^{6}ＩＵとなるように調製した。経時的に採血を行い、血漿中のインターフェロンβ濃度をＥＬＩＳＡ法（鎌倉テクノサイエンス社製キット）にて測定した。

【００６２】

＜結果＞

オリゴアルギニン－インターフェロンβ混合溶液を投与することにより、コントロールのインターフェロンβのみの投与と比べて、血中インターフェロンβ濃度の上昇が認められた（図８）。

【図面の簡単な説明】

【００６３】

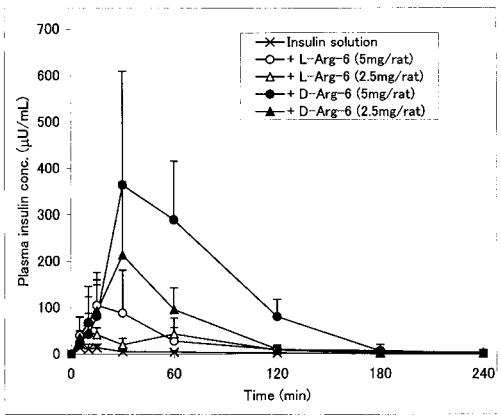
【図１】各量のＬ－アルギニンまたはＤ－アルギニン６ｍｅｒペプチドと混合したインスリンをラット腸管ループ内に投与し、経時的に採血した血漿サンプル中のインスリン濃度を測定した結果を示す。Insulin solutionは、インスリンのみを投与したコントロールラットでの結果を示す。

【図２】図１の各サンプルにおける血糖値測定結果を示す。

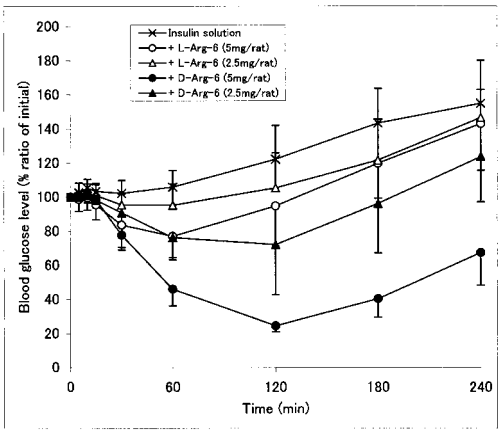
【図３】サケプロタミンと混合したインスリンをラット腸管ループ内に投与し、経時的に

採血した血漿サンプル中のインスリン濃度を示す。Insulin solutionは、インスリンのみを投与したコントロールラットでの結果を示す。
【図４】図３の各サンプルにおける血糖値測定結果を示す。
【図５】参考例２のin vitro回腸粘膜透過実験において、Ｌ－アルギニン６ｍｅｒペプチド存在下および非存在下（コントロール）それぞれの条件での透過液中のインスリン濃度を経時的に測定し、累積透過量として表示した結果を示す。
【図６】サケプロタミンと混合したインスリンをマウス腸管ループ内に投与し、経時的に採血した血漿サンプル中のインスリン濃度を示す。Insulin solutionは、インスリンのみを投与したコントロールマウスでの結果を示す。
【図７】図６の各サンプルにおける血糖値測定結果を示す。
【図８】Ｌ－アルギニン６ｍｅｒペプチドと混合したインターフェロンβをラット腸管ループ内に投与し、経時的に採血した血漿サンプル中のインターフェロンβ濃度を測定した結果を示す。Interferon solutionは、インターフェロンβのみを投与したコントロールラットでの結果を示す。各値は、ｎ＝３実験の平均値を示す。

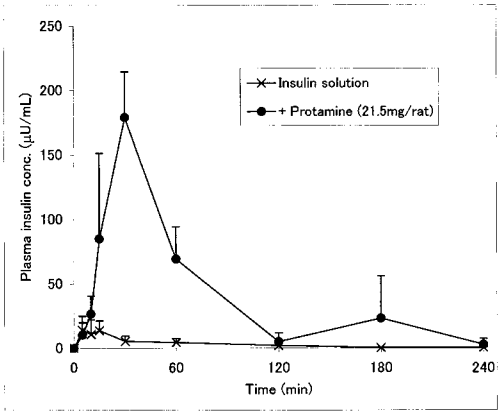
【図１】



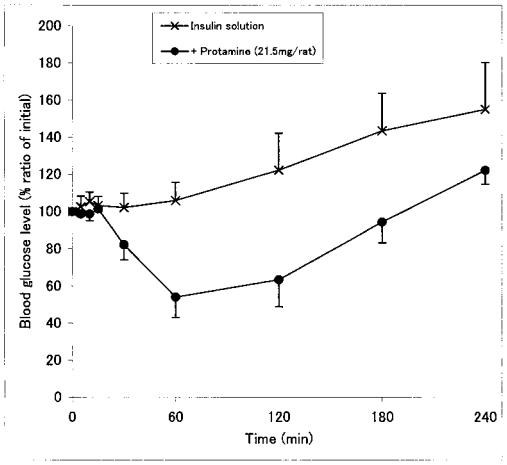
【図２】



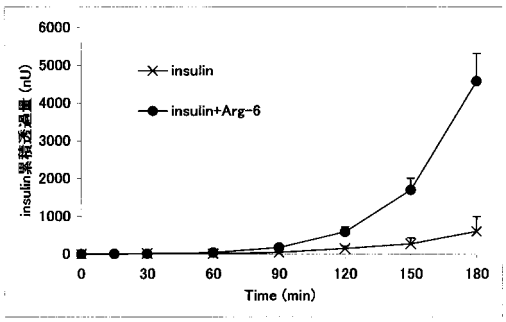
【図３】



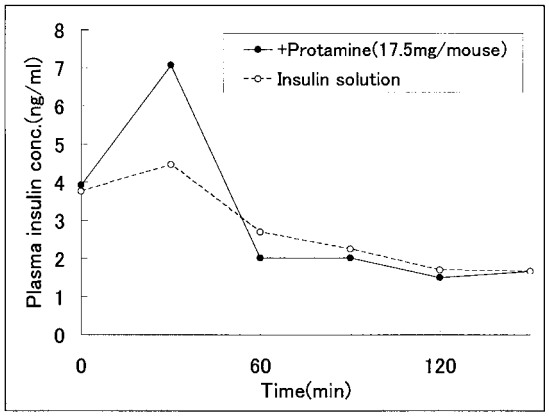
【図４】



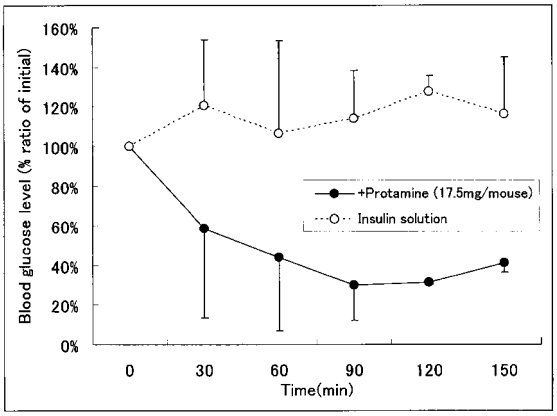
【図５】



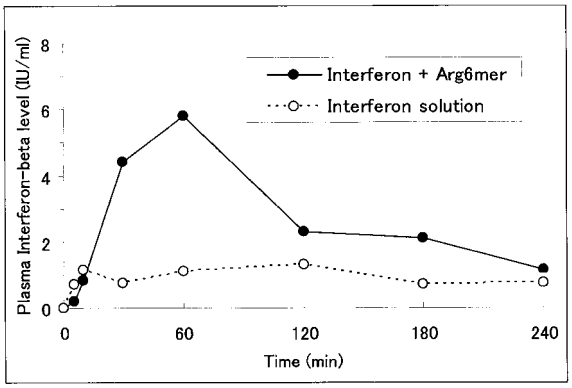
【図６】



【図７】



【図８】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ａ６１Ｐ 43/00 (2006.01) Ａ６１Ｐ 43/00 １１７

(72)発明者 柿澤 資訓
神奈川県鎌倉市手広１１１１番地 東レ株式会社 基礎研究所先端融合研究所内
(72)発明者 西尾 玲士
神奈川県鎌倉市手広１１１１番地 東レ株式会社 基礎研究所先端融合研究所内

審査官 淺野 美奈

(56)参考文献 特開昭６１－１１５０３０（ＪＰ，Ａ）
特開平１０－０９５７３８（ＪＰ，Ａ）
特開２０００－２８１５８９（ＪＰ，Ａ）
特開２００４－５３５４６１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第００／００２５７４（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ４７／４２
Ａ６１Ｋ ３８／２１
Ａ６１Ｋ ３８／２２
Ａ６１Ｋ ３８／２８
Ａ６１Ｐ ３／１０
Ａ６１Ｐ ４３／００