

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380107284.4

[51] Int. Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010年1月6日

[11] 授权公告号 CN 100577201C

[22] 申请日 2003.10.22

[21] 申请号 200380107284.4

[30] 优先权

[32] 2002.10.22 [33] US [31] 60/420,187

[32] 2002.10.22 [33] US [31] 60/420,399

[32] 2002.11.21 [33] US [31] 60/428,100

[32] 2002.11.22 [33] US [31] 60/428,562

[86] 国际申请 PCT/US2003/033595 2003.10.22

[87] 国际公布 WO2004/037195 英 2004.5.6

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.22

[73] 专利权人 瓦拉塔药品公司

地址 加拿大安大略省

[72] 发明人 S·J·布兰德 A·科露兹

A·帕斯特拉克 Y·休

[56] 参考文献

EP 0380230 A 1990.8.1

US 4997950 A 1991.3.5

WO 02055152 A 2002.7.18

Gastrin stimulates beta - cell neogenesis and increases isletmass from transdifferentiated but not from normal exocrinepancreas tissue. Diabetes, Vol.51 . 2002

审查员 吴希哲

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 刘 玥

权利要求书1页 说明书43页

[54] 发明名称

糖尿病的治疗

[57] 摘要

提供胰岛再生治疗的组合物和方法,包括补充胃泌素/CCK受体配体的因子组的成员,向靶器官持续释放输送和局部输送的制剂、装置和方法。

1. 一种组合物，包括胃泌素/CCK受体配体和胰高血糖素样肽-1受体配体。
2. 根据权利要求1的组合物，其中GLP-1受体配体是GLP-1。
3. 根据权利要求1或2的组合物，其中胃泌素/CCK受体配体是胃泌素34、胃泌素17或胃泌素8。
4. 根据权利要求1或2的组合物，其中胃泌素/CCK受体配体是第15位氨基酸是亮氨酸残基的、具有17个氨基酸的胃泌素。
5. 持续释放的根据权利要求1或2的组合物，其中至少胃泌素/CCK受体配体是持续释放制剂。
6. 包括胃泌素/CCK受体配体和胰高血糖素样肽-1受体配体的组合物用于制备治疗糖尿病的药物用途。
7. 权利要求6的用途，其中胃泌素/CCK受体配体选自胃泌素34、胃泌素17或胃泌素8。
8. 根据权利要求7的用途，其中胃泌素17是第15位氨基酸是亮氨酸残基的、具有17个氨基酸的胃泌素。

糖尿病的治疗

发明领域

本发明涉及用胰岛再生疗法和免疫抑制剂治疗糖尿病受试者的方法和组合物，用于局部输送和组合物持续释放的制剂和方法。

发明背景

常见病糖尿病的严重类型是由于胰腺 β 细胞胰岛素分泌的缺乏或相对不足所致。所以，糖尿病依赖注射外源胰岛素以预防危害生命的高血液葡萄糖（高血糖）并发症。除非受试者依赖于非常高的葡萄糖测试和胰岛素治疗（强化胰岛素治疗）的方案，否则胰岛素治疗不能防止高血糖所导致的器官损害的慢性长期并发症。强化胰岛素治疗增加了由于胰岛素过量引起的急性低血糖风险，伴有可能是致命的急性和严重的意识状态改变。

在美国人口中大约一百万人患有少年型或 I 型糖尿病，每年出现大约 30,000 个新发病例。此外，在流行病比例的水平上，II 型糖尿病（也称为成年发病或胰岛素抵抗性糖尿病）受试者的数量极端庞大并且迅速增加，一种可导致胰腺耗尽和胰岛素不足的疾病。

异常高的血液葡萄糖（高血糖）是糖尿病的特点，如果放任不治，将导致各种病理状态，例如，不能治愈的外周血管溃疡、导致失明的视网膜损害、以及肾衰竭。I 型和 II 型糖尿病都用注射胰岛素治疗，对通过受试者葡萄糖自身监控测定的血液葡萄糖水平产生应答，尽管不是所有 II 型受试者都会进展到需要胰岛素治疗。典型地，每天输送受试者多倍剂量的胰岛素。糖尿病的严重的病理结果与血液葡萄糖水平控制不严格有关。

糖尿病的可能治疗将是恢复 β 细胞功能以便对血液葡萄糖水平的变化产生应答而动态调节胰岛素释放。这可通过胰腺移植完成，但是这种方法典型地限于肾衰竭需要肾脏移植的糖尿病。同样地，胰腺移植可能需要终生免疫抑制以防止同种异体移植物排异和移植胰腺的自身免疫破坏。

最近，分离的人胰岛制品的移植物已经在人类受试者中成功地长

时间逆转了胰岛素糖尿病。然而，对每名受者来说需要大量供体胰岛细胞材料，而胰岛细胞材料的供应不能足以满足需要。

概述

本发明的特色是治疗糖尿病的方法，该方法包括给哺乳动物施用治疗有效量的包括胃泌素/CCK 受体配体和补充用于胰岛再生治疗的胃泌素的因子 (FACGINT) 的组合物，只要 FACGINT 不是 EGF 受体配体。

如这里使用的术语，FACGINT 是选自下组中的至少一种：胰高血糖素样肽 1 受体配体；胰高血糖素样肽 2 受体配体；肠抑胃肽 (GIP) 受体配体；角质形成细胞生长因子 (KGF) 受体配体；二肽基肽酶 IV 抑制剂；REG 蛋白受体配体；生长激素受体配体；催乳素 (PRL) 受体配体；胰岛素样生长因子 (IGF) 受体配体；PTH 相关蛋白 (PTHrP) 受体配体；肝细胞生长因子 (HGF) 受体配体；骨形态发生蛋白 (BMP) 受体配体，转化生长因子 β (TGF- β) 受体配体；层粘连蛋白受体配体；血管活性肠肽 (VIP) 受体配体；成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体配体；角质形成细胞生长因子受体配体；神经生长因子 (NGF) 受体配体；胰岛再生相关蛋白 (INGAP) 受体配体；活化素 A 受体配体；血管内皮生长因子 (VEGF) 受体配体；红细胞生成素 (EPO) 受体配体；垂体腺苷酸环化酶活化多肽 (PACAP) 受体配体；粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 受体配体；粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)；血小板衍生生长因子 (PDGF) 受体配体和促胰液素受体配体。

如这里使用的，术语“糖尿病”意思是胰岛素短寿、产生抗胰岛素抗体、或者血液糖过量的任何生理指示。糖尿病举例说明，但不限于 I 型糖尿病、II 型糖尿病、妊娠糖尿病、以及前驱糖尿病状态。如这里使用的，术语“哺乳动物”具有哺乳动物任何成员的通常含义，包括人。

在相关的实施方案中，FACGINT 是胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 受体配体；胰高血糖素样肽 2 (GLP-2) 受体配体；或者生长激素受体配体家族成员，可以是生长激素，如人生长激素 (HGH)、胎盘催乳素 (PL)、或者催乳素 (PRL)、或者 exendin，如 exendin-4。

本发明的另一个特色是提供治疗糖尿病的方法，该方法包括将大

量细胞与具有 FACGINT 和胃泌素/CCK 受体配体中的至少一种的组合物离体接触，只要 FACGINT 不是 EGF 受体配体；将该细胞施用于需要进行施用的哺乳动物，因而治疗糖尿病。在该方法的一个实施方案中，细胞是自体的，即，来自受试者。可供选择地，细胞是来自相同物种中的另一个体，或者甚至来自另一个物种。在离体使用细胞的方法中，细胞可以是胰腺导管细胞。胰腺细胞是胰岛前体细胞的来源。这种方法的另一个实施方案包括，在移植步骤前，用该组合物离体处理细胞。相关的方法进一步包括，接触步骤前，离体培养该细胞。

通常，术语“给药”或“接触”意思是向方法的使用者提供提高哺乳动物中胰岛素分泌细胞量的有效量的组合物。

通常在这些方法中，组合物是全身给药。此外，组合物中 FACGINT 的量基本上小于在缺乏胃泌素/CCK 受体配体时减少糖尿病哺乳动物中血液葡萄糖所需 FACGINT 的最小有效量。该方法可进一步包括测量选自下组的参数：血液葡萄糖、血清葡萄糖、血液糖基化的血红蛋白、胰腺 β 细胞团、血清胰岛素、胰腺胰岛素含量、以及形态度量测定的 β 细胞团。总的来说，糖尿病诊断领域的技术人员将在禁食后测量血液或血清中的葡萄糖水平，即，在受试者或受试者未进食期间，这种诊断的典型持续时间。标准测量是测定空腹血液葡萄糖，或 FBG。

体内方法这里可进一步包括测量选自下组的参数：胰岛素分泌细胞的量、胰岛素分泌细胞的葡萄糖反应性、胰岛前体细胞增殖的量、以及成熟胰岛素分泌细胞的量，这些测量在哺乳动物中进行，其中该哺乳动物是实验动物如遗传性糖尿病小鼠(NOD 小鼠)或者被诱导(用链脲佐菌素(streptozotocin)或 STZ)患糖尿病的啮齿动物。

这里另一个实施方案是在哺乳动物中诱导胰腺胰岛再生的方法，其中给哺乳动物施用包括 FACGINT 和胃泌素/CCK 受体配体组合的组合物，只要 FACGINT 不是 EGF 受体配体，给予足以提高胰腺组织中胰岛前体细胞增殖的量，因此诱导胰腺胰岛再生。

这里另一个实施方案是诱导哺乳动物中胰腺胰岛再生的方法，该方法包括给予包含 FACGINT 和胃泌素/CCK 受体配体组合的组合物，其中 FACGINT 不是 EGF 受体配体，给予足以提高哺乳动物中胰腺胰岛分泌 β 细胞数量的量。

因此，本发明的实施方案是包括胃泌素/CCK 受体配体和

FACGINT 的组合物，只要 FACGINT 不是 EGF 受体配体。在一些实施方案中提供诱导胰岛前体细胞增殖形成成熟胰岛素分泌细胞数量增加的有效剂量的组合物。类似地，在一些实施方案中提供诱导胰岛前体细胞分化形成成熟胰岛素分泌细胞的有效剂量的组合物。

可提供含有药学可接受载体的组合物。

这里也提供治疗糖尿病的试剂盒，含有包括胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT 的组合物、容器、以及使用说明，只要 FACGINT 不是 EGF 受体配体。可提供含有一个或多个单位剂量的少量组合物。试剂盒的组合物进一步包括药学可接受的载体。

本发明这里的另一个特色是在植入细胞的糖尿病受体中扩增和分化干细胞形成胰岛素分泌细胞的方法，其包括在受体中植入干细胞，以及给受体施用含有有效剂量的胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT 中的每一种的组合物，只要 FACGINT 不是 EGF 受体配体。在这个方法中，例如可从人或猪中获得细胞。此外，从胰岛、脐带、胚胎、或干细胞系中获得植入的细胞。可供选择地，在细胞的糖尿病受体中扩增和分化干细胞形成胰岛素分泌细胞的方法是：在受体中植入细胞；以及给予包括有效剂量的胃泌素/CCK 受体配体、以及 FACGINT 或 EGF 受体配体中的每一种的持续释放组合物。

总的来说根据这些方法，胃泌素/CCK 受体配体是胃泌素。在相关的实施方案中，胃泌素是胃泌素-17，例如，胃泌素是人胃泌素 1-17Leu15。

此外，根据这些方法，在受体中植入细胞是使用如直接注射到器官以及静脉内给药的途径。注射细胞局部输送到器官中，例如，胰腺、肾脏、以及肝脏。此外，注射细胞经皮或穿肝输送到门静脉。在这些方法的任何一种中，可将导管插入到来自或通往器官的静脉或动脉中，在操作期间使用成像技术，如超声或 MRI。

局部输送细胞可选自几种技术，包括经内窥镜逆行胆胰管造影 (ERCP)；超声内镜引导下细针输送 (EUS-FNAD)；注射到胰动脉内；注射到门静脉内；胰内注射；以及注射到肝动脉内。在这些技术中，在操作期间使用者可通过包括超声或 MRI 的几种成像技术中的一种引导。

本发明提供的另一个特色是减少治疗人糖尿病所需移植干细胞量

的方法，该方法包括给受体施用有效剂量的胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT 中的每一种，与在缺乏给予其它相同受体有效剂量时植入细胞相比，细胞的量减少，只要 FACGINT 不是 EGF 受体配体。

在本发明的相关实施方案中，发明提供包括胃泌素/CCK 受体配体和至少一种 FACGINT 的组合物，只要 FACGINT 不是 EGF 受体配体。提供含有有效诱导胰岛前体细胞分化形成成熟胰岛素分泌细胞剂量的组合物，可进一步提供含有药学可接受载体的组合物。

提供治疗糖尿病的试剂盒，该试剂盒含有包括至少一种 FACGINT 的组合物，只要 FACGINT 不是 EGF 受体配体，以及胃泌素/CCK 受体配体、容器、和使用说明。

上述方法中的任何一种可进一步包括给受试者施用抑制免疫反应的试剂。在上述方法中的任何一种中，组合的组分可同时输送，例如，在 1 小时内或在一天内，或者可循序输送，例如，以超过一天、超过两天或者更多天、超过一周的间隔。

抑制免疫反应的示范性的试剂是药物，例如，是下组中的至少一种：雷帕霉素；皮质类固醇；硫唑嘌呤；霉酚酸酯；环孢菌素；环磷酰胺；氮甲蝶呤；6-巯基嘌呤；FK506；15-去氧精脲菌素；FTY 720；米托蒽醌；2-氨基-1,3-丙二醇；2-氨基-2-[2-(4-辛基苯基)乙基]丙烷-1,3-二醇盐酸；6-(3-二甲基-氨基丙酰)弗司扣林；以及 demethimmunomycin。

可供选择地，抑制免疫反应的示范性试剂是蛋白质，例如，该蛋白包含抗体的氨基酸序列。因此，抑制免疫反应的试剂是下列中的至少一种：hul 124；BTI-322；allotrap-HLA-B270；OKT4A；Enlimomab；ABX-CBL；OKT3；ATGAM；巴利昔单抗；达克珠单抗；即复宁（thymoglobulin）；ISAtx247；Medi-500；Medi-507；Alefcept；依利佐单抗；英夫利昔单抗；以及干扰素。循序地给予胰岛再生治疗组合物和抑制免疫反应的试剂或者可同时给药。

在某些实施方案中，全身给予胰岛再生治疗组合物和抑制免疫反应的试剂中的至少一种。例如，胰岛再生治疗组合物作为丸剂施用。因此，通过静脉内、皮下、腹膜内、或者肌肉内途径给予胰岛再生治疗组合物和抑制免疫反应的试剂中的至少一种。此外，在某些实施方案中，口服给予抑制免疫反应的试剂。通常，抑制免疫反应的试剂是

FK506、雷帕霉素、和达克珠单抗中的至少一种。此外，根据这里不同于那些要求测量某些实验参数方法中的任何一种的实施方案，受试者是人。

这里的用于治疗糖尿病受试者的试剂盒也是一种特色，试剂盒包括容器、免疫抑制剂以及包含FACGINT的INT组合物，只要FACGINT不是EGF受体配体。

这里也提供I. N. T.TM治疗组合物的持续释放的药物组合物，该组合物包括：胃泌素受体配体；和EGF受体配体或FACGINT；其中胃泌素受体配体、或者EGF受体配体或FACGINT中的至少一种是持续释放制剂。

这种组合物可进一步包括免疫抑制剂。持续释放制剂的示范性实施方案是至少一种组合物组分的聚乙二醇化，以及至少一种组分处于基于多泡脂质的脂质体中的制剂。EGF受体配体的实例是选自EGF和TGF α 。FACGINT的实例是选自下组中的至少一种：胰高血糖素样肽1受体配体；胰高血糖素样肽2受体配体；肠抑胃多肽（GIP）受体配体；角质形成细胞生长因子（KGF）受体配体；二肽基肽酶IV抑制剂；REG蛋白受体配体；生长激素受体配体；催乳素（PRL）受体配体；胰岛素样生长因子（IGF）受体配体；PTH相关蛋白（PTHrP）受体配体；肝细胞生长因子（HGF）受体配体；骨形态发生蛋白（BMP）受体配体，转化生长因子 β （TGF- β ）受体配体；层粘连蛋白受体配体；血管活性肠肽（VIP）受体配体；成纤维细胞生长因子（FGF）受体配体；角质形成细胞生长因子受体配体；神经生长因子（NGF）受体配体；胰岛再生相关蛋白（INGAP）受体配体；活化素A受体配体；血管内皮生长因子（VEGF）受体配体；红细胞生成素（EPO）受体配体；垂体腺苷酸环化酶活化多肽（PACAP）受体配体；粒细胞集落刺激因子（G-CSF）受体配体；粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）；血小板衍生生长因子（PDGF）受体配体；以及促胰液素受体配体。可供选择地，EGF受体配体是低分子量药物。组合物可被配制用于肠胃外给药。可供选择地，组合物可被配制用于口服给药。

组合物可被配制用于选自皮下、腹膜内、静脉内以及肌内注射途径给药。在一个实施方案中，胃泌素受体配体、或者EGF受体配体或FACGINT中的至少一种被配制用于全身给药。

此外，上述组合物可被配制成用于局部输送，例如，靶向胰腺的局部输送。局部输送的示范类型包括经内窥镜逆行胆胰管造影（ERCP）；超声内镜引导下细针吸引给药（EUS-FNAD）；注射到胰动脉内；注射到门静脉内；胰内注射；以及注射到肝动脉内。在操作期间，这些可结合成像技术如超声或MRI进行。

在一些实施方案中，组合物被配制成用于选自经皮和粘膜输送的给药途径。这些组合物中的任何一种可配制成用于通过机械装置输送，联合持续释放制剂，或者可供选择地使用机械装置在持续的时间输送制剂。装置是，例如，可降解的植入物；经皮贴片；导管；可植入泵；经皮泵；输液泵；以及离子电渗疗法装置。

可将上述组合物以及药物组合物配制成适于选自下列途径给药：皮下、腹膜内、静脉内以及胰内。例如，静脉内途径是注入到门静脉。可使用装置，该装置可以是泵。用持续释放制剂和用上述方法和组合物中的一些，可局部给药。例如，可通过选自下组的途径输送而局部给药：经内窥镜逆行胆胰管造影（ERCP）；超声内镜引导下细针吸引给药（EUS-FNAD）；注射到胰动脉内；注射到门静脉内；胰内注射；以及注射到肝动脉内。可供选择地用持续释放制剂和装置，可全身给药。可提供含有有效剂量的药物组合物。这里包括上述持续释放制剂中的任何一种的组合物的至少一种剂量的试剂盒也是一种特色。

减少用 I. N. T.TM 组合物治疗糖尿病受试者的频率的方法也是一种特色，该方法包括将至少一种组合物的组分制备成持续释放制剂；以及根据治疗之间的时间间隔长于未如此配制和其它方面完全相同的组合物的方案给受试者施用组合物。可通过选自下列的途径输送给药：经内窥镜逆行胆胰管造影（ERCP）；超声内镜引导下细针吸引给药（EUS-FNAD）；注射到胰动脉内；注射到门静脉内；胰内注射；或者注射到肝动脉内。在这些操作期间可使用成像技术指导导管放到适当的位置。

提高糖尿病受试者中 I. N. T.TM 组合物功效的方法也是一种特色，该方法包括：给受试者施用具有至少一种组合物的组分被配制成产生持续释放的 I. N. T.TM 组合物；比较给予该组合物量治疗受试者的功效与不具有这样配制的组分和其它方面完全相同的组合物的功效，通过测定减少或消除受试者糖尿病症状所需的持续释放配制试剂的量降

低，使得具有持续释放配制组合物的 I. N. T.TM 组合物的功效提高。在本方法的一个实施方案中，比较功效是进一步分析组合物的毒性，使得与不具有这样配制的组分和其它方面完全相同的 I. N. T.TM 组合物的毒性相比，给予组合物后较少的或较轻微的有害症状表明具有至少一种组分被配制产生持续释放的组合物的毒性降低。在这些方法中的任何一种中，组分的示范性的持续释放制剂是聚乙二醇化和基于多泡脂质的脂质体。

在这些提高 I. N. T.TM 组合物功效方法的任何一种中，具有持续释放制剂的组分是选自 EGF 和 TGF α 的 EGF 受体配体。可供选择地，在这些方法的实施方案中，FACGINT 是选自下组中的至少一种：胰高血糖素样肽 1 受体配体；胰高血糖素样肽 2 受体配体；肠抑胃多肽 (GIP) 受体；角质形成细胞生长因子 (KGF) 受体配体；二肽基肽酶 IV 抑制剂；REG 蛋白受体配体；生长激素受体配体；催乳素 (PRL) 受体配体；胰岛素样生长因子 (IGF) 受体配体；PTH 相关蛋白 (PTHrP) 受体配体；肝细胞生长因子 (HGF) 受体配体；骨形态发生蛋白 (BMP) 受体配体，转化生长因子 β (TGF- β) 受体配体；层粘连蛋白受体配体；血管活性肠肽 (VIP) 受体配体；成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体配体；角质形成细胞生长因子受体配体；神经生长因子 (NGF) 受体配体；胰岛再生相关蛋白 (INGAP) 受体配体；活化素 A 受体配体；血管内皮生长因子 (VEGF) 受体配体；红细胞生成素 (EPO) 受体配体；垂体腺苷酸环化酶活化多肽 (PACAP) 受体配体；粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 受体配体；粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)；血小板衍生生长因子 (PDGF) 受体配体；以及促胰液素受体配体。甚至进一步作为替换物，组分是低分子量药物。在这些任何一种方法中，给药是通过选自下组中的途径输送：肠胃外、口服、经皮、皮下、粘膜、腹膜内、静脉内、胰内以及肌内。

例如，给药产生局部分布。此外，该方法包括给予有效剂量的组合物。甚至进一步，该方法包括，在给药前，将组合物配制成适于使用持续释放装置。例如，该装置选自：可降解的植入物；经皮贴片；导管；可植入泵；经皮泵；输液泵；以及离子电渗疗法装置。例如，该装置是泵。在这些方法中的任何一种中，给药可以通过静脉内途径注射到门静脉内。

减少治疗糖尿病受试者的频率的方法也是一种特色，该方法包括制备通过长时间连续释放给受试者施用 I. N. T.TM 组合物的装置；向受试者提供装置；以及通过替换或重新充填装置反复治疗受试者，例如，装置是泵。泵可以是经皮泵；碳氟（flurocarbon）推进剂泵；渗透泵；微渗透泵；可植入泵；或者输液泵。可供选择地，装置选自下组：可降解的植入物；非降解的植入物；粘膜粘附植入物；经皮贴片；导管；以及离子电渗疗法装置。示范性的非降解的植入物是硅橡胶。可降解的植入物的其它实例可以是选自下组材料中的至少一种：淀粉；乙基淀粉；二丙二醇酯二丙烯酸酯（DPGDA）；三丙二醇酯二丙烯酸酯（TPGDA）；果胶；乙酰纤维素；丙酸纤维素；乙酸丁酸纤维素；乙酸丙酸纤维素（CAP）；羟丙基纤维素（HPC）；羟丙基纤维素/乙酸丙酸纤维素（HPC/CAP）；甲基丙烯酸甲酯（MMA）；甲基丙烯酸丁酯（BMA）；羟甲基丙烯酸甲酯（HEMA）；乙酸乙基己酯（EHA）；甲基丙烯酸十八酯（ODMA）；以及乙二醇二甲基丙烯酸酯（EGDMA）。

在细胞的糖尿病受体中扩增和分化干细胞形成胰岛素分泌细胞的方法也是一种特色，具有步骤：在受体中植入细胞；和给予包括有效剂量的胃泌素/CCK 受体配体；以及 FACGINT 或 EGF 受体配体中的每一种的持续释放组合物，其中在受体中扩增和分化干细胞形成胰岛素分泌细胞。

治疗糖尿病的包括胰高血糖素样肽-1（GLP-1）受体配体和胃泌素/CCK 受体配体的组合物也是一种特色。例如，GLP-1 受体配体是 GLP-1。治疗糖尿病的包括生长激素（GH）受体配体和胃泌素/CCK 受体配体的组合物也是一种特色。例如，GH 是人生长激素（HGH）。治疗糖尿病的包括催乳素（PL）受体配体和胃泌素/CCK 受体配体的组合物也是一种特色。例如，PL 是人 PL。在这些组合物的任意一种中，示范性的胃泌素是第 15 位氨基酸是亮氨酸残基的具有 17 个氨基酸的胃泌素 I。这些组合物中的任何一种可进一步具有免疫抑制剂。可将这些组合物中的任何一种进一步配制成用于持续释放。

给受试者施用包括胃泌素/CCK 受体配体和胰高血糖素样肽-1（GLP-1）受体配体组合物的治疗糖尿病受试者的方法也是一种特色。给受试者施用包括胃泌素/CCK 受体配体和生长激素（GH）受体配体的组合物的治疗糖尿病受试者的方法也是一种特色。给受试者施用包

括胃泌素/CCK 受体配体和催乳素 (PL) 受体配体的组合物的治疗糖尿病受试者的方法也是一种特色。这些方法中的任何一种可包括给予免疫抑制剂。这些方法中的任何一种可进一步包括使用持续释放装置给予受体配体或试剂中的至少一种。这些方法中的任何一种可进一步包括将受体配体或试剂中的至少一种配制成持续释放。这些方法中的任何一种可用于患 I 型糖尿病或 II 型糖尿病的糖尿病受试者。

在纯化胰岛的移植物的糖尿病受试者受体中扩大胰岛移植物的功能性 β 细胞团的方法也是一种特色，该方法给予哺乳动物有效剂量的胃泌素 CCK 受体配体和 FACGINT。

包括将胰岛制品移植到糖尿病受试者中；以及给予受试者有效剂量的胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT 的治疗人糖尿病的方法也是一种特色。因此在这种方法中，FACGINT 包括其是催乳素的催乳素受体配体。

具体实施方案的详细描述

胰岛再生治疗的组合物 (I. N. T.TM) 包括胃泌素/CCK 受体配体，以及 EGF 受体配体或补充胃泌素胰岛再生治疗因子 (FACGINT)。

通过施用 FACGINT 和胃泌素/CCK 受体配体，例如，胃泌素的组合，糖尿病的治疗产生了超过单独用任何单一组分治疗的令人惊奇水平的效力、功效和效用的增加。由于这种原因，这里使用的术语 FACGINT 意思是对胃泌素给药的“补充”。术语“补充”并不一定必须指隐含胃泌素和 FACGINT 之间的协同作用，相反该术语意思是与施用胃泌素和 FACGINT 相比，以组合中所用剂量的联合给药对于纠正糖尿病更有效。

这里使用的与特殊配体的受体有关的术语“受体配体”将意味着结合、相互作用、或刺激该受体的任何组合物或化合物。

术语“FACGINT”包括大量各种生长因子和生长激素、修饰因子激素中的一个或多个的试剂、在这些生长激素和生长因子的结合中所涉及的一个或多个受体的配体和效应器，与这些术语通常理解的含义相同，举例但不限于：PTH 相关蛋白 (PTHrP) 受体配体如 PTHrP (PTHrP; Garcia-Ocana, A.等, 2001, J. clin. Endocrin. Metab. 86:984-988); 肝细胞生长因子(HGF)受体配体如 HGF(HGF; Nielsen,

J.等, 1999, J Mol Med 77:62-66); 成纤维细胞生长因子 (FGF) 如 FGF, 角质形成细胞生长因子 (KGF) 受体配体如 KGF; 神经生长因子 (NGF) 受体配体如 NGF; 肠抑胃多肽 (GIP) 受体如 GIP; 转化生长因子 β (TGF β) 受体配体如 TGF β (2002年6月13日公开的美国专利申请 2002/0072115), 层粘连蛋白受体配体如层粘连蛋白-1; 胰岛再生相关蛋白 (INGAP) 受体配体如 INGAP; 骨形态发生因子 (BMP) 受体配体如 BMP-2; 血管活性肠肽 (VIP) 受体配体如 VIP; 胰高血糖素样肽-1 受体配体如 GLP-1 和 exendin-4, 胰高血糖素样肽 2 (GLP-2) 受体配体如 GLP-2, 以及通过完全抑制所涉及的酶, 间接影响 GLP-1 水平的二肽基肽酶 IV 抑制剂 (Hughes, T.等, 2002, Am Diabetes Assoc Abstract 272-or); REG 受体配体如 REG 蛋白; 生长激素 (GH) 受体配体如 GH, 催乳素 (PRL) 受体配体如 PRL 和胎盘催乳素 (PL); 胰岛素样生长因子 (1型和2型) 受体配体如 IGF1 和 IGF-2; 红细胞生成素 (EPO) 受体配体如 EPO ([http://www. drinet. org/html/august_2002._htm](http://www.drinet.org/html/august_2002._htm)); β 细胞素 (betacellulin) (也被认为是 EGF 家族的成员); 活化素 A 受体配体如活化素-A; 血管内皮生长因子 (VEGF) 受体配体如 VEGF; 骨形态发生因子 (BMP) 受体配体如 BMP-2; 血管活性肠肽 (VIP) 受体配体如 VIP; 血管内皮生长因子 (VEGF) 受体配体如 VEGF; 垂体腺苷酸环化酶活化多肽 (PACAP) 受体配体如 PACAP; 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 受体配体如 G-CSF; 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 受体配体如 GM-CSH; 血小板衍生生长因子 (PDGF) 受体配体如 PDGF 以及促胰液素受体配体如促胰液素。

对于这里被表示为是示范性 FACGINT 的生长因子、酶、酶抑制剂、肽、蛋白和激素化合物中的任何一种, 所有已知类似物、变体、以及衍生物, 无论天然发生的或者通过诱变或设计和合成制备的都应当被认为是等同于 FACGINT。偶联物也被认为在等同物中, 即, 通过添加一种或多种化学基团衍生的组合物, 及其混合物。可改变编码基因, 例如, 通过寡核苷酸诱变产生 FACGINT 类似物, 如人重组类似物。此外, 可通过定向诱变改变一个或多于一个氨基酸残基本身或位置。可通过偶联物增加蛋白的一级氨基酸序列, 如通过糖基化、酰化、或者通过添加任何其它补充分子, 如一个或多个脂类、磷酸盐、和/或

乙酰基。此外，可通过氧化、还原、或者其它衍生化修饰链中的单个氨基酸残基。可切割 FACGINT 获得保留活性的任何片段。FACGINT 的激动剂、前体药物或者代谢产物等同于 FACGINT。可将整个多肽或蛋白或者任何片段与任何其它肽或蛋白融合，如免疫球蛋白和其它细胞因子。性质上是蛋白质的 FACGINTs 的变体可由初级转录本的选择性剪接、蛋白水解切割或其它翻译后修饰产生，包括二聚作用、聚合作用、磷酸化、糖基化、硫酸化以及脱酰胺作用。偶联物可包括，例如，包含偶联到非天然发生的聚合物上的 FACGINT 的组合物，其中聚合物包含聚亚烷基二醇部分。该术语也包括通过化学方法修饰亲肽的一个或多个氨基酸残基获得的衍生物，例如通过烷基化、酰化、形成酯或形成酰胺。此外，诱导 FACGINT 合成或者模拟 FACGINT 作用的试剂被认为是等同化合物。单数形式的“FACGINT”可以指这里所示的示范性 FACGINTs 中的任何一种或多种化合物。

这里在术语的几个用法中，详尽说明了术语 FACGINT 不包括 EGF 受体配体，同样在上下文中也清楚。然而，EGF 受体配体如 EGF 和 TGF 能够补充胃泌素用于纠正糖尿病状态，而且因此是这里所定义的示范性 FACGINTs，作为组分包含在这里的组合物、方法和试剂盒的其它实施方案中，以前描述了包括联合胃泌素/CCK 受体配体给予 EGF 受体配体的 I. N. T. 治疗的某个实施方案（美国专利号 5,885,956 和 6,288,301），这些参考文献不使用如这里所示的某些组合和制剂中的这些试剂。

这里使用的术语“胰腺祖细胞”或者“β细胞祖先”或者“胰岛前体细胞”是能够分化形成胰腺β胰岛细胞的前体细胞，其可能有或者可能没有干细胞的能够以无限方式自我复制的特性。“β细胞再生”或者“胰岛再生”意思是通过分化形成新的β细胞，其可能有或者可能没有干细胞的能够以无限方式自我复制的特性。以“葡萄糖反应性”方式分泌胰岛素意思是根据血液中的葡萄糖浓度分泌胰岛素。在生理机能正常的哺乳动物中，随着血液葡萄糖水平的提高，胰岛的β细胞分泌胰岛素，即，对血液葡萄糖水平产生应答而诱导分泌胰岛素。

受体“激动剂”是没有限制的任何组合物，例如，在哺乳动物中内源性发现的多肽生长因子或细胞因子、或者变体或其部分，或者类似物，或者任何拟肽（peptidomimetic）或低分子量药物，其具有结合

和活化内源性发现的多肽因子的受体的能力。对于这里描述的生长因子或细胞因子中的任何一种，等同物被认为是在氨基酸序列上基本相同的物质，例如，与这里描述的天然存在的肽或蛋白有 50%序列相同、有 60%序列相同、有 70%序列相同、或者有 80%序列相同。在其它实施方案中，激动剂组合物这里包括激动剂诱导剂，其被想象为当给予动物或提供给培养物中的细胞、器官或组织时，能够增加动物、细胞、器官或组织所产生的激动剂的量的物质。例如，催乳素释放肽刺激催乳素的分泌。受体配体在定义的范围内包括受体激动剂，对任何特定 FACGINT 的受体，无论激动剂是否在结构上与 FACGINT 有关。

本发明在一个实施方案中提供通过给予包含胃泌素/CCK 受体配体，例如胃泌素，以及 FACGINT，例如 GLP-1、PRL 或 GH 两者的组合物治疗糖尿病状态如糖尿病的方法。不被任何特殊的机理所限制，以每种足以影响胰岛前体细胞分化成成熟胰岛素分泌细胞的量提供胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT。组合物中 FACGINT 和胃泌素/CCK 受体配体的每一种都可以全身或者局部给药。可供选择地，FACGINT 和胃泌素/CCK 受体配体中的一种或者两者，可被提供了含有核酸融合构建体的表达载体的细胞原位表达。融合构建体典型地包括前胃泌素原 (preprogastrin) 肽前体编码序列，以及也包括 FACGINT 的编码序列。

给予胃泌素/CCK 受体配体和 EGF 受体配体可达到延长胰岛细胞再生的功效，这样治疗的好处保持到治疗停止后很久。见 2002 年 7 月 18 日公开的 PCT 申请 PCT/US02/00685 (WO 02/055152)。治疗好处的持续时间长于给予组合物方案的持续时间。

用提供的治疗糖尿病，特别是少年发病的糖尿病的组合物和方法，以及通过治疗性给予因子的这种组合或者提供用于全身给药，或用于在胰腺内原位表达的组合物，获得残留多能胰腺导管细胞再生分化形成成熟的胰岛素分泌细胞。

消除需要细胞移植的 β 细胞置换的方法是刺激 β 细胞再生。尽管早期研究提出 β 细胞具有有限的再生能力，现在已经逐渐认识到胰腺的胰岛素分泌 β 细胞包括动态细胞群。 β 细胞团可通过现存的 β 细胞的增殖 (β 细胞复制) 而扩大。在妊娠期间，催乳素、生长激素 (Holstad, M. 等, J.Endocrinol. 163:229-234)、以及胎盘催乳素 (Nielsen, J. H., 等,

J.Mol. Med. 77:62-66,1999) 刺激 β 细胞的增殖增大细胞团。然而, 细胞团的这种扩大依赖持续的激素刺激。分娩后, 对催乳素和胎盘催乳素的降低产生应答导致扩大的细胞团减小到非妊娠水平 (Logothetopoulos, J., (Logothetopoulos, J. (1972) in Handbook of Physiology (Am. Physiol. Soc., Washington, DC), Section 7, Chapter 3, pp67-76))。

从这个生理信息知道, 在评价 β 细胞再生对给予胃泌素受体配体和 EGF 受体配体或者 FACGINT 产生应答的一个重要方面是扩大的 β 细胞团是否在用生长因子的治疗停止后可持续有效的。使用持续释放制剂, 联合 I. N. T. 组合物, 联合或不联合免疫抑制剂, 可避免需要频繁去医疗机构, 或者避免需要自我药物治疗。

根据细胞数量和细胞团的增加测量 β 细胞的再生, 导致血浆胰岛素水平或者胰腺胰岛素含量的增加。在糖尿病的治疗中功效延长是 I. N. T. 的期望结果。

本发明的一个实施方案提供使用 FACGINT 连同胃泌素/CCK 受体配体治疗糖尿病的改良的方法和组合物。本发明在一个实施方案中提供胃泌素和 FACGINT 的组合以获得比单独使用组分所获得的更高的功效、效能、以及效用, 导致组合的治疗比提高。用胃泌素和 FACGINT 组合的治疗使血液葡萄糖的减少高于单独用组分治疗后观察到的血液葡萄糖的减少, 在停止治疗后血液葡萄糖长时间持续减少。这里使用的短语“FACGINT”也可意味着“一种和多种 FACGINTs”或者“至少一种 FACGINT”。

在患轻微糖尿病的部分胰切除模型中, β 细胞刺激剂 Exendin (GLP-1 类似物) 提高葡萄糖耐受并且增加 β 细胞团 (Xu, G.等, Diabetes 48:2270-2276,1999)。然而, 没有结论性地得出提高的葡萄糖耐受和 β 细胞再生之间的因果关系。GLP-1, 如这里所示是一种示范性的 FACGINT, 当单独给予时抑制食欲以及通过降低胰岛素抵抗提高葡萄糖的清除率, 一种可能与 β 细胞刺激无关的过程。因此, 在 Exendin 治疗组中血浆胰岛素水平更低而不是更高的发现提示所观察到的葡萄糖耐受的提高不是 β 细胞刺激的结果。此外, 通过在这些研究中使用的糖尿病的胰切除模型来评价 Exendin 对 β 细胞生长影响是复杂的。由于胰腺的外科切除所致的炎症导致作用于胰岛的生长因子的表达, 如胃泌

素和 TGF α ，通过它们本身刺激胰岛再生。实际上，已经报道单纯胰切除术后 β 细胞再生增加 (Bonner-Weir, S., *Diabetes* 42:1715-1720,1993; Sharma, A., 等, *Diabetes* 48:507-513,1999)。因此，以前并不清楚在缺乏这些胰切除术诱导的生长因子时，Exendin 可刺激 β 细胞再生增加。

这里使用的术语“糖尿病”意思是在任何哺乳动物中任何显现的糖尿病症状，包括实验动物模型，以及包括人的各种类型，如 I 型和 II 型糖尿病、早期糖尿病、以及以胰岛素轻微降低或者血液葡萄糖水平轻微升高为特点的前驱糖尿病状态。“前驱糖尿病状态”描述了怀疑具有糖尿病或相关疾病的哺乳动物，例如，没有正式诊断为糖尿病，但是在胰岛素或葡萄糖水平方面表现出症状，由于家族史、遗传素质、或者 II 型糖尿病中的肥胖、或者以前患有糖尿病或相关疾病并有复发风险导致易患糖尿病或者相关疾病。

如这里使用的，术语“胃泌素/CCK 受体配体”包括任何结合、相互作用或刺激胃泌素/CCK 受体的化合物。在 2001 年 9 月 11 日发表的美国专利 6,288,301 中给出了这种胃泌素/CCK 受体配体的实例，包括胃泌素的各种形式，如胃泌素 34 (大胃泌素)、胃泌素 17 (小胃泌素)、以及胃泌素 8 (微小胃泌素)；各种形式的缩胆囊素如 CCK 58、CCK 33、CCK 22、CCK 12 和 CCK 8；以及其它胃泌素/CCK 受体配体。总的说来，胃泌素/CCK 受体配体共有羧基端氨基酸序列 Trp-Met-Asp-Phe-酰胺。也被考虑的是上述物质的活性类似物、片段和其它修饰，包括肽和非肽激动剂或者胃泌素/CCK 受体的部分激动剂，如 A71378 (Lin 等, *Am. J. Physiol.* 258 (4 Pt1) : G648, 1990)。

小型胃泌素如胃泌素 17 是通过肽合成经济地制备，合成的肽可商购。合成的人胃泌素 17，如第 15 位氨基酸是蛋氨酸或者亮氨酸的人胃泌素 17 也可从 Bachem AG, Bubendorf, Switzerland, 和从 Researchplus 获得。胃泌素/CCK 受体配体也包括上述配体的活性类似物、片段和其它修饰，其例如与内源哺乳动物胃泌素具有共同的氨基酸序列，例如具有 60% 序列相同、或者 70% 相同、或者 80% 相同。这样的配体也包括增加从组织存储部位分泌内源胃泌素、缩胆囊素或者类似活性肽的化合物。这些化合物的实例是胃泌素释放肽、抑制胃酸分泌的奥美拉唑 (omeprazole)、以及增强 CCK 刺激的大豆胰蛋白酶抑制剂。

在需要施用的个体中，治疗糖尿病的方法包括给予个体提供胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT 两者的组合物。不被任何特殊机制限制，以足以影响胰岛前体细胞分化成成熟胰岛素分泌细胞的剂量提供胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT。

这里使用的术语“治疗”或“改善”意思是减少或消除糖尿病的一个或多个症状。这里提供的治疗糖尿病的方法包括给予糖尿病哺乳动物，不受任何特殊机理限制，分化再生量的胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT，刺激胰岛再生以增加胰腺中功能葡萄糖反应性胰岛素分泌 β 细胞的数量。该方法对糖尿病，通常包括 I 型或少年型糖尿病有效。胃泌素和 FACGINT 的组合将导致胰岛再生反应显著提高，超过用单一组分所观察到的胰岛再生反应。示范性的胃泌素/CCK 受体配体是胃泌素，示范性的 FACGINTs 是 GLP-1、PRL 和 GH。

这里本发明的另一个实施方案是包括用胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT 离体处理移植的哺乳动物的胰腺组织，以及将经处理的胰腺组织输入到哺乳动物中的方法。再次在这种方法中，示范性的胃泌素/CCK 受体配体是胃泌素，示范性的 FACGINTs 是 GLP-1、PRL 和 GH。

在另一个实施方案中，本发明提供胃泌素/CCK 受体配体刺激的方法，该方法包括向胰腺细胞提供嵌合胰岛素启动子-胃泌素融合基因以及表达该基因。在另一个实施方案中，提供 FACGINT 刺激的方法，包括表达通过转基因导入哺乳动物的 FACGINT 基因，例如，编码 FACGINT 的基因，例如，GLP-1、PRL 或 GH。可类似地通过转基因提供胃泌素/CCK 受体配体基因，优选地如在美国专利号 5,885,956 中所示的人前胃泌素原肽前体基因。

如这里使用的术语哺乳动物应当无限制地包括哺乳类的任何成员，如人、无尾猿，啮齿类如小鼠或大鼠，狗、猫，农业上很重要的动物或者蛋白质猪、山羊、绵羊、马、或者无尾猿如大猩猩或黑猩猩。根据这里说明，单个哺乳动物可能是非糖尿病、糖尿病前期或者患糖尿病。

全身给药的方式包括，但不限于，经皮、鞘内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、以及口服途径。可通过任何方便的途径给予化合物，例如，通过输液或单次注射、通过经上皮或者粘膜皮肤衬（例如，口腔粘膜、直肠粘膜、阴道粘膜、鼻粘膜、以及肠粘膜，等）的

吸收，以及可与其它生物活性试剂一起给药。给药的示范性途径是全身给药，例如通过皮下注射。

这里使用的术语“催乳素”意思是如这个术语在蛋白质因子领域中公知，与内源性哺乳动物的催乳素有基本序列相似性的任何多肽，例如，人催乳素，其具有催乳素的活性。内源性人催乳素是垂体腺产生的 199 个氨基酸的多肽。该术语包括催乳素类似物，其是内源催乳素的缺失、插入、或取代突变体，并且保留活性，包括其它物种的催乳素和天然发生的变体。催乳素的功能包括如在美国专利号 6,333,031（活化氨基酸序列）和 6,413,952（复合金属的受体配体激动剂）中公开的，具有催乳素受体激动剂活性的成分，和 G120RhGH，其是起催乳素激动剂作用的人生长激素类似物（Mode 等，1966, *Endocrinol.* 137 (2):447-454），以及如在美国专利 5,506,107 和 5,837,460 中描述的催乳素受体配体。也包括催乳素相关蛋白、S179D、人催乳素和胎盘催乳素。

PRL、GH 和 PL 是多肽激素家族的成员，具有共同的结构、免疫学和生物学功能（综述见，“Pancreatic Growth and Regeneration”，Ed. N. Sarvetnick, Ch. 1. Brejcie, T.等，1997），因此这里称作 PRL/GH/PL 家族。PRL 和 GH 是通过脊椎动物的垂体前叶分泌。在包括渗透调节、生殖、哺乳、以及免疫调节的广泛的生物学功能中涉及 PRL。GH 与生长和形态发生有关的生理过程相关。相关的受体配体被称为“PRL/GH/PL”受体配体。基于肽和蛋白的结构相似性、胃泌素互补方面的功能相似性、一个或多个受体结合方面的功能相似性将 FACGINTs 分成各种不同的组，每一组都在本发明的各种实施方案的范围之内。催乳素受体配体包括 PRL 和 PL，生长激素受体配体包括 GH。

如这里使用的术语“GLP-1 受体配体”包括结合、相互作用或者刺激 GLP-1 受体的任何化合物。GLP-1 受体配体的实例包括 GLP-1 和 exendin-4。胰高血糖素样肽-1 是在肠内分泌细胞中以分子形式 GLP-1（具有常规记作 7-36 位的残基）合成的，其是一种酰胺，与 GLP-1（7-37）类似。GLP-1 生物学活性的最初研究利用 GLP-1 的全长 N-末端延长型（1-37 和 1-36，后者是一种酰胺）。较大的 GLP-1 分子通常缺乏生物学活性。后来发现除去前六个氨基酸导致具有生物学活性大

幅度增加的较短的 GLP-1 分子型。

发现循环的有生物学活性的 GLP-1 的大部分是 GLP-1 (7-36) 酰胺型,也可检测到较少量的有生物活性的 GLP-1(7-37)型。见 Orskov, C.等, *Diabetes* 1994,43:335-339。两种肽都显示大约相同量的生物学功能。GLP-1 是对营养物消化产生应答而从肠内分泌细胞中分泌的,在营养吸收后的代谢稳态中起着多种作用。通过由二肽基肽酶 (DPP-IV) 介导的在第 2 位丙氨酸残基切割造成肽的 N 末端降解,发生 GLP-1 的调节。概述,见 DPP-IV。GLP-1 的生物学活性包括刺激葡萄糖依赖性胰岛素分泌和胰岛素生物合成、抑制胰高血糖素分泌和胃排空,以及抑制食物摄入量。GLP-1 似乎在 GI 束和中枢神经系统中有许多额外效应,如在 Drucker, D., *Endocrin* 142:521-527, 2001 中的回顾。示范性的 GLP-1 组合物包括: BIM 51077 (抗 DPP-IV 消化的 GLP-1 类似物,可从 Beaufour Ipsen 获得); AC2592 (GLP-1, 从 Amylin, San Diego CA 获得); ThGLP-1 (GLP-1, 修饰的氨基酸和脂肪酸连接物,从 Theratechnologies, Saint-Laurent, Quebec, Canada 获得); CJC-1131 也被称作 DACTM: GLP-1 (基因工程改造的共价偶联到白蛋白上的 GLP-1 类似物, Conjuchem, Montreal, Quebec, Canada), LY315902 和持续释放的 LY315902 (DDP-IV 抵抗的 GLP-1 类似物,从 Eli Lilly, Indianapolis, IN 获得); 低分子量 GLP-1 模拟物; Albugon (白蛋白: GLP-1 融合肽,从 Human Genome Sciences, Rockville, MD 获得); Liraglutide 也称为 NN2211 (通过 GLP-1 分子的酰化获得的长效 GLP-1 衍生物,其一旦进入血流,将广泛结合到防止其被 DPP-IV 降解并减少肾脏清除的白蛋白上,可从 Novo Nordisk, Denmark 获得; Elbrond 等, *Diabetes Care* 2002 Aug 25 (8):1398-404)。

Exendin-4, exendin 的一个实例,是从希拉毒蜥 (*Heloderma suspectum* (Gila monster)) 毒液中获得的新肽,与 GLP-1 (7-36) 酰胺有 53% 的同源性。其功能是作为胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 受体的长效激动剂,因为它抗 DDP-IV 的降解。Exendin-4 具有类似 GLP-1 的性质,调节胃排空、胰岛素分泌、食物摄入量、以及胰高血糖素分泌。exendin-4 的实例包括 exenatide (合成型,也称作 AC2993, Amylin); exenatide LAR (长效型); ZP10 (添加 6 个赖氨酸残基的修饰的 exendin-4, Aventis/Zealand Pharma); 以及 AP10 (长效制剂,

Alkermes, Cambridge MA)。生理学研究显示在转基因哺乳动物中 exendin-4 的持续表达不扰乱葡萄糖稳态、细胞团或者食物摄入量 (Biaggio, L.等. J Biol Chem 275:34472-34477,2000), 因此没有完全理解 exendin-4 的生理学效应。

二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 抑制剂指抑制 DPP-IV 活性的化合物, 在其底物中包括 GLP-1、GLP-2 和 GIP 的 766 个氨基酸的膜相关肽酶。DPP-IV 介导的 GLP-1 的灭活是体内 GLP-1 生物活性的决定因素。DPP-IV 抑制剂的实例包括异亮氨酸四氢噻唑、缬氨酸-purrolidide、NVP-DPP738 (Novartis, Cambridge, MA)、LAF237 (Novartis)、P32/98 (Probiodrug AG, Halle, Germany)、以及 P93/01 (Probiodrug)。

如这里使用的术语“EGF 受体配体”包括刺激 EGF 受体的化合物, 使得当相同或相邻组织或者相同个体中的胃泌素/CCK 受体也被刺激时, 诱导产生胰岛素的胰岛细胞再生。这种 EGF 受体配体的实例包括全长 EGF, 其是 EGF1-53、进一步包括 EGF1-48、EGF1-49、EGF1-52, 及其片段和活性类似物。EGF 受体配体的其它实例是包括 1-48、1-47、1-51 的 TGF α 型, 双调蛋白 (amphiregulin) 和痘病毒生长因子以及证明与胃泌素/CCK 受体配体有相同协同活性的任何 EGF 受体配体。这些包括上述物质的活性类似物、片段和修饰。也见, Carpenter 和 Wahl, Chapter 4, in Peptide Growth Factors (Eds. Sporn and Roberts), Springer Verlag, 1990。

化合物组包括进一步包括“修饰 EGF”的 EGF 受体配体, 其包括正常或野生型 EGF 的变体。已经证明该修饰影响一种或多种生物学活性, 如 EGF 的清除率。该术语包括具有与人 EGF 的氨基酸序列基本相似的氨基酸序列的肽, 例如, 在各种残基位置上具有一个或几个氨基酸取代。

重组 EGF 型已经被遗传改造在结构和活性上有变化, 例如, 已经描述了具有在 21 位上用亮氨酸取代蛋氨酸的 EGF (美国专利号 4,760,023)。具有 51 个残基的重组人 EGF (hEGF), 即, 在 hEGF 的 52 位和 53 位上缺少两个 C-末端残基, 以及在 51 位上具有中性氨基酸取代, 保留 EGF 活性, 在微生物的生产过程期间和在给予受试者后更抵抗蛋白酶降解。已经描述了一系列编码与 EGF 和 TGF α 显著相似的蛋白家族的核酸分子 (WO 00/29438)。已经描述了用中性或酸性氨

基酸取代第 16 位残基组氨酸的 EGF 突变蛋白 (突变的 EGF) (WO 93/03757), 这种形式保留在低 pH 值时的活性。EGF 和 TGF α 的化学类似物和片段保留结合 EGF 受体家族各种成员的能力 (美国专利号 4,686,283)。EGF 或 TGF α 的各种修饰赋予有益性能, 影响一个或多个重组蛋白产量、体外和体内稳定性、以及体内活性。在这里的实施例中使用的示范性的重组修饰 EGF 受体配体是 51 个氨基酸长的人 EGF 的 C 末端缺失型, 在 51 位上具有天冬酰胺 (这里称作 EGF51N), 其基本上保留全部 I. N. T.TM 活性, 具有体内和/或体外稳定性, 稳定性至少大约与正常或野生型 hEGF 同样高或者比其更高 (S. Magil 等, 2003 年 5 月 15 日以 PCT/US02/33907, 这里结合其全部内容作为参考)。

这里使用的术语“生长激素”包括与内源性哺乳动物生长激素共有基本相同氨基酸序列并且具有哺乳动物生长激素生物活性的任何多肽。人生长激素是在单链中含有 191 个氨基酸以及分子量约 22 k Dal 的多肽 (Goeddel 等, 1979, Nature 281:544-548; Gray 等, 1985, Gene 39:247-254)。该术语包括具有缺失、插入或取代的类似物以及其它物种的生长激素和天然发生的变体。见 Cunningham 等, 1989, Science 243:1330-1336, 和 1989, Science 244:1081-1085; 以及 WO 90/05185, 和美国专利号 5,506,107。

如这里使用的术语“红细胞生成素”(EPO) 是任何内源性哺乳动物 EPO 或其变体, 或者 EPO 受体激动剂, 例如 EPO 模拟物 EMP1 (Johnson 等, 2000, Nephrol Dial Transpl 15:1274-1277); 或者描述的模拟物 (Wrighton 等, 1996, Science 273:458-464; 美国专利号 5,773, 569; Kaushansky, 2001, Ann NY Acad Sci 938:131-138); 具有 EPO 受体激动剂活性的抗体 (见, 例如, 美国专利号 5,885,574; WO 96/40231); 以及在美国专利号 6,333,031 和 6,413,952 中描述的氨基酸序列。

这里描述的术语“PACAP”意思是内源性产生的 PACAP 或者其类似物或变体, 其中类似物或变体具有基本相同或相似氨基酸, 或者具有 PACAP 受体激动剂如 maxadilan 的生物学活性 (Moro 等, 1997, J Biol Chem 272:966-970。有用的 PACAP 变体包括但不限于, 如美国在专利号 5,128,242; 5,198,542; 5,208,320; 和 6,242,563 中公开的 38 个氨基酸和 27 个氨基酸的变体)。

药物组合物

本发明在各种实施方案中提供包括治疗有效量的 FACGINT 和胃泌素/CCK 受体配体组合的药物组合物。可配制所有这里描述的药物组合物，含有或不含有免疫抑制剂，含有或不含有用于持续释放、局部或全身输送的组分或装置。可添加药学可接受的载体或赋形剂。这样的载体包括但不限于盐、缓冲盐、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。制剂应当适合给药方式。这里使用的术语“有效量”是足以达到公认医学终点的治疗剂或试剂组合的量，在这个实例中，公认医学终点是糖尿病症状的纠正。熟练技术人员可根据这里描述的测定相关参数的公认方法凭经验确定有效量。

这里的组合物可进一步包括湿润或乳化剂，或者 pH 缓冲剂。组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂、或者粉剂。组合物可被配制成栓剂，含有传统的粘结剂和载体如甘油三酯。口服制剂可包括标准的载体，如药学的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁，等。各种输送系统是已知的，并且可用于给予本发明的组合物，例如，包封脂质体、微粒、微胶囊等。

在示范性的实施方案中，根据常规步骤将这里的组合物配制成适于，例如，适于皮下给予人的药物组合物。典型地，皮下给药的组合物是溶于无菌等张水性缓冲液中的溶液。如果必要，组合物也可包括增溶剂以及改善注射部位疼痛的局麻药。通常，组分是独立地或者混合在一起以单位剂量形式提供，例如，在密封容器如安瓿或 sachette 中的干燥、冷冻干燥的粉末或者无水浓缩物，例如，指示活性剂的量。通过输液给予组合物时，其可用含有无菌药学的级的水、缓冲液、或者盐水的注射瓶配药。通过注射给予组合物时，可提供用于注射的无菌水或盐水的安瓿，以便给药前可将组分混合。可将这里含有其各种组分的组合物配制成栓剂，其含有约 0.5% 到约 10% 重量范围的活性组分；口服制剂优选地含有约 10% 到约 95% 重量的活性组分。

每日剂量以单一剂量给药，或者被分成许多较小的分次剂量，在一天内几次给药。

可将本发明的组合物配制成中性或者盐形式。药学可接受的盐包括与游离氨基形成的那些盐，如那些衍生于盐酸、磷酸、乙酸、酒石

酸等的盐，以及那些与游离羧基形成的盐，如那些衍生于氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙胺乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。

将在特定紊乱或病情的治疗中有效的本发明的治疗量将视紊乱或病情的性质而定，可通过标准临床技术测定。在制剂中使用的精确剂量也将视给药途径以及疾病或紊乱的严重性而定，并且应当根据医师的判断和每名受试者的情况决定。血液胰岛素或 C 肽水平，以及禁食葡萄糖水平或葡萄糖诱发水平的常规测定，是通过本领域普通技术人员来测定。可通过药理学领域普通技术人员，从来源于体外或动物模型实验系统的剂量-反应曲线推断有效剂量。给药的适当剂量范围通常是每种活性 I. N. T.TM 化合物每天每公斤体重约 0.01 微克到约 10,000 微克，例如，每天每公斤体重约 0.01 微克到约 1 微克、约 0.1 微克到约 10 微克、约 1 微克到约 500 微克、或者约 10 微克到约 10 毫克。给药的适当剂量范围因此通常是约 0.01 微克/kg 体重/天到 10 毫克/kg 体重/天。

本发明在另一个实施方案中提供包括一个或多个容器的药物包或试剂盒，其中容器填充有一个或多个本发明药物组合物的组分。在这样的包或试剂盒中可发现含有单位剂量的胃泌素/CCK 受体配体和/或一种或多种 FACGINT、或者 EGF 受体配体中的每种或两者、以及一种或多种免疫抑制剂的容器。药物包或试剂盒的这些组分中的一种或多种可被配制用于持续释放或者用于插入到持续释放装置中作为替换物，或者可被配制用于局部输送。与这些容器联合的可以是各种书面材料，如使用说明，或者以管理药品或生物产品的生产、使用或销售的政府机构所规定形式的通知，该通知反映经管理用于给予人的药物生产、使用或者销售的机构批准。在一些实施方案中试剂盒或药物包可与嵌在计算机可读格式中的软件联合。

在一个方面本发明的特点是胰岛再生治疗 (I. N. T.TM) 组合物和方法，例如，胃泌素和 FACGINT，结合免疫抑制剂，刺激体内新β细胞的生长，增加胰岛团，导致糖尿病受试者中葡萄糖耐受改善，例如，在患糖尿病的人和动物中。

胃泌素/CCK 受体配体和 EGF 受体配体或 FACGINT，可以单一联合剂量给予，或者以任何顺序分别给药。这些组合物的“有效联合剂

量”是引起禁食血液葡萄糖降低、或者胰岛素分泌细胞量增加、或者血液胰岛素水平增加、或者β细胞团增加的剂量。胃泌素/CCK受体配体，在一个实施方案中，是17个氨基酸残基长的人胃泌素、15位上的残基是亮氨酸(1-17Leu15，这里称作胃泌素17leu15)；此外，EGF受体配体是人EGF51N(S. Magil等，2003年5月12日公开的PCT/US02/33907，这里结合其全部内容作为参考)。有效剂量可包含胃泌素/CCK受体配体对EGF受体配体的比例大于1，例如，有效剂量包含胃泌素/CCK受体配体对EGF受体配体的比例大于10。给予该剂量的方便途径是全身注射，例如，用皮下单次给药。

在另一个实施方案中，给受体受试者施用抑制免疫系统的试剂。例如，该试剂是低分子量有机化合物，例如，是藤霉素、昔罗莫司，环胞菌素A、和可的松以及表1中所示其它药物中的至少一种。在供选择的实施方案中，该试剂是抗体，例如，抗体是抗-CD11a抗体和也在表1中所示的其它抗体。在另一个供选择的实施方案中，免疫抑制剂可以是免疫方案后受试者产生的抗体，例如，抗GFAP或者抗SI00β。受试者可能患糖尿病，例如，受试者是非肥胖型糖尿病小鼠(NOD小鼠)或者链脲佐菌素处理的小鼠。受试者可以是人，例如，患有I型或II型糖尿病的糖尿病受试者，或者患有前驱糖尿病状态、或者患有妊娠糖尿病、或者过去患有糖尿病，例如，在过去的妊娠中患有妊娠糖尿病。

此外，评价最近产生的β胰岛素分泌细胞或胰岛的大小和功能是测量标准生理学或诊断参数，包括：胰岛β细胞团、胰岛β细胞数量、胰岛β细胞百分率、血液葡萄糖、血清葡萄糖、血液糖基化血红蛋白、胰腺细胞团、胰腺β细胞数量、禁食血浆C肽含量、血清胰岛素、以及胰腺胰岛素含量。

由于糖尿病在某些病例中是自体免疫疾病，I. N. T.TM的实施方案是向也用一种或多种抑制免疫系统的试剂，即，免疫抑制剂治疗的受试者或受试者，全身给予治疗有效剂量的，例如，EGF和胃泌素/CCK中的每一种或者FACGINT和胃泌素/CCK中的每一种的受体配体，如胃泌素和EGF的组合或者FACGINT和胃泌素/CCK的组合。

可使用许多不同终点测定胃泌素和EGF或FACGINT的治疗，或者用胃泌素和EGF或FACGINT的组合以及免疫抑制剂的治疗是否改

善糖尿病，例如，改善胰岛移植中功能性 β 细胞团。这些包括在用 β 细胞刺激剂如葡萄糖或精氨酸注射小鼠后，测量循环的人C肽和人胰岛素的血浆水平的增高；通过增加的人胰岛素免疫反应性或者从胰岛移植中提取的mRNA水平证明的对胃泌素/EGF治疗的反应；以及通过治疗动物中胰岛的形态测量所测定的 β 细胞数量的增加。

这里使用的术语“移植”意思是通过现有技术中任何公认的方法，或者根据这里指出的方法，将细胞、组织或器官成分引入到哺乳动物体内。该成分是“移植物”，哺乳动物是受体。移植物和受体可以是同源的、同种异体、或者异种的。这里使用的术语“自体”意思是移植物来自受体的细胞、组织或者器官。

也可通过在患有链脲佐菌素(streptozotocin)诱导的或遗传性(使用称作非肥胖糖尿病或NOD的小鼠品系)糖尿病受体小鼠中，高血糖的逆转证明人胰岛 β 细胞功能增强。用胃泌素、用EGF或FACGINT和用一种或多种免疫抑制剂治疗糖尿病受体受试者后，通过撤消胰岛素之后存活率的改善，以及通过纠正由禁食血液葡萄糖水平所显示的高血糖，证明 β 细胞功能增强。此外，观察到胰腺胰岛素和血浆C肽两者都增加。

表 1.示范性的免疫抑制试剂、以及商业来源

名称	公司	性能
2-氨基-1,3-丙二醇 衍生物	Novartis	在接受器官或组织同种异体 或异体移植物的受试者中用于 预防或治疗慢性排异
2-氨基-2[2-(4-辛 基苯基)乙基]丙烷 -1,3-二醇盐酸	Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd	免疫抑制, 抑制加快的淋巴细 胞返回
40-O-(2-羟乙基) -雷帕霉素, SDZ- RAD, 依维莫司 (Everolimus) (Certican®)	Novartis Pharmaceuticals	昔罗莫司(雷帕霉素)衍生 物, 用于急性肾排异; 通过抑 制细胞增殖降低心脏移植后 的排异和移植物血管病变
6-(3-二甲基-氨基 丙酰) 弗司扣林 (forskolin)	Matsumori Akia Nippon Kayaju Co Ltd	也用于治疗自体免疫疾病的 免疫抑制作用
6-巯基嘌呤 (Purinethol®, 6-MP)	Glaxo SmithKline	用于治疗 Crohn's 病、炎性肠 病以及用于器官移植治疗
ABX-CBL (CBL- 1)	Abgenix	靶向抗人 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和单核细胞的小鼠单克 隆抗体, 用于治疗类固醇抗性 移植物对宿主疾病, 在炎性和 自身免疫紊乱治疗中的潜在 用途
Alefacept(人 LFA- 3 IgG1 融合蛋白, AMEVIVE®)	犹他大学皮肤病 系/BIOGEN	破坏致病性记忆 T-淋巴细 胞; 用于治疗牛皮癣, 一种 T- 细胞介导的炎性紊乱
HLA-B2702 肽 (Allotrap®)	SangStat Medical	人肽, 阻断 NK 细胞的作用和 T-细胞介导的毒性, 用于预防 第一次肾脏同种移植物排异

反义 ICAM-1 抑制剂 (ISIS 2302)、Enlimomab、BIRR1、Alicaforsen)	ISIS-Boehringer Ingleheim	小鼠单克隆抗体, 阻断白细胞粘附到 T-细胞表面分子 (ICAM-1r); 治疗肾移植排异
硫唑嘌呤 (Imuran®, Azasan®)	Generic, Glaxo SmithKline, Prometheus Laboratories, aaiPharma	治疗类风湿性关节炎以及预防肾移植排异, 和其它自身免疫或炎症紊乱, 如炎症肠病
BTI-322	MedImmune	靶向 CD2 受体的小鼠来源的单克隆抗体; 用于预防首次肾排异, 以及治疗抗性排异
2-氧脱氧腺苷 (Cladribine) (Leustatin®)	Boehringer Ingleheim	抗代谢物以及对淋巴细胞相对有选择的免疫抑制剂; 用于治疗淋巴系统恶性肿瘤, 例如, 毛细胞白血病
环磷酰胺 (CTX, Neosar®, Cytoxan®, Procytox®)	Generic	治疗关节炎和其它自体免疫紊乱和癌症的免疫抑制剂
环孢菌素 (cyclosporin A, cyclosporin) (Sandimmune®, Neoral®, SangCya®)	Novartis	11 个氨基酸的环肽; 阻断辅助 T 细胞, 在器官移植治疗和其它免疫疾病中使用的免疫抑制剂

Demethimmunomy cin" (L-683,742: 也被描述为 31- desmethoxy-31-羟 基-L-683,590)	Merck & Co	治疗自身免疫病, 传染病, 和 /或预防器官移植排异
地塞米松 (Decadron, Dexone, Dexasone)	Generic	肾上腺类皮质激素, 在各种紊 乱中有效的免疫抑制剂
二十二碳六烯酸 (DHA)	没有适合的公司	降低表达 CD4 或 CD8 T 细胞 的比例, 阻断抗原识别过程的 免疫抑制剂; Taku 等, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000; 48(4):1047
FTY720(口服多球 壳菌素(myriocin) 衍生物)	Novartis Pharmaceuticals	改变淋巴细胞浸润到移植组 织; 在肾移植中用于预防器官 排异
醋酸 Glatiramer (共聚物 1, Copaxone®)	Teva Pharmaceuticals	合成肽共聚物; 模拟髓磷脂结 构的诱骗, 使得免疫细胞结合 Copaxone 而不是髓磷脂; 用 于多发性硬化
胶质细胞原纤维酸 性蛋白 (GFAP)	CalBiochem; Synx Pharma	在糖尿病动物模型中具有免 疫移植活性; Winer 等, Nature Medicine 9:198 (2003)
胍立莫司 (Gusperimus), (15-脱氧精胍菌 素(15- deoxyspergualin)) (Spanidin®)	Bristol Myers- Squibb	静脉内注射的免疫抑制剂; 抑 制细胞毒性 T 细胞、嗜中性白 细胞以及巨噬细胞的产生

hul 124 (抗-CD 11 a)	XOMA	人源化的单克隆抗体; 靶向 T 细胞表面的 CD 11a 受体, 选择性地抑制移植器官的免疫系统排异
英夫利昔单抗 (Remicade®)	Centocor (强生公司的子公司)	单克隆抗体, 结合和灭活人 TNF- α 以及; 用于治疗 Crohn's 病和类风湿性关节炎
干扰素	包括 Serono, Biogen 等的各种公司	免疫调节性能
ISAtx247	Isotechnika	用于治疗自身免疫疾病如类风湿性关节炎和牛皮癣
异维 A 酸 (isotretinoin)		免疫抑制剂, 降低 T 细胞对免疫挑战产生应答而增殖的能力。Vergelli 等, Immunopharmacology, 1997,31:191.
Medi-500 (TIOB9)	MedImmune	靶向人 T 细胞的静脉内注射的单克隆抗体; 治疗急性肾排异和移植物对宿主疾病
Medi-507	MedImmune/生物移植	针对抗 CD2 T 细胞的静脉内注射的人源化抗体; 用于治疗皮质类固醇抗性移植物对宿主病以及预防肾排异
氨甲蝶呤 (Rheumatrex®, Amethopterin, Trexallo®)	Wyeth Lederle, Generic	用于治疗 Crohn's 病、严重的牛皮癣、以及成人类风湿性关节炎的抗代谢物 (以及作为抗癌药物)

米托蒽醌 (Mitoxantrone) (Novantrone®)	Immunex	对包括 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞的细胞免疫系统的抗增殖效应；用于治疗难用激素治疗的前列腺癌、急性髓性白血病和多发性硬化
霉酚酸酯 (Mycophenolate mofetil) (CellCept®)	Roche	通过阻断嘌呤核苷酸的合成引起 T 和 B 淋巴细胞的增殖；用于器官移植和炎症肠病
OKT4A	R. W. Johnson 药物研究所	靶向抗人 CD4 T 细胞的小鼠单克隆抗体；当与其它免疫抑制药物联合时，用于预防肾移植排异
Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3)	R. W. Johnson 药物研究所	结合到 T 细胞受体位点上的单克隆抗体，防止被移植组织活化
强的松龙 (Prednisolone) (Deltasone®, Oraone®)		皮质类甾醇，抑制与移植排异相关的炎症
巴利昔单抗 (basiliximab) (Simulect®)	Novartis Pharmaceuticals	结合到 T 细胞上受体位点的单克隆抗体，防止被移植组织（肾移植）活化
SIOO β	神经胶质蛋白	在糖尿病动物模型中具有免疫抑制活性
昔罗莫司、雷帕霉素 (Rapamune®)	Wyeth-Ayerst 实验室	免疫抑制剂和依赖细胞因子（例如，IL-2）的 T 细胞增殖（肾移植）的潜在抑制剂

藤霉素 (普乐可复 (Prograf); FK-506)	Fujisawa	干扰 IL-2 TCR 通讯
抗胸腺细胞免疫球蛋白 (ATGAM, Thymoglobulin®)	SangStat Medical Corporation, Pharmacia 和 Upjohn	抗人胸腺细胞免疫球蛋白; 用于急性肾移植排异的逆转以及将可能被 off-label 用于移植诱导治疗
依利佐单抗 (efalizumab) (Xanelim®)	XOMA	通过与内皮细胞表面上的粘附分子相互作用, 靶向 T 细胞的 T 细胞调节剂, 引导 T 细胞迁移进入皮肤以及引导 T 细胞的活化; 用于治疗牛皮癣
达克珠单抗 (Daclizumab) (Zenapax®)、HAT (人源化抗-Tac)、SMART 抗-Tac、抗-CD25、以及人源化抗-IL2-受体	蛋白设计实验室 /Roche	单克隆抗体, 通过结合 IL-2 受体, 抑制 IL-2 结合 IL-2 受体; 抑制 T 细胞抗同种移植 (肾移植) 活性

如这里使用的术语“免疫抑制剂”或“用于免疫抑制的试剂”意思是任何抑制免疫反应的试剂。示范性的免疫抑制剂显示在表 1 中, 那些试剂的任何衍生物或者功能等同物被认为适合这里和在权利要求中描述的本发明的实施方案。

如这里使用的, 剂量表指给予这里所提供的组合物中的任何一种的方案, 例如, 构成 L.N.T.TM 组合物的组分或者 FACGINT 和胃泌素 /CCK 受体配体的组合, 以及一种或多种免疫抑制剂, 每种含有有效剂量, 同时给药或者在彼此之间特定时间间隔内给药, 例如, 在彼此之间一天的时间间隔内, 或者作为组合制品, 或者独立地, 包括每单位

时间如每天输送的组合物的量，以及每种组合物给药的持续时间或时间周期。

绝大多数胰岛素依赖糖尿病受试者需要至少每天注射胰岛素。在某种疾病的情况或者在糖尿病管理的饮食下，需要胰岛素每日剂量的几倍，通过经常的葡萄糖监控的结果指示胰岛素给药，另一个活动需要糖尿病受试者对疾病的最佳管理，例如每日进行5次。

通过禁食血液葡萄糖水平降低，以及通过对饮食糖消耗挑战产生应答使血液葡萄糖增高的水平和持续时间降低，表明由于联合免疫抑制剂的成功的胰岛再生治疗导致糖尿病的缓解。一旦获得成功的胰岛再生，胰岛素给药减少，例如，从每天5次注射减少到2次注射；从每天2次注射减少到1次注射；以及从1次到不需要注射，根据从监控的血液葡萄糖水平中获得的数据指示。当治疗糖尿病受试者时，糖尿病领域的普通技术人员，熟知禁食后和在其它生理情况下根据血液葡萄糖水平调整胰岛素剂量。

针对在标准数据中物种与物种之间的已知差异，调整给予受试者的组合物的剂量，标准数据包括吸收、分配、循环的半衰期动力学、代谢、分泌、以及这里实施方案中的受体配体的毒理学的标准，例如，对每种灵长类和啮齿类物种。通常，将剂量调整到给予啮齿类物种的量高于给予灵长类物种量的约6倍到约100倍。

给予根据生产商提供的表1中的免疫抑制剂或者其它等同试剂，根据药理学领域中技术人员公知的方法对受试者的体重标准化。例如，通常通过注射和口服给予藤霉素，通常口服给予昔罗莫司。

受体配体组合物和免疫抑制剂的给药方式包括但不限于皮下、经皮、鞘内、肌内、腹膜内、静脉内、鼻内、以及口服途径。可通过任何常规途径给予化合物，例如，通过输液或单次注射、通过泵、通过经上皮或粘膜皮肤衬（例如，口腔粘膜、直肠和肠粘膜，等）的吸收。可联合一种或多种其它生物活性试剂给予这里的受体配体。例如，如果存在细菌感染，可给予这里的组合物和方法的接受者一种或多种抗生素，或者如果存在头痛可给予阿司匹林。优选通过全身途径给予这里的受体配体。

本发明在一个实施方案中提供通过给予持续释放制剂的组合物治疗糖尿病的方法，其中组合物包括胃泌素/CCK受体配体，例如，胃泌

素，以及 EGF 受体配体，或者 FACGINT，例如，GLP-1、GH、或催乳素，以影响胰岛前体细胞分化成成熟的胰岛素分泌细胞。可全身或局部给予组合物中的 FACGINT 和胃泌素/CCK 受体配体。

不受任何特殊机理限制，给予胃泌素/CCK 受体配体，如胃泌素，以及 EGF 受体配体或者这里所定义的 FACGINT 组中的一个或多个成员，如 GLP-1，GH，或催乳素，单独或联合免疫抑制剂后获得有效的胰岛细胞再生时间延长，根据这里所描述的方法或者通过已知的同等方法或药理学领域中普通技术人员已知的方法，将这些受体配体或者因子或试剂中的任何一种或多种配制成持续释放。

本发明在总的实施方案中提供预防或治疗糖尿病的方法，该方法包括给需要其的哺乳动物施用组合物，其中该组合物包括 EGF 受体配体或 FACGINT，如 GLP-1、exending-4、生长激素、催乳素中至少一种的持续释放制剂，联合胃泌素/CCK 受体配体，EGF 受体配体或 FACGINT 和胃泌素/CCK 受体配体中的每一种以足以增加哺乳动物中胰腺胰岛素分泌 β 细胞数量的量，因而治疗或预防糖尿病。含有 FACGINT 的持续释放制剂的治疗糖尿病受试者和受试者的组合物包括：PTH 相关蛋白 (PTHrP) 受体配体如 PTHrP (PTHrP; Garcia-Ocana, A.等, 2001, J. clin. Endocrin. Metab. 86:984-988)；肝细胞生长因子 (HGF) 受体配体如 HGF (HGF; Nielsen, J.等, 1999, J Mol Med 77:62-66)；成纤维细胞生长因子 (FGF) 如 FGF，胶质形成细胞生长因子 (KGF) 受体配体如 KGF；神经生长因子 (NGF) 受体配体如 NGF；肠抑胃肽 (GIP) 受体配体如 GIP；转化生长因子 β (TGF β) 受体配体如 TGF β (2002 年 6 月 13 日公开的美国专利申请 2002/0072115)，层粘连蛋白受体配体如层粘连蛋白-1；胰岛再生相关蛋白 (INGAP) 受体配体如 INGAP；骨形态发生因子 (BMP) 受体配体如 BMP-2；血管活性肠肽 (VIP) 受体配体如 VIP；胰高血糖素样肽 1 受体配体如 GLP-1 和 exendin-4，胰高血糖素样肽 2 (GLP-2) 受体配体如 GLP-2，以及通过抑制在其完整性中所涉及的酶间接影响 GLP-1 水平的二肽基肽酶 IV 抑制剂 (Hughes, T.deng, 2002, Am Diabetes Assoc Abstract 272-或者)；REG 受体配体如 REG 蛋白；生长激素 (GH) 受体配体如 GH，催乳素 (PRL) 受体配体如 PRL 和胎盘催乳素 (PL)；胰岛素样生长因子 (1 型和 2 型) 受体配体如 IGF1

和 IGF-2; 红细胞生成素 (EPO) 受体配体如 EPO (http://www.drinet.org/html/august_2002_.htm); β 细胞素 (也被认为是 EGF 家族的成员); 活化素 A 受体配体如活化素 A; 血管活化素 A; 血管内皮生长因子 (VEGF) 受体配体如 VEGF; 骨形态发生因子 (BMP) 受体配体如 BMP-2; 血管活性肠肽 (VIP) 受体配体如 VIP; 血管内皮生长因子 (VEGF) 受体配体如 VEGF; 垂体腺苷酸环化酶活化多肽 (PACAP) 受体配体如 PACAP; 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 受体配体如 G-CSF; 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 受体配体如 GM-CSH; 血小板衍生生长因子 (PDGF) 受体配体如 PDGF 以及肠促胰液素受体配体如肠促胰液素。这些持续释放制剂也可包括免疫抑制剂。

在一个实施方案中, 全身给予组合物的持续释放制剂。可供选择地, 局部, 或用于局部输送的装置或方法给予组合物。哺乳动物是糖尿病哺乳动物, 例如, 哺乳动物患糖尿病已经至少约为哺乳动物寿命的 1%。通常, 组合物中胃泌素/CCK 受体配体、FACGINT 或 EGF 受体配体的持续释放制剂的量基本上低于这些物质中的任何一种单独降低糖尿病哺乳动物中血液葡萄糖所需的最小有效量。以组合起来足以长时间诱导胰岛前体细胞分化形成葡萄糖应答的胰岛素分泌胰岛细胞的量提供 FACGINT 或 EGF 受体配体和胃泌素/CCK 受体配体。

本发明的另一个实施方案提供预防或治疗糖尿病的方法, 该方法包括以足以在胰腺组织中提高胰岛前体细胞增殖的量, 给需要施用的哺乳动物施用包括联合 FACGINT 或 EGF 受体配体, 以及胃泌素/CCK 受体配体的组合物的持续释放制剂, 因而治疗或预防糖尿病。

在另一个方面, 本发明提供预防或治疗糖尿病的方法, 该方法包括给需要施用的哺乳动物施用包含联合 FACGINT 或 EGF 受体配体, 以及胃泌素/CCK 受体配体的组合物的持续释放制剂, 每种以足以增加哺乳动物中胰腺胰岛素分泌 β 细胞数量的量; 以及测定胰岛再生的量, 因而治疗或预防糖尿病。与给予该组合物前测定的血液葡萄糖相比, 给予该组合物降低了血液葡萄糖, 例如, 与给予该组合物前测定的血液葡萄糖相比, 给予该组合物降低血液葡萄糖约 50%, 或者约 70%。与给予该组合物前测定的哺乳动物中糖基化血红蛋白浓度相比, 糖基化血红蛋白浓度降低。与给予该组合物前测定的哺乳动物中血清胰岛

素浓度相比，血清胰岛素浓度增加。与给予该组合物前测定的哺乳动物中胰腺胰岛素浓度相比，胰腺胰岛素浓度增加。

在另一方面，本发明提供诱导哺乳动物中胰岛再生的方法，该方法包括给哺乳动物施用包含联合 FACGINT 或 EGF 受体配体以及胃泌素/CCK 受体配体的组合物的持续释放制剂，每种以足以增加胰腺组织中胰岛前体细胞增殖的量，因而诱导胰岛再生。

在另一方面，本发明提供在哺乳动物中诱导胰岛再生的方法，该方法包括给予包含联合 FACGINT 或 EGF 受体配体以及胃泌素/CCK 受体配体的持续释放制剂的组合物，每种以足以增加哺乳动物中胰腺胰岛素分泌 β 细胞数量的量。

在另一方面，本发明的特色是包括胃泌素/CCK 受体配体，以及 FACGINT 或 EGF 受体配体的组合物，将这些试剂中的任何一种配制成持续释放制剂。该组合物含有有效诱导胰岛前体细胞增殖形成成熟胰岛素分泌细胞量增加的剂量。此外，组合物含有有效诱导胰岛前体细胞分化形成成熟胰岛素分泌细胞的量。该组合物可含有药学可接受的载体。组合物可包括抑制免疫反应的试剂。

在另一个方面，本发明提供治疗或预防糖尿病的试剂盒，含有包括胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT 或 EGF 受体配体的组合物，其中的任何一种都以持续释放制剂形式存在，容器，以及使用说明。组合物可包括免疫抑制剂。试剂盒的组合物可进一步包括药学可接受的载体。试剂盒的组合物可以单位剂量形式存在。

这里提供的本发明的另一个实施方案是扩增和分化细胞的糖尿病受体中的干细胞成为胰岛素分泌细胞的方法，包括在受体中移植细胞，以及给予含有有效剂量的胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT 或 EGF 受体配体中的每一种的组合物，其中的一种或多种以持续释放制剂形式存在。例如，移植细胞是从人获得。此外，移植细胞是从胰岛、脐带、胚胎、或者干细胞系中获得。通常，胃泌素/CCK 受体配体是人胃泌素 1-17Leu15。通常，EGF 受体配体是 EGF 或 TGF α ，或者是结构上分别与 EGF 或 TGF α 基本上相同的多肽，具有与 EGF 或 TGF α 基本上相同的生物学功能。在相关的实施方案中，通过选自下列的途径移植细胞，例如，干细胞：直接注射到器官中，以及通过静脉内给药。例如，将细胞注射到选自胰腺、肾脏、以及肝脏的器官中。可供选择

地，使用经皮或经肝途径将细胞输送到门静脉中。在另一个实例中，在移植前，可用组合物离体处理细胞。

这里提供的本发明的另一个实施方案是通过将量降低的干细胞移植到糖尿病受体中治疗人糖尿病的方法，该方法包括给受体施用有效剂量的胃泌素/CCK受体配体和 FACGINT 或 EGF 受体配体的持续释放制剂中的每一种，与在缺乏给予有效剂量时，将细胞移植到其它方面完全相同的受体相比，细胞的量减少。可进一步给予受体抑制免疫系统的试剂。例如，试剂是选自 FK506、雷帕霉素 (rapamycin)、环孢菌素以及可的松的化学药品。可供选择地，试剂是抗体，例如，抗体是抗 CD4。在所提供的涉及干细胞的任何一种方法中，移植前细胞可从家族成员中获得并贮藏用于以后使用。

本发明的实施方案提供使用与胃泌素/CCK 配体一起给予的 FACGINT 或 EGF 受体配体的改进的方法和组合物，将这些试剂中的任何一种或多种配制成持续释放，用于治疗糖尿病。本发明在一个实施方案中提供下列任何一种的持续释放制剂：胃泌素，联合 FACGINT 或 EGF 受体配体，以获得比单独用 ACGINT 或 EGF 受体配体所获得的更大的功效、效能、以及效用，或者联合所给予的这些试剂中的任何一种以提供全部制剂的直接的生物可利用率。本发明提供与直接生物可利用的制剂相比，改进的持续释放制剂的治疗比。

使用持续释放制剂可使血糖的降低持续甚至更长的时间。

在持续释放制剂中胃泌素/CCK 受体配体和 EGF 受体配体或 FACGINT 的组合，全身给药，比当以非持续释放直接制剂给药时具有更大的功效。用胃泌素/FACGINT 组合或胃泌素/EGF 受体配体组合的持续释放制剂观察到葡萄糖耐受的改善和胰腺胰岛素水平的增加。

在需要其的个体中治疗糖尿病的方法包括给个体施用组合物的持续释放制剂，其中该组合物提供了胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT，或胃泌素/CCK 受体配体和 EGF 受体配体，组合物含有足以影响胰岛前体细胞分化形成成熟胰岛素分泌细胞的剂量。分化的细胞是胰腺导管中残存的潜伏的胰岛前体细胞。治疗胰岛素依赖糖尿病，特别是 I 型或少年型糖尿病的方法，包括优选全身给予糖尿病哺乳动物分化再生量的胃泌素/CCK 受体配体和 FACGINT 或者胃泌素/CCK 受体配体和 EGF 受体配体，其中一种试剂或两种试剂都是以持

续释放制剂形式，刺激胰岛再生以增加胰腺中功能性葡萄糖反应性胰岛素分泌 β 细胞的数量。胃泌素和 FACGINT 或者 EGF 受体配体的组合，其中的任何一种是以持续释放制剂形式，将导致胰岛再生反应显著高于用相同试剂但以非持续释放直接制剂所观察到再生反应。示范性的胃泌素/CCK 受体配体是胃泌素或如这里所述的其合成的胃泌素衍生物，示范性的 FACGINTs 是 GLP-1、GH 和催乳素。示范性的 EGF 受体配体是重组人 EGF，例如，EGF51N，一种在 C 端具有缺失和 51 位是天冬酰胺的 51 个氨基酸长的人重组突变体 EGF。

可供选择地，使用经皮或经肝途径将细胞输送到门静脉中。在另一种情况下，移植前，可用组合物离体处理细胞。

持续释放制剂和局部输送以及给药的方法

将胃泌素/CCK 受体配体、或 EGF 受体配体或 FACGINT 试剂中的至少一种配制成通过持续释放或控制释放给药。这里和在权利要求中使用的“持续释放”指材料、装置、制剂、和/或给予至少一种 I. N. T.TM 治疗剂的组合，随时间对受体产生连续或不连续地，如周期性地提供一定量的组合物或者至少一种 I. N. T. 试剂，或免疫抑制剂。可持续释放的时间周期是几分钟、几小时、几天、几周、或者甚至是几个月。活性试剂的释放可以长时间不变，或者释放可以是长时间周期性释放。释放可以与病情无关，或者对反应环境中的成分或对其它外部事件产生应答可触发释放。例如，释放可被内源成分如胰岛素或葡萄糖触发，或者释放可被外部补充的成分如对给药起反应而触发。

持续释放是与非持续释放制剂相对，其中非持续释放制剂是瞬间或非常迅速地给予整个治疗试剂的剂量，或者是在给药后非常短的时间内组合物的全部都是可生物利用的，使得试剂的大部分在非常短的时间到达受体。基本上瞬间生物可利用的剂量实例包括肠胃外给药的试剂的水溶液，例如通过单次腹膜内注射，或口服，或者甚至通过静脉滴注几个小时给药。因此，心血管成像剂的静脉内给药在 15 秒内循环遍及整个动脉系统；抗肿瘤试剂的静脉滴注给药在滴注结束的几秒内是完全可生物利用的。相反，持续释放制剂通过提供长期生物利用率，以及通过避免可能由于试剂的最初的高水平所导致的潜在的副作用而有益于受体受试者。见 Mathiowitz, E., Encyclopedia of Controlled Drug Delivery. 1999. New York: John Wiley.

已经将持续释放制剂发展成提供试剂的全身以及局部（或者靶向）输送。这里回顾的各种材料、装置以及输送途径与 L.N.T.TM 试剂如胃泌素/CCK 受体配体，以及 EGF 受体配体或 FACGINT 一起使用。

已经获得了口服持续释放系统，例如，含有许多类型小丸的硬明胶胶囊，每一种类型具有不同的厚度的包衣，这样一些小丸不被包衣更迅速释放。见 Banga, A., *Bus. Brief.: Pharmatech* 2002:151-154。在口服渗透系统中，通过半渗透膜进入片剂的液体产生核心组分的渗透压，其不依赖于胃肠道中的变化。为了保护高分子试剂，例如蛋白如生长因子，方法包括使用部位特异性输送、蛋白酶抑制剂、载体系统、或者制剂如含有聚丙烯酸主链和生物粘附性能的水凝胶。

绝大多数蛋白质试剂是通过肠胃外输送，控制蛋白质肠胃外输送的方法包括使用基于乳酸的聚合物如聚（D, L-丙交酯-co-乙交酯；PLGA），其形成核心含有该试剂的生物可降解的微球体，其在超过约 1 个月的时间释放该试剂。此外，可通过共价添加聚乙二醇（PEG）使蛋白或者含有蛋白的脂质体（见下面）聚乙二醇化。

经皮输送可用于全身输送和局部输送。下述的渗透增强剂可与经皮的贴片联合使用以改善输送，或者与用于离子电渗疗法（iontophoresis）、超声波导入（phonophoresis）、机械渗透法（microporation）的装置、或者带有可穿电装置的电穿孔联合。

这里使用的术语“局部输送”指通过途径以及制剂或装置或者两者给药，使得基本上治疗特定的靶器官或组织，而其它器官和组织不被这样治疗，或者靶组织或器官的治疗范围接受比非靶组织或器官接受的剂量高至少两倍、至少 5 倍、或者至少 10 倍。这里通常，靶器官是胰腺。如这里所示，通过注射到门静脉内可向胰腺局部输送移植的细胞或多细胞移植物；可通过注射到胰动脉、肝动脉、门静脉、或者胰腺导管中输送药物。可使用不被植入的泵，即，保留外部，通过将泵连接到器官上的导管将组合物输送到靶器官如胰腺。也可能使用可植入的泵局部输送组合物。

局部输送的其它方法包括不限于经内窥镜逆行胆胰管造影（ERCP）；超声内镜引导下细针吸引活检（EUS-FNAD），其适合输送这里提供的药物组合物，而不是用于取样。见例如，Wang 等，*Transpl. Int* 1995, 8:268-272。尽管这些技术被设计成用于诊断或用于预后的目

的,可将它们修改适于输送这里的组合物,其可能是这里所描述的 I. N. T.TM组合物,与免疫抑制剂联合,以及或者作为持续释放制剂。也见, Yano 等, 1994, *Transpl Int* 7 Suppl 1:S187-193; Ricordi 等, 1994, *Transpl Proc* 26:3479; 和 Munoz-Acedo 等, 1995, *J Endocrin* 145:227-234.

使用用于给药的泵治疗几种疾病,例如,用于癌症和糖尿病,其中泵可以是可植入的或非可植入(外面)的泵。泵可以是蠕动泵、碳氟推进泵、或者包括微型渗透泵的渗透泵(Blanchard, S., 1996 *Biomedical Engineering Applications*, North Carolina State University)。蠕动泵随着驱动泵最前部的每一次电脉冲输送一系列量药。泵、电子设备和电源位于覆盖硅橡胶的钛壳中。药物贮存器是可经得起巨大压力,例如 60 psi 的硅氧烷橡胶囊。可通过聚丙烯口径皮重新注满药物贮存器。碳氟泵使用碳氟液体驱动泵。渗透泵使用渗透压以恒定速率释放药物。示范性的泵是 MiniMed MicroMed 407C 泵(Medtronic, Inc., Northridge, CA)。此外,可使用鞘内给药系统(Medtronic),其包括两个可植入的元件、一个输液泵、以及一个脊柱内导管。将泵在腹部插入到皮下囊中,而将导管插入到脊柱的鞘内间隙,在皮下做隧道,连接到泵上。然后以恒定或可变的流速给药。此外,可使用腹膜内泵,例如可植入的泵,局部,例如通过导管,或者全身输送这里的组合物。

粘膜给药到维持湿性状态并且靠近下面的脉管系统的上皮区可能比经皮穿过是干燥的表皮表面的组织效率更高。粘膜表面包括:鼻、肺、直肠、颊、眼、以及生殖器粘膜表面。示范性的粘膜表面是鼻和肺粘膜表面。

用于持续释放的微球体的材料主要是聚合物,包括 PEG,也称作聚环氧乙烷(PEO),以及所述的 PGLA。聚合物赋形剂可直接注射,允许在受试者体内逐渐水解或降解以释放治疗剂。可改变聚合物,例如,PEG 的分子量控制释放率。PEG 对蛋白治疗剂的聚乙二醇化或共价附着保护蛋白不受在清除机制中所涉及的受体的影响,如网状内皮系统(RES)的受体。或者,可使用多糖将试剂靶向 RES(1996年9月10日发表的美国专利 5,554,386)。RES 的器官包括肝、脾、以及骨髓。

均聚物或共聚物，如聚（乳酸-co-乙二醇）或者 PLA-PEG，可形成与治疗性蛋白剂混合的粘性液体。通过 PLA-PEG 的分子量改变粘度。在某种情况下，一旦注射到受试者体内，治疗剂与聚合物共沉淀，并且通过扩散丧失溶剂，这样形成具有有利的释放动力学的贮存（Whitaker, M., 等 Bus.Brief: Pharnaatech 2002:1-5）。

由将治疗剂装入胶囊的聚合微球体形成微粒。在微球体中使用的聚合物包括聚（乳酸）或者 PLA；聚（乙醇酸）或者 PGA；以及共聚物 PLA-PGA。治疗剂如本发明的蛋白的量，是以阶段释放，如与颗粒的外部非特异性结合的蛋白的初步爆发、通过扩散的随后阶段，以及通过腐蚀的最后阶段，可通过聚合物组成、分子量、微粒的大小，以及生理条件如 pH 控制。如果蛋白是以固体形式，如冷冻干燥粉末，微球体生产期间的蛋白稳定性提高，其是用溶剂或者通过冷冻喷雾方法或者超声处理方法乳化，然后在液氮中冷冻悬浮液进一步提取溶剂。微球体可从临界液体，例如，临界二氧化碳（scCO₂）中制备。

Kumar, N.等, Adv. Drug Deliv. Rev. 53 (2001) :23-44 描述了适于给药的可降解的大块聚合物以及合成方法。共聚物可以是随机的、交替的，或者块状（双聚或者三聚型），以及构型可以是线性，或者星型或嫁接（graft）（梳形）。聚合物可形成水凝胶，其是含有大量水性液体的三维亲水聚合网络。通过交联或者其它化学加合物使得水凝胶中使用的聚合物不溶解。

可从如选自下组中的至少一种材料制备生物可降解的植入物：淀粉；乙烯基淀粉；二丙二醇酯二丙烯酸酯（DPGDA）；三丙二醇酯二丙烯酸酯（TPGDA）；果胶；乙酰纤维素；丙酸纤维素；乙酸丁酸纤维素；乙酸丙酸纤维素（CAP）；羟丙基纤维素（HPC）；羟丙基纤维素/乙酸丙酸纤维素（HPC/CAP）；甲基丙烯酸甲酯（MMA）；甲基丙烯酸丁酯（BMA）；羟甲基丙烯酸甲酯（HEMA）；乙酸乙基己酯（EHA）；甲基丙烯酸十八酯（ODMA）；以及乙二醇二甲基丙烯酸酯（EGDMA）。见 Gil, M.等, Boletim de Biotecnologia 2002,72:13-19.

除了聚合物，天然存在的和合成的脂质可用于持续释放制剂。DepoFoamTM（Skye Pharma, 伦敦, 英国）形成将治疗剂装入胶囊中的基于多泡脂质的颗粒（脂质体）（见美国专利 5,993,850；和 Ye, Q. 等, 2000 J. Controlled Rel. 64:155-166）。脂质具有两亲性，带有净负

电荷，固醇，或者兼性离子脂质、以及制备脂质体的方法是非酸性的。也提供将活性治疗试剂掺入到脂质体的方法。治疗试剂可以是胃泌素/CCK受体配体、EGF受体配体和FACGINT中的一种或多种。

脂质体的其它脂质是在本发明的范围内。植物极性脂质体，例如神经酰胺如小麦神经酰胺，用于与蛋白如醇溶蛋白形成凝胶，可将其中的一种或多种治疗剂置于其中，用于经皮或经粘膜给药。见2002年6月25日发表的美国专利6,410,048。示范性的醇溶蛋白包括小麦麦胶蛋白，以及玉米醇溶蛋白。在持续释放药物制剂中使用的其它天然发生的聚合物以及装置包括胶原(EP-A-O 621 044)、壳多糖(美国专利4,393,373)，以及脱乙酰壳多糖、壳多糖的脱酰型。

渗透增强剂，例如，糖脂、非酯化脂肪酸、脂族醇、脂族醇的脂肪酸酯、环己醇、脂肪酸、甘油的酯、乙二醇、或者脂族醇酯或乙二醇，是典型的渗透增强剂，在经皮装置中可存在其它组分如稳定剂、加溶剂、表面活性剂以及成形剂。见2002年9月12日公开的美国专利申请20020127254。

使用脂质和各种类型的聚合物形成用于给药的“纳米粒”，综述见M. Kumar, 2002, J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 3:234-258。发现填充到这些颗粒中的药物最多的是最亲脂性的治疗剂。已经发现用包括聚乳酸、卵磷脂、以及磷脂酰胆碱或胆固醇的脂质体长期持久释放。

通过这里描述的方法获得局部(靶向)持续释放，例如，使用由设计靶向RES的材料，或由避免RES的细胞的不同材料构成的脂质体。另外的靶向方法包括使用抗体或结合脂质体或微球体外表面的可溶重组受体。此外，可用这里所描述的任何装置，如泵，进一步调整使用这里描述的持续释放制剂，用于向特定的靶器官局部给药。

本发明在另一个实施方案中提供包括治疗有效量的FACGINT或EGF受体配体，以及胃泌素/CCK受体配体组合的持续释放药物组合物。可添加药学可接受的载体或者赋形剂。这样的载体包括但不限于盐水、缓冲盐、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。制剂应当适合给药方式。

除非有其它定义，这里所有的技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。在本发明的实践中可使用与这里所描述的那些相似或等同的方法和材料。现在在各种实施方

案中已经全面描述了本发明，通过下列实施例和权利要求举例说明额外的实施方案，这并不打算用于解释成进一步限定。因此这里结合所有引用的参考资料的全部内容作为参考。

实施例

实施例 1. 用 GLP-1 受体配体、胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、以及胃泌素/CCK 受体配体、胃泌素的治疗，防止最近患糖尿病的 NOD 小鼠的疾病发展

非肥胖性糖尿病 (NOD) 系小鼠具有与人类 I 型糖尿病共有许多疾病发病机制特征的表型。NOD 小鼠典型地早在 4 周龄显示破坏的自身免疫的胰腺胰岛炎和 β 细胞破坏。糖尿病发病通常在这些小鼠的 10-15 周龄发生，观察到典型的血液葡萄糖水平是在约 7 mM 到约 10 mM 之间 (与正常小鼠的约 3.0-6.6 mM 的范围相比)，胰腺胰岛素水平比正常小鼠降低约 95% 以上。随着疾病的进展，NOD 小鼠显示出越来越严重的慢性糖尿病征兆，血液葡萄糖水平达到约 25 到约 30 mM 之间，胰腺胰岛素水平下降到事实上不存在。在疾病的严重阶段，超过约 99% 的 β 细胞已经被破坏。

在这个实施例中，在新近患糖尿病的 NOD 小鼠中检查用 GLP-1 和胃泌素联合治疗的效果，测定给予 GLP-1 和胃泌素是否将预防新近患糖尿病的 NOD 小鼠的严重高血糖、酮症酸中毒和死亡以及提高胰腺胰岛素含量。使用的 I. N. T.TM 组合物是胃泌素，如第 15 位氨基酸是亮氨酸的具有 17 个氨基酸残基的合成的人胃泌素 I。使用的 GLP-1 是 GLP-1，其是人/小鼠 GLP-1 的生物活性片段 (与该片段被加工的前体相比在 7-36 位置上具有残基；从 Bachem H6795 获得)。

监测 12-14 周龄，非肥胖性糖尿病 (NOD) 雌性小鼠糖尿病发病的进展 (禁食血液葡萄糖 > 8.0 到 15 mmol/l)，在发生症状后的 48 小时内，对两组小鼠中每一组进行下列治疗：一组仅用载体治疗；另一组给予 100 μ g/kg/天 GLP-1，每个治疗组通过腹腔内途径每天两次给药。

给予 14 天治疗。每周监测动物的禁食血液葡萄糖 (FBG) 水平。在撤除食物后大约 12 小时以及在上次肽或载体注射后 24 小时测量 FBG 水平。一旦治疗停止，再监测所有小鼠的 FBG 水平 4 周 (2-6 周)

以便决定治疗性处理结束后是否持续预防高血糖。治疗在第 14 天停止，在第 18 天对小鼠进行采样以获得 FBG 水平（如表 2 中所示）。

表 2. 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 和胃泌素联合疗法治疗新近患糖尿病的 NOD 小鼠

组	GLP-1	胃泌素	数量	FBG (mM) (天):			
				0	7	14	18
1	-	-	6	11.0 ± 0.6	14.8 ± 1.3	22.8 ± 1.6	24.4 ± 1.5
2	+	-	4	12.3 ± 0.9	14.1 ± 1.8	15.3 ± 2.6	15.8 ± 4.2
3	-	+	4	11.8 ± 0.9	14.8 ± 3.4	16.4 ± 3.4	19.0 ± 4.5
4	+	+	4	13.5 ± 0.9	10.4 ± 0.4	7.9 ± 0.8	7.9 ± 1.5

如上所示，通过腹腔内注射，每天 2 次给予每组 NOD 雌性小鼠 GLP-1 (100 µg/kg/天) 和胃泌素 (3 µg/kg/天)。使用 12-14 周龄，在两天内开始患糖尿病（通常认为 FBG 超过 6.5 mM）的糖尿病小鼠。

该方案包括在 6 周再次对这些小鼠进行采样用于采集数据，采集血液用于测定 FBG 和血浆 C 肽，以及处死小鼠测定胰腺胰岛素和对胰岛炎症（胰岛炎）评分。从治疗的一开始，小鼠既不接受胰岛素替代治疗也不接受免疫抑制。评定下列参数：存活率、胰腺胰岛素水平、胰岛炎症的存在以及禁食血液葡萄糖水平。

结果显示在载体治疗的对照组（组 1）的动物中，禁食血液葡萄糖（FBG）值在这种假治疗期间逐渐增加，从第 0 天的 11 mM 葡萄糖到第 18 天的 24 mM。

相反，在用 GLP-1 和胃泌素治疗的小鼠中，与载体治疗的小鼠 (24.4 mM) 相比，FBG 值 (7.9 mM 葡萄糖) 显著降低，实际上减少到小于在载体治疗小鼠中所产生水平的三分之一；表 2)。最显著和最令人惊讶地，GLP-1 和胃泌素的组合在降低 FBG 水平中比单独用胃泌素或者单独用 GLP-1 (FBG 水平分别是 19.0 mM 和 15.8 mM) 更有效。只有在用该组合治疗的小鼠中，FBG 降低到正常范围的水平。在用 GLP-1 和胃泌素治疗的小鼠中血液葡萄糖水平调节的改善被认为可能与这些小鼠的胰腺中胰岛素含量的显著增加有关。

总之，在这个研究中结果显示用 GLP-1 和胃泌素低剂量对新近患糖尿病的小鼠的短期治疗防止疾病的进展，逆转疾病状态产生约正常的血液葡萄糖水平。此外，在用胃泌素和 GLP-1 治疗的小鼠中这种血液葡萄糖水平的显著降低在治疗停止后再持续一段时期。预计在这些动物中，数据将显示胰腺胰岛素含量增加，以及显示这些影响将在治疗终止后持续很长时间。

另外组的 NOD 雌性小鼠用催乳素受体配体、催乳素 (PRL)、和胃泌素/CCK 受体配体，以及用生长激素受体配体、生长激素 (GH)，和胃泌素/CCK 受体配体、胃泌素治疗。预期数据将显示这些治疗对 FBG 和与这里用 GLP-1 治疗所获得的数据相似的其它参数产生影响。

实施例 2. 含有或不含有聚乙二醇化组合物的比较

为了测定持续释放制剂是否将提供比被配制成用于单次给药或非持续释放给药，其它方面完全相同的制剂更好的功效，进行对比用含有聚乙二醇化或者非聚乙二醇化的 I. N. T.TM 组合物治疗 NOD 小鼠方案的研究。I. N. T.TM 组合物中至少一种组分的聚乙二醇化可延长在体内保持活性形式的治疗试剂的时间。

研究显示，与配制成直接，即，非持续释放给药的 I. N. T.TM 组合物相比，给予 I. N. T.TM 组合物中至少一种试剂的持续释放制剂能够改善 NOD 小鼠的糖尿病状态。

实施例 3. 剂量组合物给药频率的比较

为了测定持续释放制剂是否将提供比非持续释放直接制剂更好的功效，设计比较每天三次与每天一次给予 NOD 小鼠 I. N. T.TM 组合物方案的实验。

结果显示，I. N. T.TM 组合物的生物可利用率延长，可与用 I. N. T.TM 组合物的持续释放制剂获得的生物可利用率相比，可提高功效，即，与 I. N. T.TM 组合物的直接或非持续释放制剂相比，可更好地纠正 NOD 小鼠的糖尿病状态的症状，以及可减少这样纠正症状所需剂量的频率。