



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101896499 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 12

(21) 申请号 200880114452. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 08. 29

C07K 14/47 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/22 (2006. 01)

60/969, 019 2007. 08. 30 US

A61K 38/26 (2006. 01)

60/979, 526 2007. 10. 12 US

60/991, 964 2007. 12. 03 US

61/031, 479 2008. 02. 26 US

(56) 对比文件

US 2007/087971 A1, 2007. 04. 19,

审查员 高超

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 04. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/074868 2008. 08. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/029847 EN 2009. 03. 05

(73) 专利权人 库尔 DM 股份有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 C·S·莱韦坦 V·M·加斯凯

(74) 专利代理机构 北京嘉和天工知识产权代理

事务所(普通合伙) 11269

代理人 甘玲

权利要求书2页 说明书47页

序列表28页 附图27页

(54) 发明名称

使用前胰岛肽及其类似物的组合物和方法

(57) 摘要

实施方案涉及表现出提高了的稳定性和效力的前胰岛肽(优选HIP)和使用所述前胰岛肽治疗与受损的胰腺功能相关联的病症(包括1型和2型糖尿病及其症状)的方法。

1. 一种前胰岛肽,所述前胰岛肽选自由经过修饰的HIP1肽、HIP2肽、HIP3肽、人类REG3A肽、人类REG3G肽、人类REG1A肽、人类REG1B肽、人类REG4肽、仓鼠INGAP肽、仓鼠REG2肽、仓鼠REG3G肽、大鼠REG1肽、大鼠PAP/REG3B肽、大鼠PAP3肽、大鼠REG3G肽、小鼠REG1肽、小鼠REG2肽、小鼠REG3A肽、小鼠REG3B肽、小鼠REG3G肽、小鼠REG3S肽、小鼠REG4肽、牛PTP肽或挪威大鼠REG3肽组成的组,其中所述修饰包括C末端酰胺基团和N末端乙酰基基团。

2. 如权利要求1所述的肽,其中所述修饰还包括C末端半胱氨酸残基。

3. 如权利要求1所述的肽,其中所述肽选自由SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成的组。

4. 一种药物组合物,所述药物组合物包括治疗有效量的如权利要求1、2或3中任一项所述的前胰岛肽。

5. 如权利要求4所述的药物组合物,其中所述治疗有效量是从0.5到5mg/kg/天。

6. 如权利要求4所述的药物组合物,其中所述治疗有效量是从60到180mg/天。

7. 如权利要求4所述的药物组合物,还包括药学上可接受的赋形剂。

8. 如权利要求1、2或3中的任一项所述的肽在制备用于刺激胰岛新生或者刺激胰岛细胞再生的药物中的应用。

9. 如权利要求1、2或3中的任一项所述的肽在制备用于在受试者中治疗与受损的胰腺功能相关联的病症的药物中的应用。

10. 如权利要求8所述的应用,其中所述肽以治疗有效量被给予。

11. 如权利要求9所述的应用,其中所述肽以治疗有效量被给予。

12. 如权利要求9所述的应用,其中所述与受损的胰腺功能相关联的病症选自1型糖尿病、2型糖尿病、成人隐匿性自身免疫性糖尿病、前驱糖尿病、空腹血糖受损、糖耐量低减、胰岛素抵抗综合症、代谢综合症/代谢紊乱综合症、超重、肥胖、高脂血症、饮食失调症、无排卵周期和多囊卵巢综合症。

13. 如权利要求12所述的应用,其中所述1型糖尿病是新发1型糖尿病。

14. 如权利要求12所述的应用,其中所述高脂血症是高甘油三脂血症。

15. 如权利要求8所述的应用,其中胰岛细胞再生试剂与所述肽一起使用。

16. 如权利要求15所述的应用,其中所述胰岛细胞再生试剂选自人类前胰岛肽、胰淀素、普兰林肽、exendin-4、GIP、GLP-1、GLP-1受体激动剂、仓鼠INGAP肽、利拉鲁肽和二肽基肽酶抑制剂。

17. 如权利要求9所述的应用,其中抑制、阻滞或破坏靶向于胰腺内分泌细胞的自身免疫细胞的试剂与所述肽一起使用。

18. 如权利要求17所述的应用,其中所述抑制、阻滞或破坏靶向于胰岛细胞的自身免疫细胞的试剂选自下述试剂中的一种或更多种:抗CD-3抗体;细胞毒性的T淋巴细胞抗原4,CLTA-4Ig;单独的或与他克莫司或者IL-2组合的西罗莫司;单独的或与普留净组合的雷帕明;热激蛋白60;利索茶碱,IBC-VSO,疫苗,干扰素 α ;包括用做保持 β 细胞功能的试剂的阿托伐他汀的二氮嗪和他汀类药物,单独的或与达利珠单抗组合的霉酚酸酯;抗CD20试剂;Campath-1H;多克隆抗T淋巴细胞球蛋白,粒细胞集落刺激因子,Neulasta,维生素D,

25-羟基维生素 D 补充物和 1, 25-羟基维生素 D 补充物二者 ;Prochymal, 和抗炎试剂。

19. 如权利要求 18 所述的应用, 其中所述抑制、阻滞或破坏靶向于胰岛细胞的自身免疫细胞的试剂选自下述试剂中的一种或更多种 :hOKT3 γ 1 (Ala-Ala); 和靶向于免疫应答且特异地阻滞 1 型糖尿病中造成 β 细胞死亡的 T 淋巴细胞的 ChAglyCD3。

20. 如权利要求 18 所述的应用, 其中所述抑制、阻滞或破坏靶向于胰岛细胞的自身免疫细胞的试剂选自下述试剂中的一种或更多种 :糖尿病抑制性树突细胞疫苗, GSK189075 ; 抗谷氨酸脱羧酶 65 疫苗 ;IBC-VSO 疫苗, 所述疫苗是旨在防止胰腺 β 细胞受损的胰岛素的合成的代谢非活性的形式 ;和使用 CD4⁺CD25⁺ 抗原特异调节性 T 细胞或者旨在抑制对郎格罕氏岛内的 β 细胞的免疫攻击而设计的任一种或多种试剂的疫苗。

21. 如权利要求 18 所述的应用, 其中所述抑制、阻滞或破坏靶向于胰岛细胞的自身免疫细胞的试剂选自下述试剂中的一种或更多种 :利妥昔单抗 ;抗炎的 Anakinra ;和去氧精胍啉, 阻滞促炎症细胞因子产生并抑制 T 细胞与 B 细胞的抗炎试剂。

使用前胰岛肽及其类似物的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用:本申请要求 2007 年 8 月 30 日递交的美国临时申请号 60/969019、2007 年 10 月 12 日递交的美国临时申请号 60/979526、2007 年 12 月 3 日递交的美国临时申请号 60/991964 和 2008 年 2 月 26 日递交的美国临时申请号 61/031479 的利益。

[0002] 政府利益:不适用

[0003] 联合研究协议的各方:不适用

[0004] 通过引用在光盘上递交的材料并入:

[0005] 不适用

[0006] 背景:不适用

[0007] 1. 领域:不适用

[0008] 2. 相关技术的说明:不适用

[0009] 简要概述

[0010] 本文所公开的实施方案提供前胰岛肽的制剂、衍生物和修饰形式及其使用方法,所述制剂、衍生物和修饰形式被设计以提高其溶解度、生物利用度和对蛋白酶切割的血清中抗性,从而改善它们作为治疗剂的有效性。

[0011] 在一个实施方案中,以 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭前胰岛肽和其衍生物。

[0012] 在一个实施方案中,以 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭 HIP 和其衍生物 (HIP3Blocked (SEQ ID NO :5)、HIP1Blocked (SEQ ID NO :6) 和 HIP2Blocked (SEQ ID NO :7))。这样的修饰形式看来使序列比较不易受血清中的由通常识别自由端的那些蛋白酶带来的蛋白酶切割的影响,从而有效地提高所述肽的 Tmax 和生物利用度。以这种方式修饰的肽表现出提高了的效力,从而在通过例如静脉内的 (IV)、肌肉内的 (IM)、皮下的或腹膜内的途径给予时需要减少的剂量。

[0013] 在另一个实施方案中,通过在所述肽的 N 末端加入半胱氨酸残基来修饰前胰岛肽和其衍生物。

[0014] 在另一个实施方案中,通过将半胱氨酸残基添加到 HIP (HIP3Cys (SEQ ID NO :8)、HIP1Cys (SEQ ID NO :9) 和 HIP2Cys (SEQ ID NO :10)) 的 C 末端来修饰 HIP 和其衍生物,结果得到能够在溶液中形成二聚物 (HIP3CysDimer (SEQ ID NO :11)、HIP1CysDimer (SEQ ID NO :12) 和 HIP2CysDimer (SEQ ID NO :13)) 的化合物。这样的修饰形式通过避开识别单体形式中的 HIP 或 HIPCys 变异体的那些蛋白酶,看上去提高了 HIPCys 变异体的稳定性。

[0015] 在另一个实施方案中,以 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭半胱氨酸前胰岛肽变异体。

[0016] 在另一个实施方案中,以 N 末端的乙酰基和 C 末端的酰胺基封闭 HIPCys 变异体 (HIP3CysBlocked (SEQ ID NO :14)、HIP1CysBlocked (SEQ ID NO :15) 和 HIP2CysBlocked (SEQ ID NO :16))。这样的修饰形式看上去使序列比较不易受血清中的由通常识别自由端的那些蛋白酶带来的蛋白酶切割的影响,结果得到能够在溶液中形成二

聚物 (HIP3CysBlockedDimer (SEQ ID NO :17)、HIP1CysBlockedDimer (SEQ ID NO :18) 和 HIP2CysBlockedDimer (SEQ ID NO :19)) 的化合物,从而通过避开那些识别单体形式中的 HIP 或 HIPCysBlocked 变异体的蛋白酶,提高 HIPCysBlocked 变异体的稳定性。

[0017] 在另一个实施方案中,通过在 C 末端的半胱氨酸残基上共价结合由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构来修饰所述半胱氨酸前胰岛肽变异体。

[0018] 在另一个实施方案中,通过在 C 末端的半胱氨酸残基上共价结合由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构来修饰 HIPCys 变异体 (HIP3CysPEG (SEQ ID NO :20)、HIP1CysPEG (SEQ ID NO :21) 和 HIP2CysPEG (SEQ ID NO :22))。这样的修饰形式看上去改善了 HIPCys 在血清中的稳定性,导致在针对体内刺激胰岛新生并且逆转糖尿病的治疗策略中, HIPCys 变异体的提高的生物利用度和定量给药效力。

[0019] 在另一个实施方案中,通过共价结合由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构来修饰所述 CysBlocked 前胰岛肽变异体。

[0020] 在另一个实施方案中,通过共价结合由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构来修饰 HIPCysBlocked 变异体 (HIP3CysBlockedPEG (SEQ ID NO :23)、HIP1CysBlockedPEG (SEQ ID NO :24) 和 HIP2CysBlockedPEG (SEQ ID NO :25))。这样的修饰形式看上去改善了 HIPCysBlocked 变异体在血清中的稳定性,导致在针对体内刺激胰岛新生并且逆转糖尿病的治疗策略中, HIPCysBlocked 变异体的提高的生物利用度和定量给药效力。

[0021] 进一步的实施方案提供给予优化的前胰岛肽化合物的方法,所述优化的前胰岛肽化合物包括单独的或与其他用于刺激胰岛细胞新生的治疗剂组合的优化的 HIP (SEQ ID NO :5-25)。在各种实施方案中,本文所公开的方法可以通过治疗有效量的单独的、与胰岛素组合的、与胰岛素和另一种试剂组合的,以及与除胰岛素外的一种或更多种试剂组合的优化的前胰岛肽的给予来实施。

[0022] 其他的实施方案提供优化的前胰岛肽化合物 (包括优化的 HIP) 的药物制剂和单位剂型。在一个实施方案中,所提供的药物制剂含有单独的或与一种或更多种其他活性药物成分 (APIs) 组合的优化的 HIP。在一个实施方案中,所述 API 为在可溶性脂质体制备剂中的一种或更多种试剂,所述可溶性脂质体制备剂允许优化的 HIP 通过多种途径被给予,包括通过皮下、肌肉内、静脉内以及甚至通过口腔,取决于所选择的剂型。在一个实施方案中,所述制剂用于一般的全身给予,但是在其他实施方案中,所述制剂包含用于对受试者内特定部位、受体、细胞、组织、器官或器官系统靶向的给予的靶向试剂。

[0023] 在其他实施方案中,所提供的是在需要这样的治疗的受试者中治疗与受损的胰腺功能相关联的病症 (pathology) 的方法。所述方法可以包括以下步骤:除所述优化的前胰岛肽化合物 (包括优化的 HIP) 之外,给予一种或更多种用于刺激胰岛细胞再生的试剂。在本实施方案的一个方面,所述试剂选自除优化的 HIP 之外的 HIP 或与 HIP 相关的肽、胰淀素 / 普兰林肽 (SYMLIN™)、exendin-4 (EXENATIDE™)、GIP、GLP-1、GLP-1 受体激动剂、GLP-1 类似物、仓鼠 INGAP 肽和相关的肽、利拉鲁肽 (NN2211) 和阻滞 GLP-1 的降解的二肽基肽酶抑制剂。

[0024] 在另一个实施方案中,提供在需要这样的治疗的受试者中的治疗与受损的胰腺功能相关联的病症的方法。所述方法可以包括以下步骤的一个或更多个:(1) 强化糖血控制;

(2) 给予口服维生素 D3(胆骨化醇)或维生素 D2(麦角骨化醇),以维持 25-羟基维生素水平在 40ng/mL 以上;(3) 给予一种或更多种用于保护新胰岛细胞形成的免疫治疗,包括给予免疫抑制试剂;(4) 给予优化的前胰岛肽化合物,包括与胰岛素组合的优化的 HIP,但是随时间推移减少胰岛素的给予;以及(5) 除给予优化的 HIP 的步骤之外,重复地给予用于保护胰岛的治疗,优选 3 到 24 个月,取决于所选择的免疫治疗。

[0025] 在另一个实施方案中,提供在需要这样的治疗的受试者中治疗与受损的胰腺功能相关联的病症的方法。所述方法可以包括以下步骤的一个或更多个:(1) 强化血糖控制;(2) 给予口服维生素 D3(胆骨化醇)以维持 25-羟基维生素水平在 40ng/mL 以上;(3) 除优化的前胰岛肽化合物(包括优化的 HIP)之外,给予用于刺激胰岛再生的试剂,包括但不限于不同于优化的 HIP 的 HIP 和 HIP 类似物;(4) 同时给予选自自由胰淀素/普兰林肽(SYMLIN™)、exendin-4(EXENATIDE™;BYETTA™)、促胃液素、上皮生长因子和上皮生长因子类似物 GIP、GLP-1、GLP-1 受体激动剂、GLP-1 类似物、INGAP、利拉鲁肽(NN2211)、和阻滞 GLP-1 的降解的二肽基肽酶抑制剂组成的组的试剂;以及(5) 减少或逐渐减少另一种糖尿病治疗的给予。

[0026] 在另一个实施方案中,提供在需要这样的治疗的受试者中治疗与受损的胰腺功能相关联的病症的方法。所述方法除给予优化的前胰岛肽化合物(包括优化的 HIP)之外还可以包括以下步骤:给予一种或更多种抑制、阻滞或破坏靶向于胰岛的自身免疫细胞的试剂。这样的治疗在上文称为“免疫治疗”。在本实施方案的各个方面,所述抑制,阻滞或破坏靶向于胰岛的自身免疫细胞的试剂选自以下单独给出或互相组合而组成的组:包括 hOKT3 γ 1(Ala-Ala) 的抗 CD-3 抗体(teplizumab);靶向于免疫应答且特异地阻滞在 1 型糖尿病中造成 B 细胞死亡的 T 淋巴细胞的 ChAglyCD3;细胞毒性的 T 淋巴细胞抗原 4, CLTA-4 Ig(阿巴西普(Abatacept));单独的或与他克莫司(FK506)或者 IL-2(雷帕鸣)组合的西罗莫司(雷帕霉素);单独的或与普留净(阿地白介素)组合的雷帕鸣;热激蛋白 60(Diaped277);抗谷氨酸脱羧酶 65(GAD65)疫苗;糖尿病抑制性树突状细胞疫苗, GSK189075,包括用做保持 β 细胞功能的阿托伐他汀的二氮嗪和他汀类药物,单独的或与达利珠单抗(Daclizumab)组合的霉酚酸酯;抗 CD20 试剂,利妥昔单抗;Campath-1H(抗 CD52 抗体),利索茶碱(lysofylline);多克隆抗 T 淋巴细胞球蛋白(ATG/Thymoglobulin),粒细胞集落刺激因子, Neulasta(聚乙二醇化非格司亭),维生素 D, 25-羟基和 1,25-羟基维生素 D 补充物二者;IBC-VSO 疫苗,所述疫苗为胰岛素的旨在防止胰腺 β 细胞受损的合成的代谢非活性形式;干扰素 α ;使用 CD4⁺CD25⁺ 抗原特异调节性 T 细胞或为抑制对郎格罕氏岛内的 β 细胞的免疫攻击而设计的任一种或多种试剂的疫苗, Prochymal(人类成年干细胞),抗炎的 Ankinra 和抗炎试剂,去氧精胍啉(Deoxyspergualin),阻滞促炎症细胞因子产生和抑制 T 细胞与 B 细胞的抗炎剂。这些或类似的试剂可以用于直接利用调节性 T 细胞或通过免疫治疗的使用的组合疗法,以阻止产生胰岛素的细胞的毁灭。

[0027] 在另一个实施方案中,提供在需要这样的治疗的受试者中治疗与受损的胰腺功能相关联的病症的方法,其中所述与受损的胰腺功能相关联的病症的至少一个症状由于优化的前胰岛肽化合物(包括优化的 HIP)的给予而被医治或减轻。在本实施方案的一个方面,所述症状选自低水平的胰岛素或胰岛素活性、胰岛素抵抗、高血糖、血红素 A1C 水平大于 6.0%、小便频繁、烦渴、善饥、不正常的体重减轻或增加、超重、加重的疲劳、易怒、视力模

糊、生殖器官瘙痒、奇怪的疼和痛、口腔干燥、皮肤干燥或瘙痒、阳痿、阴道酵母菌感染、割伤和擦伤愈合不良、过度的或不正常的感染、糖血控制损失或恶化、血糖波动、血液胰高血糖素波动、和血液甘油三酸酯波动，与高血糖一起最终导致微血管的和血管的并发症，所述并发症包括导致失明的视力症状，加速的肾损伤，所述加速肾损伤可能导致需要透析的肾衰竭和肾移植，以及导致足溃疡和截肢的神经病。此外最近的研究已证明在具有改善的糖血控制的 1 型糖尿病患者中微血管的和血管 / 心血管两者风险的降低。

[0028] 在另一个实施方案中，提供在需要这样的治疗的受试者中治疗与受损的胰腺功能相关联的病症的方法。所述与受损的胰腺功能相关联的病症为 1 型糖尿病、新发 1 型糖尿病、2 型糖尿病、成人隐匿性自身免疫性糖尿病、前驱糖尿病、空腹血糖受损、糖耐量低减、胰岛素抵抗综合症、代谢综合症 / 代谢障碍综合症、超重、肥胖症、高脂血症、高甘油三酯血症、饮食失调症、无排卵周期和多囊卵巢综合症任一。

[0029] 本公开的实施方案还提供选择性地结合于优化的前胰岛肽化合物（包括优化的 HIP）的抗体。在一个实施方案中，所述抗体为单克隆抗体。在另一个实施方案中，所述抗体为多克隆抗体。这样的抗体可以用于本文提供的诊断方法，所述方法包括在哺乳动物的血清或组织中检测优化的 HIP 水平。在一个实施方案中，所述诊断方法用于监控使用优化的 HIP 的治疗，以确保接收该治疗的患者体内达到了治疗有效水平。

[0030] 本公开的实施方案还提供用于治疗具有 1 型糖尿病或 2 型糖尿病或其他具有异常的胰岛素水平、葡萄糖代谢扰动 (perturbation) 或胰岛素抵抗的病况的患者的试剂盒，以及关于试剂盒使用的说明，所述试剂盒包括在同一包装内或分别包装的治疗有效剂量的优化的前胰岛肽化合物（包括优化的 HIP）以及可选的至少一个试剂，所述试剂用于刺激 GLP-1 受体或增强 GLP-1 水平，促进 β 细胞再生，促进提高饱腹感，促进减少食物摄入以及促进减少体重。进一步的实施方案提供用于测量样品中优化的前胰岛肽化合物（包括优化的 HIP）水平的试剂盒，所述试剂盒包括优化的前胰岛肽的抗体（包括优化的 HIP 的特异抗体）以及可选地包括优化的前胰岛肽化合物（包括优化的 HIP）以及可选地包括标记手段。

附图说明

[0031] 本专利的文件含有至少一个以彩色制作的照片或附图。根据请求以及缴纳必需的费用，专利和商标局将提供本专利的带有彩色附图或照片的副本。

[0032] 为了更全面地理解本发明的本质和优点，应该参考以下与附图相联系的详细描述，其中：

[0033] 图 1 是描绘在与具 HIP1、HIP2 和 HIP3 的人胰腺导管组织一起培养的孵育 (incubation) 之后的胰岛素水平的图。

[0034] 图 2 是描绘在用 HIP1、HIP2 和 HIP3 处理的小鼠的胰岛素需求的图。

[0035] 图 3 是描绘在用 HIP1、HIP2 和 HIP3 处理的小鼠中的葡萄糖从基线起的平均减少的图。

[0036] 图 4A 是描绘在用 HIP1、HIP2 和 HIP3 处理的小鼠中的胰岛数目的图。图 4B 提供用安慰剂和用 HIP 处理的小鼠的胰岛素免疫染色的代表性的图像，并且胰岛素着色的胰岛以黄色勾勒出轮廓，以区别这些结构和自发荧光血细胞。在所有图像中图解比例尺为 50 μ m。

[0037] 图 5 是在用 HIP 处理过的小鼠胰腺组织上的针对胰岛素的免疫荧光染色。

[0038] 图 6 是描绘大鼠中肌肉内递送的 HIP 的半衰期的图。

[0039] 图 7 是描绘皮下递送至大鼠的 HIP 的半衰期的图。

[0040] 图 8 是描绘血浆中的 HIP2 和 HIP2B 的体外稳定性随时间推移的图。

[0041] 图 9A 是展示在非还原和还原条件下响应于与各种 HIP 和优化的 HIP 的共同孵育的来自 PANC-1 细胞的人类胰岛素表达的蛋白质印迹分析 (Western Blot analysis)。图 9B 是在非还原和还原条件下响应于与各种 HIP 和优化的 HIP 的共同孵育的丽春红染色 (Ponceau Stain)。

[0042] 图 10A 展示用 HIP2 和优化的 HIP 肽处理四天的 PANC-1 细胞,以 200 倍放大的拍摄于第 7 天的图片。图 10B 展示在 7 天内 PANC-1 细胞形态变化的进程 (对照、HIP2 和 HIP2B),使用以 200 倍放大拍摄于第 1、2、3、5 和 7 天的图片。图 10C 展示用对照和优化的 HIP (HIP2 二聚物和 HIP2 PEG) 处理的 PANC-1 细胞的形态变化的进程。

[0043] 图 11 为针对 CK19 和 DAPI 的染色,以显示在 HIP2B 的给予之后在人类胰腺细胞中的细胞核和胰岛素。

[0044] 图 12 是描绘在用安慰剂和利索茶碱 (LSF)、HIP2 和 LSF、以及 HIP2B 和 LSF 处理之后的三个 NOD 小鼠葡萄糖水平的图。

[0045] 图 13 是 PANC-1 细胞在用 150 μ M HIP 和优化的 HIP 肽处理 48 小时后的 Cy3 双抗体免疫组织化学染色,证实在用 HIP 和优化的 HIP 刺激时 HIP 受体从 PANC-1 细胞的细胞膜至细胞质的迁移。

[0046] 图 14 展示了在 SFM 和 TSFM 中用 HIP 和优化的 HIP2B 肽通过曝光调整的 PANC-1 细胞。

[0047] 图 15 展示利用免疫荧光分析对优化的 HIP2 肽在 PANC-1 细胞上的影响的重复评估,分析表明 HIP2B 与 HIP 受体 (EXTL) 相互作用,导致在用 HIP 刺激时 HIP 受体从细胞质膜进入细胞质到达细胞核。

[0048] 图 16 展示优化的 HIP2B 增强了 HIP 受体 (EXTL3) 在 PANC-1 细胞中从细胞质膜向细胞核的迁移时间的蛋白质印迹。

[0049] 图 17 是描绘在 STZ-糖尿病小鼠模型中,给予 HIP2、HIP2B 和安慰剂之后的平均每日葡萄糖水平的图。

[0050] 图 18 是描绘在用 HIP2B 处理的组 (绿色) 和对照组 (紫色) 以及安慰剂组的小鼠间每日葡萄糖水平的图。

[0051] 图 19 是描绘在干预的开始和结束时在用 HIP2B (黄色)、用 HIP2 (绿色) 和用对照 (蓝色) 处理组的小鼠的间葡萄糖水平的图。

[0052] 图 20 展示优化的 HIP2B 将空腹葡萄糖水平恢复至非糖尿病范围及恢复至低于在 STZ 处理之前的基线葡萄糖水平的影响。

[0053] 图 21 展示在本研究结束时在处理组之间的葡萄糖耐量试验的结果,其中在所述优化的 HIP2B 处理组中看到较低的葡萄糖水平。

[0054] 图 22 展示当在小鼠的糖尿病模型中以不同的剂量递送时,在 STZ 引起的糖尿病小鼠中优化的 HIP2B 的剂量响应分析研究,比较优化的 HIP2B 在葡萄糖控制上的效果,以确定产生最大效力的最低潜在剂量。

[0055] 图 23 描绘了 HIP2B 的不同的浓度对糖尿病减轻的影响。

[0056] 图 24 描绘了在向斯普拉格 - 道利大鼠以 4mg/kg 经皮下和静脉内给予后, HIP2B、HIP2 和 INGAP 的药物动力学分析。

[0057] 图 25 描绘对经皮下递送的优化的 HIP2B 的药物动力学分析。

[0058] 发明的详细描述

[0059] 在描述本发明的组合物和方法之前,应当理解本发明并非限于所描述的特定的过程、组合物或方法学,因为这些可以变化。还应当理解本说明书中所用的术语仅为了描述具体的形式或实施方案的目的,而非意图限定本发明的范围,本发明的范围将仅仅由所附的权利要求来限定。除非有不同的定义,本文所用的所有的技术和科学术语都具有与本领域的一般技术人员所普遍理解的含义相同的含义。虽然任何与本文所描述的方法和材料相似或等效的方法和材料都可以用于本发明的实施方案的实践或测试,现在描述优选的方法,装置和材料。本文提到的所有出版物通过引用被整体并入本文。本文中不应被解释为由于在先发明,而使本发明无权先于这些公开。

[0060] 胰岛素从 1922 年起就已是用于治疗 1 型糖尿病和其他与胰岛素缺乏或效力减弱或产生量减低相关的病况的主要(如果不是唯一可用的)治疗。然而,施用胰岛素的糖尿病患者不具有正常的葡萄糖代谢,因为胰岛素问题仅是缺失和异常的胰腺功能的一部分。

[0061] 迄今为止,还没有已被成功用于应对 1 型糖尿病或 2 型糖尿病的基本疾病机理的单独或组合的疗法。刺激胰腺内产生胰岛素的细胞的再生的疗法的成功开发,将表明对于糖尿病患者的重大治疗突破。一些文献误导性地使用术语“胰岛细胞”(islet cell)以指代仅 β 细胞或全部胰岛。然而,区分 β 细胞和胰岛是重要的,因为一些治疗选择寻求 β 细胞数目的增加,但是除了胰岛移植外,还没有治疗可用于内源地替代整个胰岛。

[0062] 虽然经过几十年的研究,并且 1974 年出现胰岛移植,以及由针对胰岛移植的埃德蒙顿方案(Edmonton Protocol)而更新地声称成功,这些方法在美国已不是非常成功的。例如,在移植四年后,接受胰岛移植的患者中的少于 10% 保持胰岛素的自力更生。此外严重的副作用的比率为 18%。可以十分肯定,在 1 型糖尿病发作(onset)时,患者已经失去了他们的胰岛的大部分,并且他们的胰岛数目继续逐渐减少。然而,最近的研究已发现,在诊断 2 型糖尿病时,患者表现出损失了胰岛质量和数目的至少 50%。对于 1 型糖尿病患者,胰岛的数目和质量继续减少,这并非由于自身免疫性攻击,而是因为 β 细胞有效地“燃烧殆尽”。虽然这种减少在 1 型患者身上发生得更快,在 2 型患者中也以每年 10-20% 减少。

[0063] 在正常功能的胰腺中,少量的胰岛逐日自然死亡,并且根据需要被替换,以保持葡萄糖水平在控制中。被称为胰岛新生的这个再生过程以平均每月近似于 2% 的速率替换胰岛。在非糖尿病患者中,现存胰岛中 β 细胞的质量可以取决于个人的胰岛素需求而增大或减少。这个过程称为“ β 细胞增殖”,不发生在 1 型糖尿病患者中,并在 2 型患者中受到限制。

[0064] 对胰岛新生的研究并非近来开始的。1920 年,有报道称阻塞性的胰腺结石使胰腺的大部分萎缩,但是使胰岛增大。然后有人猜测,扎上(绑上)胰腺导管可能导致识别出可能能够用于治疗糖尿病的物质。外科医生扎上糖尿病儿童的胰腺导管,希望产生将形成新胰岛的物质。虽然这些手法(precedure)的积极效果短暂,它们证实了在人体内进行胰岛修复的潜在可能。

[0065] 意图为胰脏炎构建仓鼠模型的胰腺导管绑扎法研究导致形成许多新的胰岛。这个研究导致被称为胰岛新生关联肽 (Islet Neogenesis Associated Pipetide, 或 INGAP) 的仓鼠肽的分离,。在 INGAP 的临床开发中,进一步证实了新的人类胰岛能够从类似干细胞的胰岛祖细胞中分化出来,所述胰岛祖细胞甚至在 1 型糖尿病发作之后几十年仍遍布成人胰腺。

[0066] 除了使用导管绑扎法以生产新胰岛的想法外,还进行了关于在怀孕期间潜在的胰岛再生的研究。已有报道说,胰岛在胚胎形成后期被形成,并且声称胰岛群体 (population) 在出生后通过从周围的导管组织的变态过程继续生长。

[0067] 在 1 型或晚期 2 型糖尿病患者中控制他们的疾病的主要方式是通过给予胰岛素,或通过皮下注射或通过使用皮下输注泵。除了明显的生活方式的缺点之外,胰岛素疗法也与身体的正常的控制机制不相匹配,并且因此并不完全掌控 (manage) 葡萄糖波动。如邻近的图表所示,甚至控制地最好的 1 型糖尿病患者也与正常的葡萄糖代谢没有任何相似之处。这是因为胰岛素分泌仅是缺失的胰腺功能的一部分。

[0068] 研究人员已经评估了是否可以通过药物治疗刺激胰岛素的内源产生。例如,在过去的几十年间,已经研究了几种疗法,其中参与葡萄糖代谢的肽或这样的肽的类似物被给予糖尿病患者。这些疗法包括给予具有与类胰高血糖素肽 -1 (GLP-1) 的氨基酸序列相似的氨基酸序列的肽,并且这样的肽包括:GLP-1 受体类似物、Exendin-4、来源于希拉毒蜥的 Exenatide/BYETTA™、Januvia™、抑胃肽 / 葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP)、与 GLP-1 同源的化合物,例如利拉鲁肽 (NN2211)、抑制 GLP-1 分解的二肽基肽酶 -4 抑制剂、促胃液素、上皮生长因子和上皮生长因子类似物,以及来源于仓鼠的胰岛新生关联肽 (INGAP)。

[0069] 这些治疗都不能被证明在逆转糖尿病的基本机制上为有效。新胰岛的生成不仅形成产生胰岛素的 β 细胞,还形成参与葡萄糖代谢的其他细胞。因此,如果生成足够的新胰岛,患者最终能够复原糖血控制。因此,胰岛新生不仅呈现了治疗糖尿病的可能性,而且实际上呈现了逆转糖尿病的可能性。

[0070] 为使任何胰岛细胞再生试剂有效,胰腺在其生成新胰岛细胞的能力方面必须为“弹性的”。贯穿人的一生的响应于胰岛死亡或凋亡的新胰岛的生成与胰腺的弹性相关的证据已取代了长期坚持的观念,即产生胰岛素的胰岛结构的数目在出生时为固定的并且在人的一生中被保持,但是 β 细胞在现存胰岛中增殖的弹性和能力已经被充分地确定。目前被接受的是,胰岛新生从预先存在的胰腺细胞通过在胰腺的内分泌和外分泌部分都被发现的祖细胞的分化发生。数据显示,甚至在 1 型糖尿病发作后,胰岛可以被再生。

[0071] 例如,1 型糖尿病患者在怀孕期间能够具有 C-肽的正常水平。一些团队已发现,所有怀孕的 1 型患者的高达三分之一之中,在怀孕的第一个三个月期间,其 C-肽水平具有反常的升高并升高至正常的范围。C-肽的这样的升高伴随胰岛素需求的显著减少,即一些患者能够在怀孕的第一个三个月期间暂时停用胰岛素。患者中怀孕期间 C-肽的这样的升高发生于开始怀孕后 10 个星期之内,尽管在怀孕之前没有可测量的 C-肽,意味这对起作用的胰岛结构的修复。假设,发生在怀孕期间的胰岛新生的原因是内源类固醇产生的相伴随的提高和防止对胎儿的免疫攻击的免疫体系的下调,所述下调还可能在胰岛的淋巴细胞攻击的抑制上起作用。随同免疫抑制一起,还推测在怀孕期间具有母亲体内胰岛生长促进因子的上调,以补偿怀孕中母亲体内葡萄糖调定点 (setpoint) 的降低。动物模型也已证实

怀孕期间胰岛新生发生于 β 细胞扩增的发育之前,并且已证实人胰腺祖细胞分化成为胰岛。相似地,曾经为了肾移植而进行长期免疫抑制的患者已被观察到有生产胰岛素的胰岛的再生。

[0072] 在过去的十年中,已经进行临床试验来评估许多可以阻止胰腺的 β 细胞的毁灭的免疫调节物的影响。抗 CD-3 抗体,例如靶向于免疫应答并且特异地阻滞在 1 型糖尿病中引起 β 细胞死亡的 T 淋巴细胞的 hOKT3 γ 1 (Ala-Ala) 和 ChAglyCD3,已为了这个目的而被使用,如涉及以下物质的给予的治疗:西罗莫司(雷帕霉素)、他克莫司(FK506)、热激蛋白 60(DIAPEP277TM)、抗谷氨酸脱羧酶 65(GAD65) 疫苗、单独或与达利珠单抗结合使用的霉酚酸酯、抗 CD20 试剂、多克隆抗 T 淋巴细胞球蛋白(ATG)、利索茶碱、利妥昔单抗、Campath-1H(抗 CD52 抗体)、维生素 D、IBC-VSO 疫苗,所述 IBC-VSO 疫苗为胰岛素的合成的代谢非活性形式,被设计以防止胰腺 β 细胞毁灭,以及使用 CD4⁺CD25⁺ 抗原特异调节性 T 细胞的干扰素 α 接种疫苗。这些治疗方法意图直接使用或通过使用免疫治疗来利用调节性 T 细胞,以阻止产生胰岛素的细胞的毁灭。这些试验的目的是为了确定这样的试剂通过防止对胰腺的胰岛的 β 细胞的进一步免疫攻击来保持胰岛功能的能力。

[0073] 此外最近的研究已发现维生素 D 可以在防止 1 型糖尿病中发挥重要的免疫调节作用。直到 54.7% 的美国人口,无论在何纬度,具有低 25-羟基维生素 D 水平。维生素 D 缺乏已被证实不仅与 1 型糖尿病的提高的风险相关联并见于 1 型糖尿病的发作,而且还普遍见于 1 型和 2 型糖尿病两种患者中。推荐保持在 40ng/mL 以上的水平,以维持正常的免疫功能。对于高达 10,000IU/ 天的剂量,未见不利影响。

[0074] 提供以下定义以辅助读者。除非有不同的定义,本文所用的所有专业术语,符号和其他科学或医学术语或用辞都意图具有化学和医学领域的技术人员所普遍理解的含义。在一些情况下,具有普遍理解的含义的术语为了清楚和 / 或容易地参考的目的在本文中被定义,并且本文中对这样的定义包含应该不必需被解释为表明与本领域中通常理解的术语的定义有本质上的不同。

[0075] 还必须注意,如在本文和所附的权利要求中所用的,单数形式“一 (a)”,“一 (an)”和“所述 (the)”包括复数的含义,除非内容中明确地说明不是这样。所以,例如,“纤维原细胞”的含义为一个或多个纤维原细胞和本领域的技术人员所知的其等效的含义,等等。

[0076] 如本文所用,术语“约”意思是正在被使用的数的数值的正或负 10%。因此,约 50%意思是在 45% -55% 范围内。如本文所用,“前胰岛肽”是指刺激胰岛细胞新生的蛋白质或衍生自这样的蛋白质的肽,包括但不限于人类 REG3A (SEQ ID NO :1)、人类 REG3G (SEQ IDNO :28)、人类 REG1A、人类 REG1B、人类 REG4、仓鼠 INGAP (SEQ ID NO :27)、仓鼠 REG2、仓鼠 REG3G、大鼠 REG1、大鼠 PAP/REG3B、大鼠 PAP3、大鼠 REG3G、小鼠 REG1、小鼠 REG2、小鼠 REG3A、小鼠 REG3B、小鼠 REG3G、小鼠 REG3S、小鼠 REG4、牛 PTP、黑猩猩、牛、狗、羊和这样的蛋白质的类似蛋白和同源蛋白,以及衍生自这样的蛋白质或其同源蛋白的肽段。这样的前胰岛肽的蛋白质序列为公众可用的。前胰岛肽还包括含有 HIP2 的活性的十四个氨基酸序列(或每个同源蛋白的相应序列)(见下表 1),并且是少于 150 个氨基酸、少于 125 个氨基酸、少于 100 个氨基酸、少于 75 个氨基酸、少于 50 个氨基酸或少于 25 个氨基酸的 REG3A、INGAP 或同源蛋白的片段的肽。这样的肽(提供活性的十四个氨基酸序列)的例子包括但不限于以下:

[0077]

表 1

人类 REG3A

黑猩猩

仓鼠

INGAP

小鼠 REG3A

挪威大鼠

REG3

牛

狗

绵羊

人类 REG1A

人类

REG1B

大鼠

REG1

小鼠

REG1

小鼠

REG2

仓鼠

REG2

大鼠

REG3

	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	SEQ ID NO: 4
	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 60
	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	SEQ ID NO: 61
	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 62
	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 63
	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	SEQ ID NO: 64
	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	SEQ ID NO: 65
	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	SEQ ID NO: 66
	I	G	L	H	D	P	K	K	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 67
	I	G	L	H	D	P	K	K	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 68
	I	G	L	H	D	P	K	N	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 69
	T	G	L	H	D	P	K	R	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 70
	T	G	L	H	D	P	K	S	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 71
	I	G	L	H	D	P	K	N	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 72
	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 73

[0078]

大鼠 PAP/REG3B	I	G	L	H	D	P	T	L	G	G	E	P	N	G	SEQ ID NO: 74
大鼠 PAP3	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	R	SEQ ID NO: 75
小鼠 REG3A	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 76
小鼠 REG3B	I	G	L	H	D	P	T	L	G	A	E	P	N	G	SEQ ID NO: 77
小鼠 REG3G	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Y	E	P	N	R	SEQ ID NO: 78
大鼠 REG3G	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	R	SEQ ID NO: 79
仓鼠 REG3G	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	G	SEQ ID NO: 80
人类 REG3G	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 81
小鼠 REG3S	I	G	L	H	D	L	S	L	G	S	L	P	N	E	SEQ ID NO: 82
牛 PTP	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	A	N	A	SEQ ID NO: 83
仓鼠 INGAP	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	SEQ ID NO: 84
人类 REG4	I	G	L	H	D	P	Q	K	R	Q	Q	W	Q	W	SEQ ID NO: 85
小鼠 REG4	I	G	L	H	D	P	Q	K	K	Q	L	W	Q	W	SEQ ID NO: 86
黑猩猩	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 87
牛	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	SEQ ID NO: 88
狗	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	SEQ ID NO: 89
绵羊	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	SEQ ID NO: 90

[0079] 这样的肽段包括但不限于 HIP1、HIP2、HIP3、INGAP 肽 (SEQ ID NO:26) 和其同源物,如以下识别的。在人体内已发现与大鼠基因相似的人类基因,被称为 Reg 基因,并且根据该基因在人类中发现 HIP,以及人类和其他哺乳动物的物种的前胰岛肽的种类之间的高度的相似性。以下物种相似性图表显示与 HIP 相关的序列在进化过程中被精密地保持。有可能的是,这些序列的每个都将对人类有一些效力,但是没有任何一个与人类的 HIP 活性序列精确地匹配。

[0080] 物种同源性

[0081]

人类 REG3A	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	E	SEQ ID NO: 30
黑猩猩	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	G	SEQ ID NO: 31
仓鼠 INGAP	W	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	S	SEQ ID NO: 32
小鼠 REG3A	W	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	SEQ ID NO: 33
挪威大鼠 REG3	W	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	SEQ ID NO: 34
牛	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	G	SEQ ID NO: 35
狗	W	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	D	SEQ ID NO: 36
羊	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	G	SEQ ID NO: 37

[0082] 上面的表格将含有所述十四个氨基酸的 HIP2 序列的人类肽的十六氨基酸延长物 (stretch) 与其他物种的进行比较。

[0083]

人类 REG3A	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	SEQ ID NO: 3
黑猩猩	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 38
仓鼠 INGAP	W	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	SEQ ID NO: 39
小鼠 REG3A	W	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 40
挪威大鼠 REG3	W	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 41
牛	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	SEQ ID NO: 42
狗	W	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	SEQ ID NO: 43
绵羊	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	SEQ ID NO: 44
人类 REG3A	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	SEQ ID NO: 4	
黑猩猩	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 45	
仓鼠 INGAP	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	SEQ ID NO: 46	
小鼠 REG3A	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 47	
挪威大鼠 REG3	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 48	

[0084]

牛	I G L H D P T	E	G	S	E	P	D	A	SEQ ID NO: 49
狗	M G L H D P T	E	G	Y	E	P	N	A	SEQ ID NO: 50
绵羊	I G L H D P T	E	G	S	E	P	N	A	SEQ ID NO: 51
人类REG3A	I G L H D P T	Q	G	T	E	P	N	G	SEQ ID NO: 2
黑猩猩	I G L H D P T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 52
仓鼠INGAP	I G L H D P S	H	G	T	L	P	N	G	SEQ ID NO: 27
小鼠REG3A	I G L H D P T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 53
挪威大鼠REG3	I W L H D P T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 54
牛	I G L H D P T	E		S	E	P	D	A	SEQ ID NO: 55
狗	M G L H D P T	E	G	Y	E	P	N	A	SEQ ID NO: 56
绵羊	I G L H D P T	E	G	S	E	P	N	A	SEQ ID NO: 57

[0085] 如本文所用,“优化的前胰岛肽”是指前胰岛肽的变体,包括但不限于人类 REG3A、人类 REG3G、人类 REG1A、人类 REG1B、人类 REG4、仓鼠 INGAP、仓鼠 REG2、仓鼠 REG3G、大鼠 REG1、大鼠 PAP/REG3B、大鼠 PAP3、大鼠 REG3G、小鼠 REG1、小鼠 REG2、小鼠 REG3A、小鼠 REG3B、小鼠 REG3G、小鼠 REG3S、小鼠 REG4、牛 PTP、黑猩猩、牛、狗、绵羊和这样的蛋白质的类似物和同源物,以及衍生自这样的蛋白质或其同源物,HIP1、HIP2 和 / 或 HIP3 的肽片段,或这样的肽 (SEQ ID NOs :31-90) 的同源物,其中所述肽已被修饰以提高这样的肽的稳定性,溶解度或生物利用度,如在各个实施方案中所描述的。为了本公开的目的,稳定性是指所述肽对被血清中的蛋白酶降解的抵抗性,所述蛋白酶靶向且降解非优化的前胰岛肽、REG3A、REG3G、INGAP、REG3G 肽、INGAP 肽、HIP1、HIP2 和 / 或 HIP3 或这样的肽的同源物。同样,为了本公开的目的,生物利用度是指针对体内治疗应用可利用的肽的量,所述体内治疗应用是由靶细胞、通路和 / 或基于所述肽避免被蛋白酶降解的能力的系统机制,以及其他降解非优化的前胰岛肽,人类 REG3A,人类 REG3G,人类 REG1A,人类 REG1B,人类 REG4,仓鼠 INGAP,仓鼠 REG2,仓鼠 REG3G,大鼠 REG1,大鼠 PAP/REG3B,大鼠 PAP3,大鼠 REG3G,小鼠 REG1,小鼠 REG2,小鼠 REG3A,小鼠 REG3B,小鼠 REG3G,小鼠 REG3S,小鼠 REG4,牛 PTP,黑猩猩,牛,狗,绵羊和这样的蛋白质的类似物和同源物,HIP1,HIP2 和 / 或 HIP3 或这样的肽的同源物的系统通路的应用。优选地,优化的前胰岛肽是指通过添加 C 末端的酰胺基团和 N 末端的乙酰基团、PEG 化和其组合被封闭的 REG3G 肽、INGAP 肽、HIP3、HIP1 和 / 或 HIP2 或同源物。

[0086] 如本文所用,“优化的 HIP”是指 HIP、HIP1 和 / 或 HIP2 的变体,其中所述肽已被修饰以增加 HIP、HIP1 或 HIP2 的稳定性、溶解度或生物利用度,如本文的实施方案所描述的。为了本公开的目的,稳定性是指所述肽对被血清中的靶向于且降解非优化的 HIP3、HIP1 和

/或HIP2的蛋白酶的降解的抗性。同样,为了本公开的目的,生物利用度是指针对体内治疗应用可利用的肽的量,所述体内治疗应用是由靶细胞、通路和/或基于所述肽避免被蛋白酶降解的能力的系统机制,以及其他降解非优化的HIP3、HIP1和/或HIP2的系统通路的应用。优选地,优化的HIP是指通过添加C末端的酰胺基团和N末端的乙酰基基团、PEG化和其组合被封闭的HIP3、HIP1和/或HIP2。

[0087] 如本文所用,“治疗”病况或患者是指采取步骤以获得有益的或期望的结果,包括临床结果。为了本公开的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于糖尿病的一种或更多种症状的缓解或改进、疾病的程度的削弱、疾病的进程的延迟或减慢、病情的改进、缓和或稳定化,以及以下描述的其他有益的结果。糖尿病的症状包括低的或不足的胰岛素水平或胰岛素活性、小便频繁、烦渴、善饥、不正常的体重减轻、加重的疲劳、易怒、视力模糊、生殖器官瘙痒、奇怪的疼和痛、口腔干燥、皮肤干燥或瘙痒、阳痿、阴道酵母菌感染、割伤和擦伤愈合不良、过度的或不正常的感染、高血糖、糖血控制损失、餐后血糖波动、血液胰高血糖素波动、血液甘油三酸酯波动。糖尿病可以通过本领域的一般技术人员所周知的方法被诊断。例如,普遍地,糖尿病具有大于126mg/dL葡萄糖的血浆血糖结果。前驱糖尿病,也可以使用本文所公开的组合物和方法治疗,普遍地在具有在100和125mg/dL葡萄糖之间的血糖水平的患者中被诊断。其他症状也可以用于诊断糖尿病、相关的疾病和病况,以及受减弱的胰腺功能影响的疾病和病况。

[0088] 如本文所用,一个症状或更多个症状的“减少”(以及与本短语在语法上等价的表述)意思是降低所述一个症状或更多个症状的严重度或频率的,或所述一个症状或更多个症状的消除。

[0089] 术语“抑制”包括给予本公开的化合物,以防止所述症状的发作,缓解所述症状,或消除所述疾病、病况或失调。

[0090] 如本文所用,“与受损的胰腺功能相关联的病况”是这样的病况,其中所述病况与受试者中针对所述受试者产生和/或分泌激素和/或细胞因子的胰腺的削弱的能力相关联。优选地,该激素或细胞因子为胰岛素。与受损的胰腺功能相关联的病况包括1型糖尿病、新发1型糖尿病、2型糖尿病、成人隐匿性自身免疫性糖尿病、前驱糖尿病、空腹血糖受损、糖耐量低减、胰岛素抵抗综合症、代谢综合症、超重、肥胖症、高脂血症、高甘油三酯血症、饮食失调症和多囊卵巢综合症。

[0091] 如本文所用,向受试者“给予”药物或治疗或者药物或治疗的“给予”(以及与本短语在语法上等价的表述)包括直接给予(包括直接向作为靶的组织中或上的自给予,或向受试者给予治疗,由此所述治疗积极地影响靶组织),以及间接给予(包括开出药物的处方的行为)二者。例如,如本文所用,指导患者进行自给予药物和/或提供患者药物处方的医师是正在将药物给予患者。

[0092] 如本文所用,“受试者”或“患者”为哺乳动物,典型地为人类,但是可选地为有兽医学上重要性的哺乳类动物,包括但不限于马、牛、绵羊、狗和猫。

[0093] 如本文所用,疾病的“体现”是指患有所述疾病的受试者的症状、征兆、解剖学状态(例如胰岛细胞的缺失)、生理学状态(例如葡萄糖水平)、或报告(例如甘油三酸酯水平)特征。

[0094] 如本文所用,药物或试剂的“治疗有效量”为,当药物或试剂被给予具有疾病或病

况的受试者时,将具有所意图的治疗效果(例如受试者中的疾病或病况的一种或更多种体现的缓解、改善、缓和/或消除)的药物或试剂的量。完全的治疗效果不一定通过一个剂量的给予发生,而是可能仅在一系列剂量的给予之后才发生。所以,治疗有效量可以在一次或更多次给予中被给予。

[0095] 如本文所用,药物的“预防有效量”为,当被给予受试者时,将具有所意图的预防效果,例如,防止或延迟疾病或症状的发作(或重复发作),或减少疾病或症状发作(或重复发作)的可能性的药物的量。完全的预防效果不一定通过一个剂量的给予发生,而是可能仅在一系列剂量的给予之后才发生。所以,预防有效量可以在一次或更多次给予中被给予。

[0096] “药学上可接受的”的意思是载体、稀释剂或赋形剂必须与所述制剂的其他成分配伍并且不对它们的接收者有害。

[0097] 如本文所用,“TID”、“QD”和“QHS”分别具有它们的平常含义“每天3次”、“每天1次”和“睡前1次”。

[0098] 试剂给予的“与……组合”包括平行给予(在一段时间内将两种试剂共同给予患者,例如,在一个月內交替的日给予单克隆抗体和肽激素,例如肠促胰岛素激素或类似物)、共同给予(其中所述试剂在大致相同的时间被给予,例如,彼此相隔约几分钟至几小时)、和共同制剂(其中所述试剂被组合或复合成为适合于通过口服,皮下或非肠道给予的单个剂型)。

[0099] “DPP-4 抑制剂”为二肽基肽酶-4 抑制剂。

[0100] “仓鼠 INGAP”为非人类胰岛新生关联肽,具有序列 Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser (SEQ ID NO :26)。这个肽为具有序列 Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser (SEQ ID NO :27) 的仓鼠 INGAP 蛋白质的片段。

[0101] “GIP”为抑胃肽,还被称为葡萄糖依赖性促胰岛素多肽。

[0102] “GLP-1”为高血糖素样肽-1。

[0103] “HIP3” (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu) (SEQ IDNO :2) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽。HIP3 具有约 1564.6 的分子量。

[0104] “HIP1” (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly) (SEQ ID NO :3) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽。

[0105] “HIP2” (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly) (SEQ ID NO :4) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽。HIP2 具有约 1435.5 的分子量。

[0106] HIP3Blocked 或 HIP3B (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-NH₂) (SEQ IDNO :5) 为提纯形式、合成形式或重组形式的由 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的人类前胰岛肽。HIPB 具有约 1605.7 的分子量。

[0107] HIP1Blocked (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-NH₂) (SEQ ID NO :6) 为提纯形式、合成形式或重组形式的由 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的人类前胰岛肽。

[0108] HIP2Blocked 或 HIP2B (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pr

o-Asn-Gly-NH₂) (SEQ ID NO :7) 为提纯形式、合成形式或重组形式的由 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的人类前胰岛肽。HIP2B 具有约 1476.6 的分子量。

[0109] INGAP PeptideBlocked 或 INGAPB 为提纯形式、合成形式或重组形式的由 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的 INGAP 肽。

[0110] HIP3Cys (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys) (SEQ ID NO :8) 为提纯形式、合成形式或重组形式的具有附加的 C 末端半胱氨酸残基的人类前胰岛肽。

[0111] HIP1Cys (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys) (SEQ ID NO :9) 为提纯形式、合成形式或重组形式的具有附加的 C 末端半胱氨酸残基的人类前胰岛肽。

[0112] HIP2Cys (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys) (SEQ ID NO :10) 为提纯形式、合成形式或重组形式的具有附加的 C 末端半胱氨酸残基的人类前胰岛肽。

[0113] INGAP PeptideCys 或 INGAPCys 为提纯形式、合成形式或重组形式的具有附加的 C 末端半胱氨酸残基的 INGAP 肽。

[0114] HIP3CysDimer (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys)₂ (SEQ ID NO :11) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽二聚物, 其中每个单体已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基。所述二聚物通过在各个单体的半胱氨酸残基之间创建 (create) 二硫键而形成。

[0115] HIP1CysDimer (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys)₂ (SEQ ID NO :12) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽二聚物, 其中每个单体已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基。所述二聚物通过在各个单体的半胱氨酸残基之间创建二硫键而形成。

[0116] HIP2CysDimer (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys)₂ (SEQ ID NO :13) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽二聚物, 其中每个单体被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基。所述二聚物通过在各个单体的半胱氨酸残基之间创建二硫键而形成。HIP2 具有约 1435.5 的分子量。

[0117] INGAPCysDimer 为提纯形式、合成形式或重组形式的 INGAP 肽二聚物, 其中每个单体已被修饰以含有 N 末端半胱氨酸残基。

[0118] HIP3CysBlocked (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys-NH₂) (SEQ ID NO :14) 为提纯形式、合成形式或重组形式的已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基并且被 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的人类前胰岛肽。

[0119] HIP1CysBlocked (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂) (SEQ ID NO :15) 为提纯形式、合成形式或重组形式的已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基并且被 C 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的人类前胰岛肽。

[0120] HIP2CysBlocked (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂) (SEQ ID NO :16) 为提纯形式、合成形式或重组形式的已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基并且被 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的人类前胰岛肽。

[0121] INGAPCysBlocked 为提纯形式、合成形式或重组形式的已被修饰以含有 C 末端半

胱氨酸残基并且被 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的 INGAP 肽。

[0122] HIP3CysBlockedDimer (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys-NH₂)₂ (SEQ ID NO :17) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽二聚物,其中每个单体已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基并且被 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭。所述二聚物通过在各个单体的半胱氨酸残基之间创建二硫键而形成。

[0123] HIP1CysBlockedDimer (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂)₂ (SEQ ID NO :18) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽二聚物,其中每个单体已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基并且被 C 末端乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭。所述二聚物通过在各个单体的半胱氨酸残基之间创建二硫键而形成。

[0124] HIP2CysBlockedDimer 或 HIP2B Cys 二聚物 (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH₂)₂ (SEQ ID NO :19) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽二聚物,其中每个单体已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基并且被 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭。所述二聚物通过在各个单体的半胱氨酸残基之间创建二硫键而形成。HIP2B Cys 二聚物具有约 3157.5 的分子量。

[0125] INGAPCysBlocked 二聚物为提纯形式、合成形式或重组形式的 INGAP 肽二聚物,其中每个单体已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基并且被 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭。所述二聚物通过在各个单体的半胱氨酸残基之间创建二硫键而形成。

[0126] HIP3CysPEG (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys (PEG)) (SEQ ID NO :20) 为提纯形式、合成形式或重组形式的已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基的人类前胰岛肽,所述 C 末端半胱氨酸残基已被共价结合于由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构。

[0127] HIP1CysPEG

[0128] (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys (PEG)) (SEQ ID NO :21) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽,其已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基,所述 C 末端半胱氨酸残基已被共价结合于由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构。

[0129] HIP2CysPEG (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys (PEG)) (SEQ ID NO :22) 为提纯形式、合成形式或重组形式的人类前胰岛肽,其已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基,所述 C 末端半胱氨酸残基已被共价结合于由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构。

[0130] INGAPCysPEG 为提纯形式、合成形式或重组形式的 INGAP 肽,其已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基,所述 C 末端半胱氨酸残基已被共价结合于由二聚马来酰亚胺活化的 40KdPEG 结构。

[0131] HIP3CysBlockedPEG (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys (PEG)-NH₂) (SEQ ID NO :23) 为提纯形式、合成形式或重组形式的由 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的人类前胰岛肽,其已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基,所述 C 末端半胱氨酸残基已被共价结合于由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结

构。

[0132] HIP1CysBlockedPEG (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys (PEG)-NH₂) (SEQ ID NO :24) 为提纯形式、合成形式或重组形式的由 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的人类前胰岛肽,其已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基,所述 C 末端半胱氨酸残基已被共价结合于由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构。

[0133] HIP2CysBlockedPEG 或 HIP2B Cys-PEG (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys (PEG)-NH₂) (SEQ ID NO :25) 为提纯形式、合成形式或重组形式的由 N 末端的乙酰基基团和 C 末端的酰胺基团封闭的人类前胰岛肽,其已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基,所述 C 末端半胱氨酸残基已被共价结合于由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构。HIP2B Cys (PEG) 具有约 44,782 的分子量。

[0134] INGAPCysBlocked PEG 是提纯形式、合成形式或重组形式的由 C 末端的乙酰基基团和 N 末端的酰胺基团封闭的 INGAP 肽,其已被修饰以含有 C 末端半胱氨酸残基,所述 C 末端半胱氨酸残基已被共价结合于由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构。

[0135] REG3G 为衍生自人类再生胰岛的蛋白质 3 γ 前体,其具有序列 MLPPMALPSVSWLLSCLILLCQVQGEETQKELSPRISCPKGSKAYGSPCYALFLSPKSWMDADLACQKRPSGKLVSVLSGAEGSFVSSLVRSISNSYSYIWIWGLHDPTQGSEPDGDGWEWSSTDVMNYFAWEKNPSTILNPGHCGSLSRSTGFLKWKDYNCDAKLPYVCKFKD (SEQ ID NO :28)。REG3G 肽为衍生自人类再生胰岛的蛋白质 3 γ 前体肽,所述蛋白质 3 γ 前体肽衍生自具有序列 IGLHDPTQGSEPDG (SEQ ID NO :29) 的 REG3G。其他 REG3G 肽为 WIGLHDPTQGSEPDG (SEQ ID NO :58) 和 IGLHDPTQGSEPDGD (SEQ ID NO :59)。

[0136] 本公开的实施方案为优化前胰岛肽 (包括 HIP) 的稳定性和溶解性用以作为治疗剂的改进的使用提供详细的策略。HIP 为衍生自人类蛋白质再生胰岛的 3 α 蛋白质 (REG3A) (NM_138937.1) 的肽片段,也被称为与胰腺炎相关联的蛋白质前体 (NP-002571),位于第 2 条染色体,位置 (location) 2p12,定位 (position) 79240075 (SEQ ID NO :1)。HIP3、HIP1 和 HIP2 诱导或刺激从处于胰腺中的祖细胞的胰岛新生。根据本公开的方法使用的这些新生剂结果得到前胰岛肽 (包括 HIP) 的优化的形式,所述优化的形式当用作治疗剂以治疗疾病时表现出提高了的体内稳定性,溶解性和效力。这些疾病包括但不限于糖尿病 (1 型糖尿病)、2 型糖尿病 (非胰岛素依赖型糖尿病和需要胰岛素的成人始发糖尿病,幼年时期和青春期的糖尿病) 和成人隐匿性自身免疫糖尿病 (LADA)。

[0137] 本公开的实施方案还提供药物组合物和治疗,用于使用这样的组合物治疗胰腺官能障碍,包括 1 型和 2 型糖尿病。在一个实施方案中,这些组合物包含优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP)。在另一个实施方案中,这些组合物包括优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP) 和其他影响葡萄糖代谢的试剂。包括在这些其他试剂中是在胰腺胰岛新生中所涉及到的试剂和抑制、阻滞或破坏靶向于胰岛细胞的自身免疫细胞的试剂。在一个实施方案中,本文所公开的治疗通过向需要这样的治疗的哺乳动物给予治疗有效剂量的优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP) 被实践。在另一个实施方案中,本文所公开的治疗通过与影响葡萄糖代谢的另一种试剂 (例如激素或化合物) 组合,向需要这样的治疗的哺乳动物给予治疗有效剂量的优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP) 而被实践,所述影响葡萄糖代谢的另一种试剂包括但不限于在 β 细胞再生,饱足感和胃排空中所涉及到的激素或化合物,例如 GLP-1、GIP、

GLP-1 受体类似物、GLP-1 类似物和防止 GLP-1 毁灭 (destruction) 的二肽基肽酶 -4 抑制剂, 以及抑制、阻滞或破坏靶向于胰腺细胞的自身免疫细胞的试剂。在上述的后一个实施方案中, 所述优化的 HIP 和其他试剂可以被分别给予或可以首先被掺合以提供联合组合物并且同时被给予。

[0138] NOD 小鼠中的基因表达的微阵列分析已显示 Reg 基因特别在胰岛新生中的上调。此外, 已知在胚胎发育晚期, Reg 基因出现上调以占据 (populate) 发育中的人的胰腺, 以在产后保持其本身的葡萄糖代谢。已显示胚胎组织和非内分泌胰腺上皮细胞 (NEPECs) 的共同移植导致了来自 NEPEC 群体的对新胰岛结构的刺激。Reg 在所共同移植的胚胎材料中的上调可能是针对这种效果的刺激。

[0139] 体内研究已显示当被引入糖尿病小鼠时, HIP1、HIP2 和 HIP3 刺激胰腺中的祖细胞分化为新胰岛结构。

[0140] 虽然对于胰岛结构的新生有效, 仍然需要优化前胰岛肽 (包括 HIP 变体), 以改进它们作为治疗剂给予的溶解性、稳定性和生物利用度。对前胰岛肽 (包括 HIP 变体) 的将减少它们蛋白酶降解的机会的修饰将提高它们的效力, 从而减少为得到积极的治疗效果所需要的用量。这些修饰的结果被称为“优化的前胰岛肽”或“优化的 HIP”。

[0141] 在一个实施方案中, 优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP) 以提纯形式、合成形式或重组形式被本公开提供, 并且根据本文所公开的方法被给予以诱导胰腺胰岛新生。

[0142] 进一步地, 优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP) 可以被长时间稳定地储存。当在 20°C 储存在生理盐水中时, 优化的 HIP 可以在几个月内稳定。

[0143] 在具体的实施方案中, 优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP) 在功能上极度活跃, 即, 能够表现出与 REG3A、其他 HIP 肽和非人 HIP 同源物 (例如仓鼠 INGAP) 相关联的一种或多种的功能活性的更大活性。

[0144] 由于核苷酸编码序列的简并, 编码与优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP) 相同或基本上相似的氨基酸序列的多种 DNA 序列可以用于本公开的实践, 以制备用于生产重组的优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP 变体) 的表达载体。所述 DNA 序列包括但不限于包括通过不同的密码子的取代而被改变的优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP) 的所有或部分的核酸序列, 所述不同的密码子编码所述序列内的相同或功能上等价的氨基酸残基, 从而产生沉默变化 (silent change)。所述优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP) 和其衍生物包括但不限于含有优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP 变体) 的所有或部分氨基酸序列 (包括改变的序列), 作为主要氨基酸序列的那些, 在所述改变的序列中, 功能上等价的氨基酸残基取代了原序列内的残基, 导致沉默变化。例如, 序列内的一种或更多个氨基酸残基可以被作为功能上的等效物起作用的有相似极性的另一个氨基酸所取代, 导致沉默改变 (silent alteration)。所述序列内的氨基酸的取代物可以选自所述氨基酸所属类别的其他成员。例如, 非极性 (疏水性的) 氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯基丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电的 (碱性) 氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电的 (酸性) 氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。优化的前胰岛肽 (包括优化的 HIP 衍生物) 还包括但不限于含有前胰岛肽 (包括 HIP) 的所有或部分氨基酸序列 (包括改变的序列), 作为主要氨基酸序列的那些, 在所述改变的序列中, 氨基酸残基被具有相似化学性质的残基取代。

在具体的实施方案中,优化的HIP的1、2、3、4或5个氨基酸被取代,结果得到优化的HIP的类似物和/或衍生物。

[0145] 在具体的实施方案中,嵌合蛋白或融合蛋白可以用于本文所公开的方法。如本文所用,“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包括有效链接(operatively linked)至非前胰岛肽或HIP多肽或其类似物或衍生物的优化的前胰岛肽(包括优化的HIP)或其类似物或衍生物。在所述融合蛋白中,优化的前胰岛肽或HIP和所述非前胰岛或HIP多肽被“有效链接”,即它们符合彼此读框地融合。所述非前胰岛或HIP多肽可以被融合至优化的前胰岛肽或HIP的N末端或C末端。例如,所述融合蛋白可以为在其N末端含有异源信号序列的优化的HIP。在某些宿主细胞(例如,哺乳动物宿主细胞)中,优化的HIP或其类似物或衍生物的表达和/或分泌可以通过使用异源信号序列被提高。在再另一个实施例中,所述融合蛋白为优化的HIP-免疫球蛋白融合蛋白,其中所述优化的HIP序列被融合至从免疫球蛋白家族的成员所衍生的序列。所述优化的HIP-免疫球蛋白融合蛋白可以被并入药物组合物并且根据本公开被给予受试者以抑制免疫应答。

[0146] 用于本文所公开的方法中的优化的前胰岛肽(包括优化的HIP)或其类似物或衍生物,或与优化的前胰岛肽(包括优化的HIP)嵌合或融合的蛋白可以被化学修饰用于改善生物利用度和/或提高效力、溶解性和稳定性的目的。例如,所述蛋白质可以被共价或非共价联接于白蛋白,转铁蛋白或附加的聚乙二醇(PEG)部分。

[0147] 用于本文所公开的方法的优化的前胰岛肽(包括优化的HIP)或其类似物或衍生物,或与优化的前胰岛肽或HIP嵌合或融合的蛋白可以通过根据本文的教导和本领域已知的标准的重组DNA技术生产。例如,编码不同的多肽序列的DNA片段可以根据常规的技术被符合彼此读框地共同连接在一起,例如,通过采用平端(blunt-ended)或粘端(stagger-ended)连接,限制酶消化以提供适合的末端,适合的粘性末端的补齐,碱性磷酸酶处理以避免不期望的结合,以及酶连接。此外,融合基因可以通过常规的技术合成,包括DNA合成仪。或者,可以使用在两个连续基因片段之间生成互补的悬垂的锚定引物进行基因片段的PCR扩增,所述两个连续基因片段可以接下来被退火和再扩增以生成嵌合的基因序列。此外,许多表达载体为市售的,这些载体已经编码了融合的部分(例如GST多肽)。编码优化的HIP的核酸可以被克隆到这样的表达载体由此所述融合部分被符合读框地连接于优化的HIP。所述融合蛋白可以是融合于His标签或抗原决定簇标签(例如V5)的优化的HIP,以协助重组的优化的HIP的提纯和检测,或者以掩蔽(mask)在受试者中的免疫应答。优化的HIP及其类似物或衍生物的短氨基酸序列也使这些有价值的肽的合成生产可以容易地实践,而且多种用于肽合成的自动化仪器为市售的,而且针对不需要自动化的肽合成的合成方法为长久以来已知的并且可以根据本文的教导被使用以制备优化的HIP或其类似物或衍生物。

[0148] 在一些实施方案中,优化的前胰岛肽(包括优化的HIP)或其类似物或衍生物,或与优化的前胰岛肽或HIP嵌合或融合的蛋白可以使用本领域已知的任何方法被修饰,由此其具有延长的体内的半衰期。例如,人免疫球蛋白的Fc片段或诸如高分子量聚乙二醇(PEG)的惰性聚合物分子可以,使用或不使用多功能接头(linker),通过PEG对所述蛋白质的N末端或C末端的位点特异性共轭(conjugate),或经由赖氨酸残基上存在的 ϵ -氨基基团,被附加于(attached to)优化的HIP或其类似物或衍生物。将使用导致生物活性的最

小损失的线性或支化聚合物的衍生化。共轭程度可以通过 SDS-PAGE 和质谱进行密切监控以确保 PEG 分子对优化的 HIP 或其类似物或衍生物的合适共轭。未反应的 PEG 可以通过尺寸排阻层析或通过离子交换色谱从优化的 HIP-PEG 共轭物分离。由 PEG 衍生的共轭物可以使用本领域的技术人员所知的方法测试体内效力。

[0149] 本公开的实施方案提供优化的前胰岛肽制剂（包括优化的 HIP 制剂）和基于优化的前胰岛肽或 HIP 的治疗，和用于在糖尿病和各种其他涉及受损的胰腺功能的指示的治疗中递送优化的前胰岛肽或 HIP 变异体的方法。

[0150] 在一个实施方案中，前胰岛肽通过添加 C 末端的酰胺基团和 N 末端的乙酰基基团被优化，从而有效地阻断那些在血清中识别并且降解肽的自由端的蛋白酶的蛋白水解活性，而结果得到所述优化的前胰岛肽化合物。

[0151] 在一个实施方案中，HIP3、HIP1 和 / 或 HIP2 通过添加 C 末端的酰胺基团和 N 末端的乙酰基基团被优化，从而有效地阻断那些在血清中识别并且降解肽的自由端的蛋白酶的蛋白水解活性，而结果分别得到所述优化的 HIP 化合物 HIP3Blocked (SEQ ID NO :5)、HIP1Blocked (SEQ ID NO :6) 和 HIP2Blocked (SEQ ID NO :7)。这些添加的封闭基团通过固相肽合成 (SPPS) 制备。固相合成的基本前提是，当肽链的一端锚定于不溶性支撑体上时，氨基酸可以被组装于有任何期望的序列的肽中。如以上提到的，在实际 SPPS 中，所述肽的羧基末端连接于所述聚合物。在氨基酸的期望的序列已经共同连接在所述支撑体上之后，可以应用试剂以将所述肽链从所述支撑体裂解并且将粗肽释放进溶液中。所有所述合成中涉及到的反应，如果可能的话，都进行到完成，由此能够获得均一的产物。

[0152] 当肽的 C 末端为酰胺时，衍生物为肽酰胺。肽酰胺为极重要的衍生物，因为许多在天然存在的肽激素以酰胺的形式存在。为了合成肽酰胺，已经开发出固相树脂，所述固相树脂在裂解时直接得到肽酰胺。当 N 末端为乙酰基基团时，所述肽从 C 末端向 N 末端组装。然后 N 末端在碱存在下使用乙酸酐被乙酰化。

[0153] 在另一个实施方案中，前胰岛肽通过添加 C 末端半胱氨酸残基被修饰，结果得到 Cys 前胰岛肽化合物。这些优化的前胰岛肽化合物能够在溶液中形成二聚物，其中在各个单体的半胱氨酸之间形成二硫键，结果得到优化的前胰岛肽化合物前胰岛肽 CysDimer。

[0154] 在另一个实施方案中 HIP3、HIP1 和 / 或 HIP2 通过添加 C 末端半胱氨酸残基被修饰，结果分别得到所述优化的 HIP 化合物 HIP3Cys (SEQ ID NO :8)、HIP1Cys (SEQ ID NO :9) 和 HIP2Cys (SEQ ID NO :10)。这些优化的 HIP 化合物能够在溶液中形成二聚物，其中在各个单体的半胱氨酸之间形成二硫键，结果分别得到所述优化的 HIP 化合物 HIP3CysDimer (SEQ ID NO :11)、HIP1CysDimer (SEQ ID NO :12) 和 HIP2CysDimer (SEQ ID NO :13)。所述半胱氨酸残基的添加是通过用 2mL 乙酸湿化 4 克粗肽，并且用 ~ 500mL 去离子水稀释，然后通过逐滴添加 20% NH₄OH 溶液调整 pH 至 ~ 8.2 并且允许在室温下搅拌过夜。过夜后反应未完成，因此添加铁氰化钾溶液直至保持持久的黄绿色。在这个阶段，通过 Ellman 测试和 HPLC 分析确定反应完成。然后使用一匙 AG-1 X2 (氯形式) 树脂处理所述氧化溶液 30 分钟，并且在 P4 漏斗上过滤，并且在 HPLC 提纯之前最终 pH 被调整至 ~ 5。

[0155] 在另一个实施方案中所述 Cys 前胰岛肽通过添加 C 末端的酰胺基团和 N 末端的乙酰基基团被封闭，从而保护所述化合物不被在血清中识别自由端的蛋白酶降解，并且结果得到优化的 HIP 化合物前胰岛肽 CysBlocked。此外这些化合物能够在溶液中形成二聚

物,其中在各个单体的半胱氨酸之间形成二硫键,结果得到优化的前胰岛化合物前胰岛肽 CysBlockedDimer。这些封闭基团如以上所讨论的被添加。

[0156] 在另一个实施方案中, HIP3Cys(SEQ ID NO:8)、HIP1Cys(SEQ ID NO:9) 和 / 或 HIP2Cys(SEQ ID NO:10) 通过添加 C 末端的酰胺基团和 N 末端的乙酰基基团被封闭,从而保护所述化合物不被在血清中识别自由端的蛋白酶降解,并且结果分别得到所述优化的 HIP 化合物 HIP3CysBlocked(SEQ ID NO:14)、HIP1CysBlocked(SEQ ID NO:15) 和 HIP2CysBlocked(SEQ ID NO:16)。此外这些化合物能够在溶液中形成二聚物,其中在各个单体的半胱氨酸之间形成二硫键,结果得到分别优化的 HIP 化合物 HIP3CysBlockedDimer(SEQ ID NO:17)、HIP1CysBlockedDimer(SEQ ID NO:18) 和 HIP2CysBlockedDimer(SEQ ID NO:19)。这些封闭基团如以上所讨论的被添加。

[0157] 在另一个实施方案中,所述 Cys 前胰岛肽通过在 C 末端半胱氨酸残基上共价结合由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构被优化,结果得到优化的 HIP 化合物前胰岛肽 CysPEG。所述 PEG 结构通过将 CS504 肽的单体已提纯形式(1.1 当量)溶解于乙酸缓冲液(pH = 6.5)可以被共价结合于所述 C 末端半胱氨酸残基。PEG 马来酰亚胺的溶液(1 当量)可以在去离子水中制备并且在搅拌下被添加进所述肽溶液。所得溶液的 pH 可以使用稀 NH₄OH 溶液被再次调整至 ~ 6.5,在室温下搅拌 30 分钟,并且使用几滴乙酸酸化,并且最终通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)被提纯。

[0158] 在另一个实施方案中, HIP3Cys(SEQ ID NO:8)、HIP1Cys(SEQ ID NO:9) 和 / 或 HIP2Cys(SEQ ID NO:10) 通过在 C 末端半胱氨酸残基上共价结合由二聚马来酰亚胺活化的 40Kd PEG 结构被优化,结果分别得到优化的 HIP 化合物 HIP3CysPEG(SEQ ID NO:20)、HIP1CysPEG(SEQ ID NO:21) 和 HIP2CysPEG(SEQ ID NO:22)。所述 PEG 结构通过将 CS504 肽的单体已提纯形式(1.1 当量)溶解于乙酸缓冲液(pH = 6.5)被共价结合于所述 C 末端半胱氨酸残基。PEG 马来酰亚胺(1 当量)的溶液在去离子水中制备并且在搅拌下被添加进所述肽溶液。所得溶液的 pH 使用稀 NH₄OH 溶液被再次调整至 ~ 6.5,在室温下搅拌 30 分钟,并且使用几滴乙酸酸化,并且最终通过 RP-HPLC 被提纯。

[0159] 在另一个实施方案中前胰岛肽 CysPEG 通过添加 C 末端的酰胺基团和 N 末端的乙酰基基团被优化,从而保护所述化合物不被在血清中识别自由端的蛋白酶降解,并且结果得到所述优化的 HIP 化合物前胰岛肽 CysPEGBlocked。所述封闭基团如以上所讨论的被添加。

[0160] 在另一个实施方案中 HIP3CysPEG(SEQ ID NO:20)、HIP1CysPEG(SEQ ID NO:21) 和 HIP2CysPEG(SEQ ID NO:22) 通过添加 C 末端的酰胺基团和 N 末端的乙酰基基团被优化,从而保护所述化合物不被在血清中识别自由端的蛋白酶降解,并且结果分别得到所述优化的 HIP 化合物 HIP3CysPEGBlocked(SEQ ID NO:23)、HIP1CysPEGBlocked(SEQ ID NO:24) 和 HIP2CysPEGBlocked(SEQ ID NO:25)。所述封闭基团如以上所讨论的被添加。

[0161] 本公开的优化的前胰岛肽或 HIP 或类似物或衍生物治疗或组合治疗可以用于,使用优化的 HIP 化合物和治疗方法,通过从祖细胞向新胰岛结构的分化,治疗任何患有与胰岛素的生产或分泌的削弱有关的疾病、症状或病况的哺乳动物(包括人类和动物),所述胰岛素的生产或分泌的削弱是由于 β 细胞功能的损失或削弱或比所能够提供给受试者的更大的胰岛素产量的需求。这样的疾病和病况包括 1 型糖尿病、2 型糖尿病、前驱糖尿病、空腹

血糖受损、空腹高胰岛素血症,包括但不限于 1a 型糖尿病患者,或可以显现抗体(抗 GAD65 抗体,抗胰岛抗体,或抗胰岛素抗体)的成人隐匿性自身免疫性糖尿病患者,或那些具有胰岛素缺乏而不具有针对 β 细胞的自身免疫的 1 型糖尿病患者(1b 型糖尿病)。此外,本公开的实施方案可以被实践为针对被新诊断出患有 1 型糖尿病的患者,1 型糖尿病患者的兄弟姐妹和一级亲属,以及具有阳性抗体和显示 1 型糖尿病的征兆的其他自身免疫病况的人具有治疗上的益处。在一个实施方案中,本文所公开的方法被实践以在需要这样的治疗的患者身上逆转 1 型糖尿病。

[0162] 所述组合治疗和相关的方法和组合物还可以用于作为用于儿童和成人的 1 型糖尿病的胰岛素治疗的辅助治疗,以改进糖尿病患者的葡萄糖波动,以及用于未有效控制的糖尿病的患者、患有无感知低血糖的患者和与在 1 型糖尿病中低血糖症复发的患者。

[0163] 所述优化的前胰岛肽或 HIP 或类似物或衍生物治疗以及相关的方法和组合物可以用于治疗具有新诊断出的 2 型糖尿病的患者、具有高血糖的儿童和成人中 2 型糖尿病的患者,同时使用胰岛素、口服糖尿病药物或其他皮下糖尿病治疗的 2 型糖尿病的患者,以及未有效控制的 2 型糖尿病的患者。在一些患者中,包括儿童和成人,本文所公开的方法和组合物可以逆转 1 型和 2 型糖尿病。本文所公开的方法和组合物也可以用于治疗具有非典型形式的糖尿病的儿童和成人和具有餐后高血糖病况的患者。

[0164] 所述优化的前胰岛肽或 HIP 或类似物或衍生物治疗以及相关的方法和组合物也可以用于治疗需要减少重量、减少甘油三酸酯、LDL 胆固醇的儿童以及成人患者,包括但不限于在患有糖尿病以及不患有 1 型或 2 型糖尿病的患者中,实现减少重量或治疗肥胖症和超重。在一个实施方案中,本文所公开的方法和组合物被用于治疗具有病态肥胖症的患者。在其他实施方案中,本文所公开的方法和组合物被用于治疗具有病态肥胖症的患者或具有食欲缺乏,食欲过盛或其他饮食失调症的患者。

[0165] 所述由单一试剂优化的治疗以及相关的方法和组合物也可以用于治疗具有代谢障碍综合征或代谢综合症的儿童和成人,以及表现出变化的葡萄糖代谢并发的神经性疼痛综合症的病况的患者,以及那些患有伴随或不伴随糖尿病的高甘油三酯血症和餐后高甘油三酯血症的患者。在一个实施方案中,这些方法被实践以在需要这样的治疗的患者身上治疗多囊卵巢综合征。

[0166] 其他可以从所述优化的前胰岛肽或 HIP 或类似物或衍生物治疗以及相关的方法受益的患者一般包括被诊断为具有诸如空腹高血糖症、前驱糖尿病、空腹血糖受损、糖耐量低减和高血糖病的病况的儿童和成人患者。

[0167] 所述优化的前胰岛肽或 HIP 或类似物或衍生物治疗以及相关的方法和组合物也可以用于治疗具有神经性疼痛综合征和神经病的患者,无论所述患者是否被诊断为有糖尿病。

[0168] 所述优化的前胰岛肽或 HIP 或类似物或衍生物治疗以及相关的方法和组合物也可以用于治疗具有复发性胰腺炎或胰腺癌的患者,并且可以用于所有以实现衍生自胰腺中祖细胞的新胰岛结构为目的的药征。

[0169] 在一个实施方案中,刺激从胰腺祖细胞的胰岛分化得到产生胰岛素的胰岛结构的试剂选自优化的前胰岛肽或 HIP 或其类似物或衍生物。在另一个实施方案中,优化的前胰岛肽(包括 HIP)和另一种试剂组合以刺激胰岛细胞新生。所述另外的试剂可以

为,例如,胰淀素和 / 或类似物,包括但不限于普兰林肽 (SYMLIN™)、GLP-1 受体类似物、exendin-4 (EXENATIDE™)、利拉鲁肽 (NN2211)、GLP-1、GLP-1 类似物 GIP、GLP-1、仓鼠 INGAP、其他拟肠促胰岛素 (incretin-mimetic) 的激素、和 / 或以类似形式作用的化合物和试剂,和延长前述的任何化合物和试剂的半衰期或提高其水平或活性的试剂,例如,二肽基肽酶 -4 抑制剂,所述二肽基肽酶 -4 抑制剂延迟 GLP-1 的降解。有许多通过对 GLP-1 受体的直接兴奋活性或通过抑制 GLP-1 的降解的 GLP-1 模拟物。这些试剂可用于本公开的某些实施方案中。GLP-1 模拟物可以用于与 HIP 和 / 或作为靶向免疫治疗结合用于治疗 1 型糖尿病,而且它们可以用于改善糖血控制、增加饱腹感、延迟肠 (gut) 葡萄糖吸收,并且引起导致 1 型糖尿病的基本机理的逆转。这些试剂和方法可以防止糖尿病中糖耐量低减的恶化;以防止前驱糖尿病、空腹血糖受损向糖耐量低减和糖尿病的发展;以逆转新诊断出的 2 型糖尿病;以治疗 2 型糖尿病,并且以治疗或防止超重、肥胖症、多囊卵巢综合症和神经性疼痛综合症。

[0170] 方法,试剂和药物制剂可用于本公开的实践以实现从成人胰腺中的祖细胞的胰岛分化并且包括在以下参考文献中描述的针对其他目的的那些,以下参考文献中的每一个以引用的方式并入本文:Rosenberg 等人,1992, *Adv. Exp. Med. Biol.* 321 :95-104 ;Mar. 1996, *Diabetologia* 39(3) :256-62 ;1996年7月, *Pancreas* 13(1) :38-46 ;和2004年11月, *Ann. Surg.* 240(5) :875-84 ;Vinik 等人,1997年六月, *Horm. Metab. Res.* 29(6) :278-93。所述对胰岛再生或胰腺祖细胞分化的成功的刺激可以通过受试者体内胰岛素的增加了的产量和 / 或分泌来表现。

[0171] 在一个实施方案中,胰淀素或胰淀素的类似物例如 SYMLIN™ 或普兰林肽为在优化的 HIP 被给予之前被采用的或与优化的 HIP 伴随被给予。胰淀素可以在胰岛再生之前被给予,并且在胰岛再生时期给予期间继续给予,这是根据以下参考文献的教导:Young 等人,1997, *Curr. Opin. Endocrin. Diabetes* 4 :282-290,该参考文献以引用的方式并入本文。在一个实施方案中,胰淀素和 / 或类似物,包括但不限于普兰林肽,在优化的 HIP 起始之前通过皮下给予以优化糖血控制,并且然后可以单独或连同其他胰岛刺激肽,例如优化的 HIP 或优化的 HIP 类似物或衍生物一起使用。在一个实施方案中,胰淀素或普兰林肽以 0.3-0.8 微克每千克患者重量定量给药。在一个实施方案中,本剂量在餐前 (例如, QHS 和 3AM) 皮下给予。在一个实施方案中,所述治疗有效剂量以皮下的方式递送或通过注入装置 / 泵和 / 或经皮的、鼻内的、口服的、显微操作针递送系统、口服胶囊方法被递送。在另一个实施方案中,所述治疗有效剂量利用持续释放制剂被给予,所述制剂要求通过频率不高于每星期一次、每 2 星期一次、或每月一次的注射或其他递送方法给予。如上文所述的,在一些实施方案中,胰淀素或普兰林肽与另一种胰岛刺激剂共同给予。

[0172] 在一个实施方案中,GLP-1 受体类似物,包括 exendin-4 或 exendin-4 的类似物以伴餐的 5-10mcg 的剂量与优化的 HIP 在所述方法中被采用。exendin-4 可以为了本公开的目的根据以下参考文献的教导被配制和给予,以下参考文献中的每一个以引用的方式并入本文:Alcantara 等人,1998, *Cell Biochem. Funct.* 16(1) :51-6 ;Dupre 等人,2004, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 89(7) :3469-73 ;Edwards 等人,1999, *Diabetes* 48 :86-93 ;和 Xu 等人,1999, *Diabetes* 48 :2270-76。在一个实施方案中,exendin-4 在餐前以在 5-10 微克范围内定量给药。在一个实施方案中,exendin-4 单独或与优化的 HIP 和 / 或其他胰岛刺激肽结

合通过皮下给予。在一个实施方案中,所述治疗有效剂量通过皮下给予。在另一个实施方案中,exendin-4 的递送为通过经皮的、鼻内的、通过口服胶囊方法、口腔的、或显微操作针递送系统。在另一个实施方案中,治疗有效剂量被包含在持续释放制剂中,所述持续释放制剂要求以不高于每星期一次,每 2 星期一次,或每月一次的频率给予。在一个实施方案中,exendin-4 在患有 1 型或 2 型糖尿病患者、或肥胖症、超重、胰岛素抵抗综合症、空腹血糖受损、前驱糖尿病、多囊卵巢综合症、代谢综合症或饮食失调症的患者中,与优化的 HIP 或另一种胰岛细胞新生或祖细胞转变试剂(transformation agent) 共同给予。

[0173] GIP 和 GLP-1 属于生长激素的肠促胰岛素族(见参考文献 Creutzfeldt,1979, *Diabetologia* 16 :75-85 ;Creutzfeldt 和 Ebert,1985, *Diabetologia* 28 :565-573 ;Holst 等人,2001, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 234 :75-85 ;和 Vilsboll 等人,2003 年 6 月, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 88(6) :2706-13,它们中的每一个以引用的方式并入本文),并且在在一个实施方案中,在所述方法中采用肠促胰岛素激素或类似物伴随或不伴随优化的 HIP 的共同使用,以刺激从成人胰腺中祖细胞向胰岛的分化。

[0174] 在各种实施方案中,GIP 或 GIP 类似物与优化的前胰岛肽(包括 HIP) 一起采用。GIP 可以为了本公开的目的根据以下参考文献的教导被配制和给予,以下参考文献中的每一个以引用的方式并入本文:Andersen 等人,1978, *J. Clin. Invest.* 62 :152-161 ;Creutzfeldt 等人, Feb. 1980, *Diabetes* 29(2) :140-5 ;Dupré 等人,1973, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 37 :826-828 ;Ebert 等人,1980, *Clinical Gastroenterology* 9(3) :679-98 ;Elahi 等人,1979, *Am. J. Physiol.* 237 :E185-E191, 和 1994, *Regulatory Peptide* 51(1) :63-74 ;Krarup 等人,1983 年 6 月, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 56(6) :1306-12 ;Krarup 等人,1987, *Metabolism* 36(7) :677-82 ;Krarup 等人,1988, *Acta Med. Scand.* 223(5) :437-41 ;Lynn 等人,2003, *FASEB* 17 :19-93 ;Meir 等人,2002, *Regulatory Peptides* 107 :1-3 ;和 Nauk 等人,1993, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 76(4) :912-7。

[0175] 在一个实施方案中,GIP 与优化的前胰岛肽(包括 HIP) 或其类似物或衍生物组合被静脉内或皮下给予并且以 2-10 纳克每千克患者重量定量给药,以提供 30 分钟的静脉内或皮下的连续注入的递送时间,所述时间开始于餐前 3-5 分钟、在睡觉时间前、以及开始于 3AM。在一个实施方案中,GIP 在餐前、QHS、和 3AM 被皮下给予。在一个实施方案中,GIP 口服给予或使用注入装置或经皮、口服的,鼻内的或显微操作针递送系统被给予。在另一个实施方案中,采用要求以不高于每星期一次、每 2 星期一次、或每月一次的频率的注射给予的持续释放制剂。针对根据本文所公开的方法给予 GIP 的合适的组合物为了其他目的在以下参考文献中被描述, Jones 等人,1989 年 11 月 6 日, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 7(4) :263-9。

[0176] 在各种实施方案中, GLP-1 或类似物,或 GLP-1 受体激动剂或二肽基肽酶 -4 抑制剂与优化的前胰岛肽(包括 HIP) 或其类似物或衍生物在所述方法中被组合采用,以刺激从祖细胞的胰岛分化。GLP-1、GLP-1 受体激动剂、GLP-1 类似物和 DPP-4 抑制剂可以为了本公开的目的根据以下参考文献的教导被配制和给予,以下参考文献中的每一个以引用的方式并入本文:Elahi 等人,1994, *Regulatory Peptides* 51(1) :63-74 ;Gutniak 等人,1994, *Diabetes Care* 17 :1039-44 ;Kreymann 等人,1987, *Lancet* 2 :1300-1304 ;Larsen 等人,1996, *Diabetes* 45(Suppl. 2) :233A(abstract) ;Larsen 等人,2001, *Diabetes Care* 24(8) :1416-21 ;List 等人,2004, *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.* 286(6) :E875-81 ;

Lugari 等人, 2000, *Horm. Metab. Res.* 32 :424-428 ; Marquez 等人, Mar. 1998, *Cell. Biochem. Funct.* 16(1) :51-6 ; Meier 等人, March 2004, *Critical Care Medicine* 32(3) :848-851 ; Meneilly 等人, 2003, *Diabetes Care* 26 :2835-41 ; Nauk 等人, 1996, *Diabetologia* 39(12) : 1546-53 ; Thorens 等人, Dec. 1995, *Diabetes Metab.* 21(5) :311-8 ; Vilsboll 等人, 2003, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 88(6) :2706-13 ; Wang 等人, 1997, *J. Clin. Invest.* 99 : 2883-2889 ; 和 Zander 等人, 2002, *Lancet* 359 :824-30。

[0177] 在各种实施方案中, GLP-1、GLP-1 受体激动剂或 GLP-1 类似物被皮下给予, 或 DPP-4 抑制剂与优化的前胰岛肽 (包括 HIP) 或其类似物或衍生物组合被口服给予并且在 400-800mg 每日且 8-20mg 每千克患者重量的范围内定量给药。在一个实施方案中, GLP-1 在餐前和 QHS 被口服或皮下给予。在一个实施方案中, GLP-1 使用连续皮下注入装置以 1-30ng/ 千克体重 / 分钟的速率被给予或使用经皮的、口服的、或显微操作针递送体系以提供 30 分钟的静脉内或皮下的连续注射的递送时间, 所述时间开始于餐前 3-5 分钟、在睡觉时间前、以及开始于 3AM。在另一个实施方案中, 采用需要以不高于每星期一次、每 2 星期一次、或每月一次的频率的注射给予的持续释放试剂。

[0178] 在一个实施方案中, 利拉鲁肽 (NN2211) 以 10-40 微克每千克体重的剂量与优化的前胰岛肽 (包括 HIP) 或其类似物或衍生物组合被皮下给予。在另一个实施方案中, 利拉鲁肽在餐前、QHS、和 3AM 被皮下给予。在另一个实施方案中, 利拉鲁肽用注入装置或经皮的、口腔的、或显微操作针递送体系被给予以提供 30 分钟的静脉内或皮下的连续注射的递送时间, 所述时间开始于餐前 3-5 分钟、在睡觉时间前、以及开始于 3AM。在另一个实施方案中, 采用需要以不高于每星期一次、每 2 星期一次、或每月一次的频率的注射给予的持续释放制剂。

[0179] 在所述组合治疗的一个实施方案中, 利拉鲁肽或 NN2211 以约 20 微克每 kg 患者重量每日的剂量与优化的前胰岛肽 (包括 HIP) 组合被给予。这一剂量将为患者提供将餐前的药丸 (bolus) 胰岛素减少 10-20% 的能力, 伴随减少的波动和降低的餐后葡萄糖、胰高血糖素和甘油三酸酯。根据本文所公开的方法的利拉鲁肽的给予可以用于改善糖血控制, 如测量的, 例如但不限于, 在 1 型糖尿病中通过血红蛋白 A1C ; 以防止糖尿病中糖耐量减低的发展 ; 以防止空腹血糖受损向糖耐量减低和糖尿病的发展 ; 以逆转新诊断出的 2 型糖尿病 ; 以及以治疗 2 型糖尿病。

[0180] 在所述组合治疗的实施方案中, 在优化的前胰岛肽或 HIP 治疗期间, 利拉鲁肽或 NN2211 在午前、在食物摄入大约 4 小时前和在睡觉时间, 连续三个星期, 以大约 20 微克每 kg 患者重量的剂量向成人患者给予。对于以低于约 1.0ng/mL 的 C- 肽水平起始治疗的患者, C- 肽水平被监控, 并且当 C- 肽水平升高至高于 0.5ng/mL 时, 抗体 hOKT3g1 (Ala-Ala) 被连续 12 天给予。

[0181] 在所述组合治疗中, exendin-4 或合成 exendin-4 或另一种 GLP-1 类似物、GLP-1 受体激动剂、或二肽基肽酶 -4 抑制剂在餐前单独或与优化的前胰岛肽或 HIP 或另一种胰岛分化剂一起被给予, 以在优化的 HIP 治疗的起始之前或在优化的 HIP 治疗期间改善糖血控制。这样的试剂, 当在餐前递送时, 可以导致对胰岛素的需要减少至少 20%, 并且当优化的 HIP 被给予时, 将进行对胰岛素和糖尿病药物的适当的逐渐减少。当优化的 HIP 和 / 或其他试剂被在 1 型和 2 型糖尿病患者二者中递送时, 由于新胰岛细胞从祖细胞分化, 将发

生谨慎的对胰岛素和其他糖尿病药物的逐渐减少以抵御低血糖症。最终,由于胰腺重新具有新的起作用的胰岛,胰岛素和糖尿病药物,包括优化的 HIP,将被逐渐减少。对于以低于约 1.0ng/mL 的 C-肽水平起始治疗的患者,C-肽水平被监控,并且当 C-肽水平升高至高于 0.5ng/mL 时,将发生对外源胰岛素剂量的谨慎的监控和逐渐减少。

[0182] 在 1 型糖尿病患者中,在优化的前胰岛肽(包括 HIP)和/或其他肽化合物(SYMLIN™、仓鼠 INGAP、GLP-1、GLP-1 受体激动剂、GLP-1 类似物)的起始之前,使用 DPP-4 抑制剂(在免疫治疗将被给予之前,期间,或之后)以保护新形成的胰岛。例如,抗体 hOKT3g1(Ala-Ala)被连续 12 天给予,其效力在第一次治疗后表现出,直至 24 个月,但是相似的人源化的单克隆抗体 ChAglyCD3 可以被连续 6 天给予,然后每年重复。Diacyd's GAD65 化合物以相隔一个月的两次皮下注射被递送。DIAPEP277™,一种热激蛋白 60,在研究开始、1 个月后和 6 个月后利用 1mg 的皮下注射,伴随植物油中的 40mg 甘露醇进行,在新诊断出的糖尿病患者中已被证明成功。基于所选的所述免疫调节物,将确定治疗的周期性。在另一个实施方案中,DIAPEP277™,一种热激蛋白 60 疫苗,以及 IBC-VSO 疫苗(胰岛素的合成的代谢非活性形式,被设计以防止胰腺 β 细胞毁灭),干扰素 α,或使用 CD4⁺CD25⁺ 抗原特异调节性 T 细胞或相似试剂的接种疫苗被用于所述组合治疗中。在另一个实施方案中,免疫调节试剂,包括但不限于抗 CD3 免疫治疗试剂和多克隆抗 T-淋巴细胞球蛋白,与优化的 HIP 组合使用。这样的试剂还包括:西罗莫司(雷帕霉素)、他克莫司(FK506)、热激蛋白 60(DIAPEP277™)、抗谷氨酸脱羧酶 65(GAD65)疫苗、单独或与达利珠单抗组合的霉酚酸酯、抗 CD20 试剂利妥昔单抗、Campath-1H(抗 CD52 抗体)和/或维生素 D。

[0183] 一些自身免疫细胞靶向于胰腺 β 细胞并且因此在一些可根据本文所公开的方法治疗的疾病和病况中起到起因的作用。见参考文献:Bach 等人,2001, Ann. Rev. Immun. 19 : 131-161 ;Lernmark 等人, Endocrin. Metab. Clin. N. Am. 20(3) :589-617 ;和 Mathis 等人, Dec. 2001, Nature 414(6865) :792-798,它们中的每一个以引用的方式并入本文。

[0184] 以前的涉及在 1 型糖尿病患者中引入免疫试剂的治疗方法仅保护那些还没有被免疫攻击破坏的胰岛细胞,并且不满足使胰腺重新具有拥有功能完全的 β 细胞的新胰岛结构的需要。这些方法组合了以减少 β 细胞毁灭为目的的全身性和特异性免疫调节和从成人胰腺中的祖细胞分化新胰岛细胞的方法学。

[0185] 本公开所述的方法可以采用特异地抑制靶向于生产胰岛素、胰淀素、或胰高血糖素的胰腺 β 细胞的自身免疫细胞的活性或阻滞或破坏所述自身免疫细胞的试剂。这样的试剂包括阻止胰岛细胞毁灭的免疫调节肽。例如,一种这样的试剂为可以延迟胰岛细胞损失的进程或减慢或停止 1 型糖尿病发作的单克隆抗体。抗 CD3 抗体包括可用于本文所公开的方法的一组常规的试剂。例如,为了本公开的目的合适的抗 CD3 抗体包括 TolerRx 正在开发的 TRX4(Ala-Ala 和 ChAglyCD3)抗体和在以下参考文献中描述的人源化的抗 CD3 抗体:Herold 等人,2002 年 5 月 30 日,NEJM 346(22) :1692-1698,以引用的方式并入本文。在一个实施方案中,所述人源化的抗 CD3 抗体每年 14 天以下述剂量被静脉内递送:第 1 天 1-1.42 μg/kg,第 2 天 5.67 μg/kg,第 3 天 11.3 μg/kg,第 4 天 22.6 μg/kg,以及第 5-14 天 45.4 μg/kg。这些治疗每年可以在优化的 HIP 使用 3-6 月之后被重复,而由于发生了新胰岛细胞的形成,胰岛素正在逐渐减少使用。在所述优化的 HIP 治疗阶段期间,维生素 D 和普兰林肽/SYMLIN™ 的使用可以继续。在优化的前胰岛肽(包括 HIP)和胰岛素治疗停止使用

后,免疫调节可以针对抗 CD3 抗体每年被重复,虽然最近的研究已发现它们的效力继续长达 24 个月。

[0186] 在另一个实施方案中,所述免疫调节化合物为可以阻止或减慢胰岛细胞毁灭的热激蛋白。这样的蛋白质包括 DIAPEP277™, DevelogenAG 正在开发的热激蛋白。在一个实施方案中,DIAPEP277™ 以在植物油中的 40mg 甘露醇中的 1mg 在基线被皮下递送,以第一个月 1 次然后以 3 个月两次为间隔进行。在组合治疗的一个实施方案中,优化的前胰岛肽(包括 HIP) 或优化的 HIP 类似物或衍生物与 DIAPEP277™ 如下被共同给予。所述 DIAPEP277™ 首先在基于优化的前胰岛肽(包括 HIP) 或类似物或衍生物的治疗开始大约 30 天之前,以大约 1mg 的剂量被皮下给予。然后 DIAPEP277™ 的第二次给予在所述基于优化的 HIP 或类似物或衍生物的治疗的开始的时间(第一次给予 90 天之后)进行。

[0187] 在另一个实施方案中,所述免疫调节化合物为多克隆抗 T 淋巴细胞球蛋白(ATG)。给出 ATG 剂量的四个用量。ATG 的第一个用量为 9mg 每 kg 体重,然后 3 个连续的 3mg/kg 剂量将在 4 小时内被静脉给予。在第一次 ATG 给予的一小时之前,将进行皮肤耐受性测试(0.2mL 最终溶液)。在组合治疗的一个实施方案中,ATG 在使用优化的 HIP 或优化的 HIP 类似物或衍生物之前被递送。ATG 的最后的用量被递送于所述基于优化的 HIP 或类似物或衍生物的治疗开始最少 14 天之前。ATG 的第二次给予可以基于对抗 GAD65 抗体和其他在使用 ATG 的初始治疗之后第 24 个月表明自身免疫性攻击的免疫标记的每季度测量被要求。如果指向胰腺的自身免疫抗体有显著升高,较早的治疗可以被要求。

[0188] 所述优化的前胰岛肽(包括 HIP) 或其类似物或衍生物可以经由皮下注射,口服(经由靶向于肝的囊泡),或其他脂质体试剂,或通过以治疗有效剂量的 24 小时连续皮下注入被递送,如上文所描述的。在一个实施方案中,每日剂量为约 5 至 20mg 每 kg 患者体重每 24 小时。在一个实施方案中,所述每日剂量为~ 600 至 800mg。所述基于优化的前胰岛肽或类似物或衍生物的治疗被持续给予 3 至 6 个月的时间并且通过 C-肽的产生密切地监控。所述免疫治疗将基于所选的免疫试剂被周期性地递送。例如,DIAPEP277™ 以 3 个月为间隔被给予一共 6 个月,并且将在基于优化的 HIP 或类似物或衍生物的治疗之前初始地被递送 3 个月。

[0189] 在本文所公开的方法中有用的免疫调节试剂可以按照本领域已知的或按照本文所描述的被配制、给予、和定量给药。下面描述针对本文所公开的方法的实践的药物制剂和附加的定量给药和给予规程。

[0190] 优化的前胰岛肽(包括 HIP) 或其类似物或衍生物的组合,例如,和其药学上可接受的盐和酯,当与各种其他化合物组合时,为协同性地或附加性地对在治疗糖尿病或相似的失调中将祖细胞分化为新胰岛细胞有效。这些化合物包括优化的前胰岛肽(包括 HIP) 和其类似物或衍生物、胰淀素和 / 或类似物,包括但不限于醋酸普兰林肽 / 普兰林肽、GLP-1、GLP-1 受体激动剂、例如 exendin-4、利拉鲁肽(NN2211)、GLP-1 类似物、二肽基肽酶-4 抑制剂、GIP、仓鼠 INGAP、和其他拟肠促胰岛素的激素,和 / 或以类似形式作用的化合物和试剂,和延长前述任何化合物和试剂的半衰期或提高前述任何化合物和试剂的水平或活性的试剂,例如,延迟 GLP-1 的降解的二肽基肽酶抑制剂,和抑制、阻滞或破坏靶向于 β 细胞的自身免疫细胞的试剂,包括但不限于:抗 CD-3 抗体,包括 hOKT31(Ala-Ala) 和 ChAglyCD3、ATG、西罗莫司(雷帕霉素)、他克莫司(FK506)、热激蛋白 60(DIAPEP277™)、抗

谷氨酸脱羧酶 65 (GAD65) 疫苗、单独或与达利珠单抗结合的霉酚酸酯、抗 CD20 试剂利妥昔单抗、Campath-1H (抗 CD52 抗体)、利索茶碱和维生素 D, 作为胰岛素的合成的代谢非活性形式的 IBC-VSO 疫苗, 所述 IBC-VSO 疫苗被设计以防止胰腺 β 细胞毁灭, 和干扰素 α 接种疫苗, 所述干扰素 α 接种疫苗使用被设计以防止胰腺 β 细胞毁灭的 $CD4^+CD25^+$ 抗原特异调节性 T 细胞或相似的试剂的。在这个最后的实施方案中, $CD4^+CD25^+$ 抗原特异性调节 T 细胞或相似试剂的干扰素 α 接种疫苗在组合治疗中被使用, 以直接或通过使用抗 CD3 免疫治疗利用调节 T 细胞。

[0191] 诸如西罗莫司 (雷帕霉素)、他克莫司 (FK506)、TRX4 抗体、人源化的抗 CD3 抗体、DYAMID™ 抗 GAD65 抗体和 DIAPEP277™ 的化合物, 当被添加进优化的 HIP 或将祖细胞分化为新胰岛细胞的试剂的使用时, 也协同性地或附加性地对在治疗糖尿病或相似的失调中有效。

[0192] 药物治疗方案的改进可以通过两个具有治疗效果的试剂的组合给予获得, 如果所述两个或更多个试剂的相互作用可使它们的组合效果减少共治疗中使用的一个或两个试剂的不良事件 (adverse event, AE) 的发生率。这种不利影响的发生率的减少可以是, 例如, 共治疗中使用的一个或两个试剂的较低剂量的给予的结果。例如, 如果药物 A 当以标记的剂量单独使用时的效果为 25% 并且具有 45% 的不利事件发生率; 而药物 B 当以标记的剂量单独使用时的效果为 25% 并且具有 35% 的不利事件发生率, 但是当所述两个药物以低于每个的标记的剂量组合时, 如果总体效果为 35% 并且不利事件发生率为 20%, 则具有药物治疗方案的改进。本公开提供的组合治疗包括表现出这样的改进的那些方案。

[0193] 药物组合物、定量给药和给予

[0194] 在优选的实施方案中, 优化的前胰岛肽 (包括 HIP) 以约 0.5 至约 5mg/kg/ 天的浓度被递送, 更优选地以对人分次皮下注射。所以 60kg 的个人将潜在地接收分成二至三次的 60mg/ 天, 即每餐后递送的 20mg。在其他优选的实施方案中, 优化的前胰岛肽 (包括 HIP) 也可以通过口服胶囊方法以在约 0.5 至约 5mg/kg/ 天的范围内的剂量被递送, 优选地每餐后分次口服递送。

[0195] 基于通过腹腔 (IP) 向 STZ 所致的糖尿病小鼠递送的以从每日两次 1000 微克至每日 0.1 微克的剂量范围的 HIP2 和优化的 HIP2B 的剂量范围研究 (实施例 13), HIP2B 能够以 HIP2 用量的大致为 10% 和与用于人试验中的来源于仓鼠的 INGAP 的剂量 10mg/kg (600mg/ 天) 相比等效的大致为 1mg/kg 的用量使用 (图 23)。

[0196] 例如, 在一些方面, 各个实施方案涉及包含如上文所定义的化合物和药学上可接受的载体或稀释剂的药物组合物, 或有效量的包含如上文所定义的化合物的药物组合物。

[0197] 本文所公开的化合物可以以常规的方式通过它们为活性的任何途径被给予。给予可以为全身的、局部的、或口服的。例如, 给予可以为但不限于肠胃外的、皮下的、静脉内的、肌内的、腹膜内的、经皮的、口服的、口腔的、或眼睛途径的、或阴道内的、通过吸入、通过积存注射、或通过植入物。所以, 针对本公开的化合物的给予的模式 (单独或与其他药物组合) 可以为但不限于舌下的、可注射的 (包括短效的、积存、植入物和通过皮下或肌肉注射的小球形式)、或通过使用阴道霜剂、栓剂、阴道栓剂、阴道环、直肠栓剂、子宫内装置、和经皮的形式例如贴片和霜剂。

[0198] 给予的具体模式将取决于医嘱。对具体的给予路径和剂量方案的选择由医师根据

医师所知的方法进行调整或滴定 (titrated), 以获得最佳的临床响应。要被给予的化合物的量为治疗上有效的量。要被给予的用量将取决于正在被治疗的受试者的特征, 例如, 具体的被治疗的动物、年龄、重量、健康状况, 同时进行治疗的种类 (如果有的话) 以及治疗的频率, 并且可以由本领域的技术人员 (例如, 由医师) 容易地确定。

[0199] 含有本公开的化合物和合适的载体的药物制剂可以为固体剂型, 包括但不限于片剂、胶囊、扁囊剂、小球、丸剂、粉剂和颗粒; 局部剂型, 包括但不限于溶液、粉剂、流体乳状液、流体悬浊液、半固体、软膏剂、糊剂、霜剂、凝胶和胶状剂 (jellies), 及泡沫; 以及肠胃外剂型, 包括但不限于溶液、悬浊液、乳状液和干粉; 包含有效量的本公开的聚合物或共聚物。本领域中还已知的是, 活性成分可以与药学上可接受的稀释剂、填料、崩解剂、粘结剂、润滑剂、表面活性剂、疏水性的载体、水溶性载体、乳化剂、缓冲剂、湿润剂、增湿剂、增溶剂、防腐剂等等一起被包含在这样的制剂中。给予的手段和方法为本领域已知的并且技术人员可以参考各种药学参考资料以获得指导。例如, 可以参考 ModernPharmaceutics, Banker&Rhodes, Marcel Dekker, Inc. (1979); 和 Goodman&Gilman's ThePharmaceutical Basis of Therapeutics, 6th Edition, MacMillan Publishing Co., New York (1980)。

[0200] 本公开的化合物可以被配制用于通过注射的肠胃外给予, 例如, 通过团注或连续输注。所述化合物可以通过在约 15 分钟至约 24 小时的时间内通过皮下连续输注被给予。用于注射的制剂可以以单位剂型存在, 例如在安瓿或多剂量容器中, 与额外的防腐剂一起。所述组合物可以采用在油性或水性媒介中的悬浊液、溶液或乳状液形式, 并且可以含有配方试剂, 例如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。

[0201] 对于口服给予, 所述化合物可以通过将这些化合物与本领域中众所周知的药学上可接受的载体组合被容易地配制。这样的载体使本文所公开的化合物能够被配制为片剂、丸剂、糖衣剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浊液等等, 用于由要被治疗的患者口服摄取。用于口服用途的药用制备剂可以通过添加固体赋形剂, 可选地研磨所得的混合物, 以及 (如果期望) 在添加合适的助剂之后处理颗粒的混合物获得, 以获得片剂或糖衣芯。合适的赋形剂包括但不限于诸如食糖类的填料, 所述糖类包括但不限于乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨醇; 纤维素制备剂, 例如但不限于玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄耆胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP)。如果期望, 可以添加崩解剂, 所述崩解剂例如但不限于交聚维酮、琼脂、或藻酸或其盐, 例如藻酸钠。

[0202] 可以提供具有合适的包衣的糖衣芯。为了这个目的, 可以使用浓的糖溶液, 所述溶液可以可选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇和 / 或二氧化钛、亮漆溶液, 和合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料或颜料可以添加进所述片剂或糖衣包衣以识别或区分活性化合物剂量的不同的组合。

[0203] 可以口服使用的药用制备剂包括但不限于用明胶制得的推合式胶囊, 以及用明胶和诸如甘油或山梨醇的增塑剂制得的软的密封的胶囊。所述推合式胶囊可以含有与填料 (例如乳糖)、粘结剂 (例如淀粉) 和 / 或润滑剂 (例如滑石或硬脂酸镁), 以及可选的稳定剂掺合的所述活性成分。在软胶囊中, 所述活性化合物可以被溶解或悬浮于合适的液体中, 例如脂肪油、液态石蜡或液态聚乙二醇。此外, 可以添加稳定剂。所有用于口服给予的制剂应该以适合于这样的给予的用量。

[0204] 对于口腔给予,所述组合物可以采用,例如,以常规的方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0205] 对于通过吸入给予,针对根据本公开的用途的化合物常规地以气溶胶喷雾存在的形式,从加压的包装或喷雾器,使用合适的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体,而被递送。对于加压的气溶胶的情况,所述剂量单位可以通过提供阀门以递送计量的量来确定。用于吸入器或吹药器中的例如,明胶的舱和药筒可以被配制以含有所述化合物的粉末混合物和合适的粉末基质(例如乳糖或淀粉)。

[0206] 本公开的化合物也可以被配制为直肠组合物,例如栓剂或保留灌肠剂,例如,含有常规的栓剂基质例如可可脂或其他甘油酯。

[0207] 除此前描述的制剂之外,本公开的化合物也可以被配制为积存制备剂。这样的长效制剂可以通过植入(例如皮下地或肌内地)或通过肌肉注射给予。

[0208] 积存注射可以在约1至约6个月或更长的间隔内被给予。所以,例如,所述化合物可以与合适的聚合的或疏水性的材料(例如作为在可接受的油中的乳状液)或离子交换树脂一起进行配制,或作为难溶性衍生物,例如作为难微溶性盐。

[0209] 在经皮给予中,本公开的化合物,例如,可以应用于膏剂,或可以通过经皮的治疗体系应用,所述体系因此被提供给有机体。

[0210] 所述化合物的药物组合物还可以包括合适的固相或凝胶相载体或赋形剂。这样的载体或赋形剂的例子包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种食糖类、淀粉、纤维素衍生物、明胶和诸如聚乙二醇的聚合物。

[0211] 本公开的化合物也可以与其他活性成分组合被给予,所述活性成分例如辅助剂、蛋白酶抑制剂、或其他可配伍的药物或化合物,其中这样的组合被视为对实现本文所描述的方法所期望的效果是合乎期望的或有利的。

[0212] 制备优化的HIP和其类似物或衍生物的方法

[0213] 本领域已知的任何技术都可以用于合成和提纯优化的HIP或其类似物或衍生物,包括但不限于从头(de novo)化学合成以及通过沉淀提纯、吸附(例如,柱色谱法、膜吸附剂、径向流层析柱、成批吸附、高效液相色谱法(HPLC)、离子交换色谱法、无机吸附剂、疏水吸附剂、固定化金属亲和层析法、亲和色谱法)、或凝胶过滤、电泳、液相分配、清洁剂分配、有机溶剂萃取和超滤。在提纯过程中,优化的前胰岛肽(包括HIP)或其类似物或衍生物的生物活性可以通过一种或更多种体外或体内分析被监控。优化的前胰岛肽或其类似物或衍生物的纯度可以通过本领域已知的任何方法被分析,例如但不限于凝胶电泳。见Scopes, supra。在一些实施方案中,在本文所公开的组合物中使用的优化的前胰岛肽(包括HIP)或其类似物或衍生物可以在总蛋白质mg的80至100%的范围内,或总蛋白质mg的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少98%。在一个实施方案中,在组合物中使用的优化的前胰岛肽(包括HIP)或其类似物或衍生物,为总蛋白质的至少99%。在另一个实施方案中,优化的前胰岛肽(包括优化的HIP)或其类似物或衍生物被提纯至表观均一,如(例如)通过十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳所分析的。在一个实施方案中,优化的前胰岛肽(包括HIP)被合成并且使用HPLC检验直至纯度大于95%。

[0214] 本领域已知的方法可以用于以重组方式生产优化的前胰岛肽(包括HIP)或其类似物或衍生物。编码优化的前胰岛肽(包括HIP)或其类似物或衍生物的核酸序列可以被

插入到表达载体内以在宿主细胞中进行增殖和表达。

[0215] 如本文所用的表达构建体是指编码优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物的核酸序列可操作地与一个或更多个调节区关联，所述一个或更多个调节区使优化的 HIP 或其类似物或衍生物在合适的宿主细胞的表达成为可能。“可操作地关联”是指其中所述调节区和要被表达的优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物以允许转录和最终的翻译的方式被联接（join）和确定位置的关联。

[0216] 对于优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物的转录所必需的所述调节区可以由所述表达载体提供。如果要表达缺少同源起始密码子的优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物基因序列，也可以提供翻译起始密码子（ATG）。在相容的宿主-构建体系统中，细胞转录因子，例如 RNA 聚合酶，将结合于所述表达构建体上的所述调节区，以在宿主有机体内使所述优化的前胰岛肽（包括 HIP）序列的转录发生。基因表达所需的调节区的精确性质可以在宿主细胞之间有所不同。通常，需要能够结合 RNA 聚合酶并促进可操作地关联的核酸序列的转录的启动子。这样的调节区可以包括那些参与转录和翻译的起始的 5' 非编码序列，例如 TATA 框、加帽序列、CAAT 序列等等。编码序列的非编码区 3' 可以含有转录终止调节序列，例如终止子和多聚腺苷酸化位点。

[0217] 为了将具调节功能的 DNA 序列（例如启动子）连接于优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物基因序列，或将优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物基因序列插入载体的克隆位点，提供合适的匹配的限制性位点的接头（linker）或衔接子（adapter）可以通过本领域中众所周知的技术被连接于 cDNA 的末端。在使用限制的酶切割之后可以进行修饰以通过反向消化（digesting back）或在连接前填充单链 DNA 末端创建平端。或者，期望的限制性酶切位点可以通过使用含有期望的限制性酶切位点的引物的 PCR 扩增所述 DNA 被引入 DNA 片段。

[0218] 包括与调节区可操作地关联的优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物序列的表达构建体可以被直接引入合适的宿主细胞，用于表达和生产前胰岛肽（包括优化的 HIP）或其类似物或衍生物而不需要进一步克隆。所述表达构建体也可以含有帮助前胰岛肽（包括优化的 HIP）或其类似物或衍生物序列向宿主细胞的基因组整合（例如，通过同源重组）的 DNA 序列。在这样的情况下，不一定需要采用包括适合于合适的宿主细胞的复制起点的表达载体以在所述宿主细胞中增殖和表达优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物。

[0219] 可以使用多种表达载体，包括但不限于质粒、粘粒、噬菌体、噬菌粒或经修饰的病毒。这样的宿主-表达系统相当于（represent）媒介，通过所述媒介，编码优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物的基因的序列可以被生产并且然后被提纯，而且还相当于当使用适合的核苷酸编码序列转化或转染时，可以原位表达优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物的细胞。这些包括但不限于，微生物，例如使用含有编码优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物的序列的重组的噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌（例如，*E. coli* 和 *B. subtilis*）；使用含有编码前胰岛肽（包括优化的 HIP）或其类似物或衍生物的序列的重组的表达载体转化的酵母（例如，*Saccharomyces*, *Pichia*）；使用含有编码优化的前胰岛肽（包括 HIP）或其类似物或衍生物的序列重组的病毒表达载体（例如，杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；使用含有编码优化的前胰岛肽（包括 HIP）或

其类似物或衍生物的序列的重组的病毒表达载体（例如，花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒，TMV）感染的或使用含有编码优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物的序列重组的质粒表达载体（例如，Ti质粒）转化的植物细胞系统；或容纳含有衍生自哺乳动物细胞的基因组的启动子（例如，金属硫蛋白启动子）或衍生自哺乳动物病毒启动子（例如，腺病毒晚期启动子；牛痘病毒 7.5K 启动子）的重组的表达构建体的哺乳动物细胞系统（例如，COS、CHO、BHK、293、NS0、和 3T3 细胞）。优选地，细菌细胞（例如 *Escherichia coli*）和真核细胞用于重组的优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物的表达。例如，哺乳动物细胞，例如中国仓鼠卵巢细胞（CHO），可以和具有来自巨细胞病毒的主要即刻早期基因的启动子元件的载体一起使用，以有效表达优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物序列。

[0220] 在细菌系统中，许多表达载体可以被优势地选择，取决于正在被表达的优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物的预期的使用。例如，当大量的优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物要被生产时，为了优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物的药物组合物的生成，合乎期望的是引导容易被提纯的融合蛋白产物的高水平的表达的载体。载体包括但不限于 *E. coli* 表达载体 pCR2.1 TOPO (Invitrogen 公司)；pIN 载体，等等。载体的系列，如 pFLAG (Sigma 公司)，pMAL (NEB 公司) 和 pET (Novagen 公司) 也可以用于表达如 FLAG 肽，malE-，或 CBD- 蛋白的融合蛋白的异体蛋白。这些重组的蛋白质可以被导入细胞周质间隙用于正确的折叠和成熟。被融合的部分可以用于被表达的蛋白质的亲和提纯。针对特异性蛋白酶（如胰凝乳蛋白酶）的切割位点的存在允许人们切割下所述优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物。pGEX 载体也可以用于表达如谷胱甘肽 S-转氨酶 (GST) 的融合蛋白的异体蛋白。通常，这样的融合蛋白为可溶性的并且可以容易地从裂解的细胞中被提纯，所述提纯是通过吸附和结合于谷胱甘肽琼脂糖珠基质然后在自由谷胱甘肽存在下洗脱。pGEX 载体被设计以包括凝血酶或凝血因子 Xa 蛋白酶切割位点，由此被克隆的靶基因产物可以从 GST 部分被释放。

[0221] 在昆虫系统中，可以使用许多表达外源基因的载体，例如，可以使用苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核型多角体病毒 (AcNPV) 作为表达外源基因的载体。所述病毒在诸如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞的细胞内生长。编码优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物的序列可以被单独克隆进所述病毒的非必需区（例如，多角体蛋白基因）并且被置于 AcNPV 启动子（例如，多角体蛋白启动子）的控制下。

[0222] 在哺乳动物宿主细胞中，可以利用许多基于病毒的表达系统。在腺病毒被用于作为表达载体的情况下，优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物的兴趣的编码序列可以被连接于腺病毒转录/翻译控制复合物，例如，晚期启动子和三联前导序列。然后这种嵌合的基因可以通过体外重组或体内重组插入腺病毒基因组。向病毒基因组的非必需区（例如，E1 或 E3 区）插入将得到在被感染的宿主中可存活并且能够表达优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物的重组的病毒。特异性起始信号也可以被要求用于编码被插入的优化的前胰岛肽（包括HIP）或其类似物或衍生物的序列的有效率的翻译。这些信号包括 ATG 起始密码子和邻近的序列。此外，所述起始密码子必须与期望的编码序列的读码框相同，以确保对完整插入的翻译。这些外源的翻译控制信号和起始密码子可以有多种来源，自然的和合成的两者。表达的效率可以通过包括合适的转录增强子元件、转录终止子

等等得到增强。

[0223] 此外,可以选择以合乎期望的特有的方式调节被插入的序列的表达,或修饰和加工基因产物的宿主细胞菌株。对蛋白质产物的这样的修饰(例如,糖基化)和加工(例如,切割)可以对所述蛋白质的功能为重要的。不同的宿主细胞具有对蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰形式为特征的和特异性的机制。可以选择适合的细胞系或宿主系同以确保对被表达的异体蛋白的正确的修饰和处理。为了这个目的,可以使用拥有针对初级转录和基因产物的翻译后的修饰(例如基因产物的糖基化和磷酸化)的合适的加工的细胞机制的真核宿主细胞。这样的哺乳动物宿主细胞包括但不限于 PC12、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20 和 T47D、NS0(不内源性生产任何免疫球蛋白链的小鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030、和 HsS78Bst 细胞。如果发现翻译后的修饰对于优化的 HIP 或其类似物或衍生物的期望的活性为不重要的,可以使用在细菌或酵母系统中的表达。

[0224] 为了合适地加工的优化的前胰岛肽(包括 HIP)或其类似物或衍生物的长期的、高产率的生产,细胞中的稳定表达是优选的。稳定地表达优化的前胰岛肽(包括 HIP)或其类似物或衍生物的细胞系可以通过使用含有可选择的标记的载体而被改造。以举例而非限制的形式,在所述表达构建体的引入之后,被改造的细胞可以被允许在富集的培养基中生长 1-2 天,并且然后转移到选择性的培养基。所述表达构建体中的可选择的标记将抗性赋予所述选择,并且取决于所采用的载体结构和宿主细胞,可以允许细胞稳定地将所述表达构建体整合于它们的染色体中并且在培养期间生长并且扩大成为细胞系。这样的细胞可以在长时间内培养,此时优化的前胰岛肽(包括 HIP)或其类似物或衍生物被连续地表达。

[0225] 可以使用很多选择体系,包括但不限于,抗生素抗性(标记诸如赋予对遗传霉素或 G-418 的抗性的 Neo;对博莱霉素(Zeocin)具有抗性的 Zeo;和对杀稻瘟菌素具有抗性的 Bsd);抗代谢物抗性(标记诸如赋予对甲氨蝶呤的抗性的 Dhfr 的);gpt,赋予对霉酚酸的抗性;以及 hygro,赋予对潮霉素的抗性。此外,变异的细胞系,包括但不限于胸苷激酶型,次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶型或腺嘌呤磷酸核糖转移酶型细胞,可以与承载与胸苷激酶、次黄嘌呤、鸟嘌呤或腺嘌呤磷酸核糖转移酶相应的基因的载体组合使用。本领域普遍已知的重组 DNA 技术的方法可以例行地应用以选择期望的重组的克隆,150 : 1。

[0226] 所述重组细胞可以在标准的温度,孵育时间,光密度和培养基组成条件下被培养。然而,用于重组细胞的生长条件可以与用于优化的前胰岛肽(包括 HIP)或其类似物或衍生物的表达的那些条件不同。改进的培养条件和培养基也可以用于增强优化的前胰岛肽(包括 HIP)或其类似物或衍生物的生产。本领域已知的任何技术都可以应用于建立用于生产优化的前胰岛肽(包括 HIP)或其类似物或衍生物的最佳条件。

[0227] 从通过重组的技术或自然来源提纯以生产优化的前胰岛肽(包括 HIP)或其片段的替代方法为肽合成。例如,整体的优化的 HIP 或其类似物或衍生物,或对应于优化的 HIP 或其类似物或衍生物的部分的蛋白质,可以通过使用肽合成器而被合成。可以使用常规的肽合成或本领域中众所周知的其他合成方案。

[0228] 具有优化的前胰岛肽(包括 HIP)或其类似物或衍生物或其部分的氨基酸序列的蛋白质可以通过固相肽合成被合成。在合成期间,具有被保护侧链的 N- α -被保护氨基酸被分步地添加至正在生长的多肽链上,所述多肽链通过其 C 末端连接并且连接至不可溶

的聚合的支撑体,即聚苯乙烯珠。蛋白质通过将 N- α -脱保护氨基酸的氨基基团连接至 N- α -被保护氨基酸的 α -羧基基团上而被合成,所述 N- α -被保护氨基酸通过与诸如二环己基碳二亚胺的试剂反应而被活化。自由氨基基团向所述活化羧基的附加 (attachment) 导致肽键的形成。最普遍使用的 N- α -保护基团包括 Boc (为对酸不稳定) 和 Fmoc (为对碱不稳定)。适合的化学物质、树脂、保护基团、被保护的氨基酸和试剂的细节为本领域中众所周知的并且因此不在本文中详细讨论。

[0229] 所得的优化的前胰岛肽 (包括 HIP) 或其类似物或衍生物的提纯使用常规的程序实现,例如使用凝胶渗透、分配和 / 或离子交换色谱的制备 HPLC。适合的基质和缓冲剂的选择为本领域中众所周知的并且因此不在本文中详细描述。

[0230] 通过对本发明的试剂和方法的前述的详细描述,提供以下实施例以描述本发明的各个方面。

[0231] 实施例 1

[0232] 体外 HIP 活性。体外研究在宾夕法尼亚大学人类胰岛实验室进行。人类胰岛和导管部分被培养多于 10 天并且然后在盲性研究中被处理。放射免疫分析法被用于测量所述人类胰腺培养中的胰岛素水平,所述人类胰腺培养被用作为阴性对照的炒肽 (scrambled peptide)、HIP3、HIP1、HIP2 和作为阳性对照的来源于仓鼠的 INGAP 处理。肽由 BachemBioScience (95% 纯度,研究级) 合成。

[0233] 复制培养在第 10 天和第 12 天被处理并且在 HIP 肽、对照和 INGAP 处理一周后,被裂解 (lysed) 以检测胰岛素含量。在 10 天的培养中,胰岛素生产量下降,并且然后,在用 HIP 肽处理之后,胰岛素重新被生产。

[0234] 如图 1 所示的导管部分图描绘了 y 轴上的胰岛素水平,所述水平在用人类胰腺导管组织培养中孵育之后,通过放射免疫分析测量。所述胰岛部分图指示在人类胰岛组织中孵育之后的胰岛素水平。在基线的胰岛部分中的基线胰岛素水平显著高于在基线的导管部分中的基线胰岛素水平。

[0235] 导管和胰岛组织使用 Ricordi 法进行分离。无论导管细胞还是胰岛的培养在本质上都不是完全均一的。本研究还暗示祖细胞,作为 HIP 的靶,在胰岛和导管培养中均被发现。重复本研究,得到相似的在以下图表中显示的结论,通过放射免疫分析,在用 HIP2 培养的人类导管组织之中具有增加了多达四倍的胰岛素水平。

[0236] 重复的研究确认了胰岛素在占绝大多数的人类导管细胞培养和胰岛培养中均有增加,其中基线导管培养中的基线胰岛素水平始终比胰岛培养中的基线胰岛素水平低约 1/3,在用 HIP 肽孵育之后与阴性对照相比具有在胰岛素含量上相似的上升。

[0237] 实施例 2

[0238] 体内研究。HIP3、HIP1 和 HIP2 已是小鼠中体内研究的对象。研究已显示这些 HIP 变异体在被引入糖尿病小鼠时刺激胰腺中祖细胞向新胰岛结构的分化。在小鼠中已发展出糖尿病模型 (Rosenberg 等人,2004)。选择受试者数目以得到足够数目的用于本研究的糖尿病动物并且动物被随机地分配至研究组。所有动物每天两次 (午前和午后) 通过腹腔注射被定量给药,连续进行 28 天。在定量给药阶段期间,剂量给予的时间保持一致 (± 2 小时)。在确认小鼠已经患糖尿病 (血糖大于 16.7 mmol/L (300 mg/dL)) 至少 1 星期后,小鼠被定量给药。

[0239] 使用在 pH4.5 的柠檬酸缓冲液中的 40mg/kg 的链脲霉素通过腹腔注射小鼠,连续进行 5 天,试图使它们患糖尿病。小鼠必须曾经具有大于 16.7mmol/L(300mg/dL) 的血糖至少 1 星期,以被认为患有糖尿病。如果任何动物的血糖水平升高至 400mg/dL 以上,所述动物使用胰岛素处理。每 3 天,在每天的相同时间,在尾巴上刻一个缺口并且和收集一滴血液。使用葡萄糖计确定葡萄糖测量。组别分配和剂量水平如下在表 1 中:

[0240] 表 2.

[0241]

组别	处理	剂量水平	剂量体积	动物数目
1	载体	0	100 μ L	6
2	HIP3	250 μ g	100 μ L	6
3	HIP1	250 μ g	100 μ L	6
4	HIP2	250 μ g	100 μ L	6

[0242] 研究终点包括以下:葡萄糖变化;胰岛素需求变化;以及死后胰腺的组织学。

[0243] 胰岛素需求变化。在用 HIP 处理过的小鼠中可见胰岛素需求和胰岛素需求的下降速率都有显著的减少,如图 2 所示。用 HIP2 处理过的小鼠在第 21 天完全不需要胰岛素。

[0244] 葡萄糖水平的变化。与对照比较,在所有用 HIP 处理过的组中,葡萄糖从基线起有平均减少,并且这种减少在所有用 HIP 处理过的组中都显著,如图 3 所示。在 HIP1 和对照之间平均葡萄糖降低 14.7%,在 HIP2 和对照之间平均葡萄糖降低 29.4%,并且在 HIP1 和对照组之间平均葡萄糖降低 57.3%。所述数据显示了,与对照糖尿病小鼠相比,在所有用 HIP 处理过的小鼠组胰岛素需求有对显著的更快速率的减少。在小鼠胰腺中观察到 HIP 处理之后,有显著更多数目的胰岛,所述小鼠胰腺在每只被研究的小鼠中都被切开和复查。使用表 3 中的以下数据,所述胰腺被组织学家盲性评估。

[0245] 表 3.

[0246]

	总胰岛 (% 增加)	总胰岛质量 (μ m ²) (% 增加)
安慰剂	280	854364
HIP2	454(62%)	2161782(153%)
HIP3	410(46%)	1703513(99%)

[0247] HIP 和安慰剂之间胰岛数目的差异为统计上显著的 ($p = 0.022$)。在用 HIP 处理过的小鼠和用安慰剂处理过的组之间,在胰岛面积甚至有更大的增加。用 HIP2 处理过的组的胰岛面积为 360,297 μ m²,用安慰剂处理过的组的胰岛面积为 142,394 μ m²,用 HIP3 处理过的组的胰岛面积为 283,918 μ m² ($p = 0.05$),如图 4A 所示。图 4B 显示 HIP2B 提高了糖尿病小鼠中的胰岛数目。(a) 在用安慰剂处理过的和用 HIP 处理过的小鼠中的胰岛素免疫染

色的代表性图像。(b) 胰岛素着色的胰岛被用黄色勾勒出轮廓以将这些结构区分于自发荧光血细胞。

[0248] 还在小鼠胰腺上进行对胰岛素的免疫荧光染色,用 HIP 处理过的小鼠表现出更高的胰岛素染色程度,如图 5 所示。本小鼠胰腺组织被采集并且固定于 4%全氟烷氧基树脂 (PFA) 中,被封闭和切片。10 倍物镜,1.6optivar。

[0249] 实施例 3

[0250] 以下实施例描述了合成和提纯 HIP 和优化的 HIP 的示例性方法。

[0251] HIP 肽的合成通过由 Merrifield 提出的普通的固相程序 (Merrifield, R. B. 1963, J. Am. Chem. Soc. 85 :2149-2154), 使用标准的 Fmoc 保护化学 (Fields, G. B. 和 Noble, R. L. 1990, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 161-214)。

[0252] 树脂结合保护的肽通过在清除剂存在下使用三氟乙酸 (TFA) 处理被裂解和脱保护,以得到粗产物。提纯的肽产物通过反相高效液相色谱 (HPLC) 获得。

[0253] 肽的聚乙二醇 (PEG) 的衍生化可以由引入分子量范围在 300 至 43,000 间的离散 PEG 单元组成。

[0254] 实施例 A :Ac-IGLHDPTQGTEPNG-NH₂ (HIP2B) (SEQ ID NO :7)。从 Rink 酰胺树脂, 4-(2', 4' -二甲氧基苯基 -Fmoc-氨基甲基)-苯氧基树脂起始,Fmoc 保护的氨基酸依次地引入并且使用 HOBt 和 DCC(N-羟基苯并三唑和二环己基碳二亚胺) 偶联 (coupled)。起始树脂和每个氨基酸的被 Fmoc 保护的基团的 Fmoc 脱保护通过二甲基甲酰胺中 20%的哌啶实现。在所述 N 末端氨基酸 Ile 的 Fmoc 保护基团被移除之后,树脂结合保护的肽使用二氯甲烷中 20%的乙酸酐被乙酰化。侧链基团的脱保护和所述肽从树脂的裂解通过伴随以 2.5%水和 2.5%三异丙基硅烷的 95%的三氟乙酸的溶液实现。在 1 小时的处理之后,使用乙醚使所述肽从裂解溶液中沉淀,过滤并干燥。

[0255] 提纯。所述粗产物通过反相高效液相色谱 (HPLC) 在 C-18 支撑体 (support) 上被提纯,使用水中 0.1% TFA 和乙腈中 0.1% TFA 分别作为缓冲剂 A 和 B。使用增加梯度的缓冲剂 B 洗脱所述产物。残留 TFA 与乙酸盐的交换通过再次将产物级分 (fraction) 施加于 C-18HPLC 柱上,用 0.1M NH₄OAc 水溶液洗涤以及在水和乙腈 (作为流动相) 中 1%乙酸的梯度下洗脱所述产物而实现。收集纯产物级分并冷冻干燥。肽的特性 (identity) 和均一性通过氨基酸组成分析、分析性 HPLC 和质谱分析确认。

[0256] 实施例 B :IGLHDPTQGTEPNG (HIP2) (SEQ ID NO :4)。从 Fmoc-Gly-Wang 树脂起始,肽序列如实施例 A 中被组装。氨基末端未被乙酰化,以提供具有未被封闭的自由氨基和羧基末端的肽。被提纯产物如实施例 A 中被分离。

[0257] 实施例 C : (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂)₂ (HIP2B CysDimer) (SEQ ID NO :19)。肽的自由硫醇形式的合成如实施例 A 中描述的。粗产物通过在 2mL 乙酸中溶解大约 2g 肽并且用 ~ 500mL 蒸馏水稀释被氧化以形成二聚物,pH 通过逐滴添加 20% NH₄OH 溶液被调整至 ~ 8.2。所述溶液被允许在室温下搅拌过夜。所述反应在过夜后未达到完成。为完成所述反应,添加 1%铁氰化钾溶液直至保持持续的黄绿色。通过 Ellman 测试和 HPLC 分析判断所述反应的完成。然后被氧化的肽的溶液使用 3-5g AG-1X2 离子交换 (氯化物形式) 树脂搅拌 30 分钟,过滤,并且在 HPLC 提纯之前用乙酸调整 pH 至 ~ 5。

[0258] 实施例 D : (IGLHDPTQGTEPNGC)₂ (HIP2 Cys 二聚物) (SEQ ID NO :13)。从

Fmoc-Cys(Trt)-Wang 树脂起始,肽序列如实施例 2 中被制备。如实施例 C 中描述的实现所述粗产物的酰沉淀,到二聚物的氧化和 HPLC 提纯。

[0259] 实施例 E :Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂ (HIP2B Cys) (SEQ ID NO :16)。如实施例 A 中实现单体主要序列的合成和提纯。

[0260] 以下实施例描述了制备封闭的 HIPs 的示例性方法。HIP 封闭的肽通过固相肽合成 (SPPS) 制备。固相合成的基本前提是,当肽链的一端固定于不可溶支撑体时,氨基酸可以被组装成任何期望序列的肽。如以上提到的,在实际的 SPPS 中,所述肽的羧基末端连接于所述聚合物。在氨基酸的期望的序列已经共同连接于所述支撑体上之后,可以应用试剂以从所述支撑体裂解所述肽链并且将粗肽释放进溶液中。所述合成中涉及到的所有反应,如果可能的话,都进行到完成,由此能够获得均一的产物。

[0261] 当肽的 C 末端为酰胺时,衍生物为肽酰胺。肽酰胺为极重要的衍生物,因为许多在天然存在的肽激素以酰胺的形式呈现。为了合成肽酰胺,已经开发出固相树脂,所述固相树脂在裂解时直接得到肽酰胺。当 N 末端为乙酰基基团时,所述肽从 C 末端向 N 末端组装。然后 N 末端在碱存在下使用乙酸酐被乙酰化。

[0262] Fmoc-氨基酸衍生物用于构建所述序列。在氨基酸期望的序列共同连接于所述支撑体上之后,所述肽被乙酰化、过滤和干燥。然后所述乙酰化的肽-树脂被使用含有清除剂的三氟乙酸 (TFA) 裂解,以从所述支撑体以及所有保护基团释放所述肽。然后使用高效液相色谱 (HPLC) 提纯粗材料。

[0263] 实施例 F :Ac-IGLHDPTQGTEPNGC(PEG)-NH₂ (HIP2B Cys-PEG) (SEQ ID NO :25)。来自实施例 5 的肽的单体已提纯形式 (1.1 当量) 被溶解于乙酸缓冲液 (0.1M, pH = 6.5)。马来酰亚胺衍生的聚乙二醇 (PEG 马来酰亚胺) 的溶液 (1 当量) 在蒸馏水中制备并且被在搅拌下添加进所述肽溶液。所得溶液的 pH 用稀 NH₄OH 溶液被调整至 ~ 6.5,在室温下搅拌 30 分钟,用几滴乙酸酸化并且通过 HPLC 提纯。

[0264] 实施例 G :IGLHDPTQGTEPNGC(PEG) (HIP2 Cys-PEG) (SEQ ID NO :22)。从 Fmoc-Cys(Trt)-Wang 树脂起始,如实施例 B 中所描述的合成和提纯主要序列。如实施例 F 中使用 PEG 马来酰亚胺衍生化后接着 HPLC 提纯。

[0265] 实施例 H : (PEG)-IGLHDPTQGTEPNG(PEG-HIP2) (SEQ ID NO :91)。树脂结合的主要肽的序列如实施例 2 中被制备。在 N 末端 Ile 的 Fmoc 脱保护之后,被保护的肽树脂使用 HOBT 和 DCC 作为偶联剂通过 PEG-羧酸衍生化。如实施例 A 中所描述的从树脂裂解并提纯 (PEG)-肽。

[0266] 实施例 4

[0267] 以下实施例阐明了被裂解为 HIP2 的 HIP1 的肌肉给予和皮下给予的药物动力学。

[0268] 评估了使用 20 只大鼠,每种给予途径 5 只大鼠的 HIP 递送的药物动力学。类似于来源于仓鼠的 INGAP 的发现,肌肉 (IM) 的途径提供了所述材料的更好的血液浓度,但是通过 ELISA 测量确定的半衰期少于 30 分钟,如图 6 所示。

[0269] 皮下 (SQ) 的给予途径显示出略微更长的半衰期,如图 7 所示,但是 ELISA 所检测到的水平为小于 IM 途径的水平。在血液中 IM 途径提供比 SQ 略微更长的半衰期。

[0270] 实施例 5

[0271] 以下实施例显示 HIP2B 肽在冻融研究中的稳定性。

[0272] 实验程序。本研究以二组起始,每组八个样品。一个组被保持在 4-8°C 而另一组保持在 25°C,作为为期 2 个月的稳定性研究的一部分。每个样品含有在 5 微升蒸馏水中的 4.57 毫克 HIP2B。每 7 天从每个温度组取出一个样品并且置于零下 20°C 的冷冻器中用于储存,直至可以进行液相色谱/质谱(LC/MS)分析。在所述稳定性研究中,在 1、2 和 3 个星期后,一系列样品通过与 HIP2B 的对照样品对照进行评估,所述对照样品在本研究的起始已被制备并且在 -20°C 储存。在上文描述的每个温度的 3 个星期的稳定性测试后,所有样品,如 LC/MS 所确定,都未发生变化,并且因此被认为在 1、2 和 3 个星期稳定。本稳定性冻融研究表明,当所述 HIP 序列储存在二甲亚砜(DMSO)中时,在所述 HIP 序列中的 Pro-Asn 连接处发生碳位移,当在 -20°C 储存在生理盐水中时,所述序列在几个月内保持稳定。

[0273] 实施例 6

[0274] 优化的 HIP 展示出随时间(T)推移,对于体外对血清蛋白酶的增加的肽稳定性。

[0275] 所述肽在 37°C 在人血浆中孵育。样品孵育进行多于 1 小时的时间。使用 1、5、10、30 和 60 分钟各个时间点跟踪反应。在每个时间点的血浆蛋白酶的失活通过在 100°C 加热所述样品 1 分钟实现。在操作完成之后,所述由血浆处理的样品通过与质谱相连的反相色谱,即 HPLC/LC-MS,与对照样品对照进行评估。

[0276] 用 HIP 和优化的 HIP 肽处理的血浆在第 1、5、10、30 和 60 分钟进行评估。在每个时间点,0.70mL 血浆被移液器移入 10mL 试管。向每个试管添加 0.30mL HIP 或优化的 HIP 肽的储备溶液(1.66mg/mL),所述储备溶液在由磷酸盐缓冲的盐溶液中制备。所述血浆/肽样品在每个时间点在 37°C 被孵育,随后在 100°C 加热以使血浆蛋白酶的蛋白水解的活性失活。在失活之后,所述样品用 1mL 水稀释,离心并且移除上清液以进行分析。

[0277] 样品在 C-18 反相柱(50mm×2.0mm)上分析,使用水中 0.07% TFA 作为缓冲液 A 和乙腈中 0.07% TFA 作为缓冲液 B。使用在 10min 中从 98% A/2% B 渐进至 30% A/70% B 的线性梯度以 0.4mL/min 的流速进行。使用波长 220nm 的紫外线和质谱监控洗脱液。由血浆处理的肽(37°C)的色谱图和肽基准样品及血浆对照之间的对比被用于确定肽对血浆处理的相对稳定性。

[0278] 对照

[0279] T = 0 :血浆(0.7mL)与肽储备溶液(0.3mL),在 100°C 加热 1min。添加 1mL 水,离心。

[0280] 血浆背景对照 :0.7mL 血浆与 PBS(0.3mL),在 100°C 加热 1min,添加 1mL 水,离心。

[0281] 热处理的肽基准 :肽储备溶液(0.3mL)与 0.7mL PBS,在 100°C 加热 1min,添加 1mL 水。

[0282] 未加热的肽基准 :肽储备溶液(0.3mL)添加 0.7mL PBS 与 1mL 水。

[0283] 结果。

[0284] HIP2(IGLHDPTQGTEPNG)(SEQ ID NO :4) 在 HIP2 孵育仅 1min. 后通过新组分(≈ 5%)的出现得到蛋白水解的证据。所述新组分随时间推移持续增加。在 30min., 所述新组分表现 ≈ 50%, 并且在 60min., 浓度为 ≈ 70%。主要的代谢产物被识别是 GLHDPTQGTEPNG(SEQ ID NO :92), 表明主要损失 N 末端的异亮氨酸。此外,有证据表明出现由 IGL 的损失造成的少量的 HDPTQGTEPNG(SEQ ID NO :93)。

[0285] HIP2B(Ac-IGLHDPTQGTEPNG-NH₂)(SEQ ID NO :7)HIP2 的 N-乙酰化 C-酰胺形式在

37°C 孵育 1hr 后看上去对血浆蛋白酶完全稳定。

[0286] HIP3 (IGLHDPTQGTEPNGE) (SEQ ID NO :3) HIP3 的蛋白水解的速度小于 HIP2 的蛋白水解的速度。在 60min. 后, HIP3 的起始浓度为 $\approx 50\%$ 。被识别出的主要代谢产物为 HDPTQGTEPNG (SEQ ID NO :93), 表明 IG 的损失。

[0287] HIP3B (Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-NH₂) (SEQ ID NO :5) HIP3 的被封闭形式在高达 1hr 的血浆孵育内为完全稳定。

[0288] HIP2B Cys-Dimer (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH₂)₂ (SEQ ID NO :19) 本化合物在至少 1 小时内看上去为对血浆蛋白酶稳定。然而, 对孵育的样品的 100°C 热处理以及所述 T = 0 对照都表明起始材料向结构为 的胱氨酸加合物的转化。

[0289] Ac-IGHDPTQGTEPNGC (C) -NH₂。 (SEQ ID NO :94) 转化看上去是由于当所述样品在 100°C 加热时被来自血浆的半胱氨酸替代。

[0290] HIP2B Cys-PEG (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC (PEG) -NH₂) (SEQ ID NO :22)。本高分子量结构在高达 1 小时内为对血浆蛋白酶稳定。

[0291] 结果。HIP2 和 HIP2B 肽在血浆中的蛋白水解如图 8 所示。HIP2 的结果显示在血浆中孵育仅 1 分钟后出现新组分 ($\sim 5\%$)。此新组分随时间推移持续增加和表现, 并且主要代谢产物被识别为初级损失了 N 末端异亮氨酸并且次级地损失了前三个氨基酸的 HIP2 序列。HIP2B 表现出在 37°C 孵育 1 小时后对血浆蛋白酶完全稳定。称为 HIP2B 和 HIP3B 的 HIP2 和 HIP3 的被封闭形式在高达 1 小时内明显地比未被封闭的结构对血浆蛋白酶更稳定。HIP2B 的二聚物和 PEG 衍生物也非常稳定。

[0292] 实施例 7

[0293] 利用从被称为 PANC-1 的人胰腺上皮样细胞生长确立无限增殖人类细胞系的技术, 评估 HIP 和优化的 HIP 对胰岛素生产的影响的体外影响。所述细胞系展示出根据适合的信号分化为其他胰腺细胞种类的能力。因此, PANC-1 细胞被用作胰腺的天然存在的祖细胞的代用物。

[0294] Panc-1 细胞在 T75 烧瓶中的含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。所述细胞于 37°C, 5% CO₂ 孵育 24 小时, 然后用最终浓度为 167nM 的 HIPs 处理。本处理每天进行一次共进行四天。在第五天所述细胞被破碎以获得细胞裂解液。在这些细胞提取物中, 确定总蛋白质水平, 并且使用 50 微克的总蛋白质进行蛋白质印迹分析。含有 50 微克蛋白质的样品在含有或不含 5% 的还原剂 β -巯基乙醇的上样缓冲液中被稀释, 并且被上样至凝胶的每个胶孔中。在电泳并且将蛋白质转移到硝化纤维素膜后, 以鸡多克隆抗胰岛素抗体 (ab14042, 1/2000 稀释) 作为一抗, 兔多克隆 -HRP 结合抗鸡 (对 NIT 凝胶 1/1000 稀释, 对 PANC-1 凝胶 1/2000 稀释) 作为二抗, 检测了胰岛素的存在。

[0295] 图 9 为展示从 PANC-1 细胞的人类胰岛素表达响应于使用 HIP 和优化的 HIP 的孵育的蛋白质印迹分析。下标为 A 的条 (panel) 展示了当所述样品在非还原条件被上样时 Panc-1 细胞中针对胰岛素的带。结果表明, HIP2、HIP2B 和二聚 HIP2 与 PEG 化的 HIP2 或对照相比刺激了更高的胰岛素产量。在还原条件, 连接胰岛素中两个多肽链的二硫键被还原, 并且因此所述链被分离, 并且, 在这种情况下, 所述胰岛素抗体不与胰岛素反应。与非还原条件相反, 胰岛素分子为完整的并且被所述抗体所识别。

[0296] 图 9B 显示了与图 9A 中的膜相同的膜中所包含的总蛋白质。通过丽春红染色的总

蛋白质水平的确定展示了不同泳道含有相似量的蛋白质。确定 NIT-1 和 PANC-1 细胞中的总蛋白质水平,并且使用 50 微克总蛋白质进行蛋白质印迹分析。含有 50 微克蛋白质的样品在含有或不含 5% 的还原剂 β -巯基乙醇的上样缓冲液中被稀释,并且被上样至凝胶的每个胶孔中。

[0297] 所述丽春红染色展示出,响应于不同的 HIPs 和优化的 HIPs 的胰岛素表达的不同与上述胶孔中被上样的蛋白质的量无关。而且,针对胰岛素(例如,还原条件中的膜)的信号缺失不是蛋白质缺失的原因。

[0298] 实施例 8

[0299] HIP 和优化的 HIP 肽对于 PANC-1 细胞系的细胞形态的影响。所述细胞使用 HIP 和优化的 HIP 肽处理四天。在图 10A(以 200 倍放大取得于第 7 天),可以看到对照条件与使用 HIPs 和优化的 HIPs 处理的细胞之间形态上的差异,后者具有在组织学上更加分化的细胞(特别是由 HIP2B 处理的细胞中)。图 10B 显示了细胞形态在 7 天内的变化进程,对照在顶部,HIP2 在中部以及 HIP2B 在底部。各图以 200 倍放大,取得于第 1、2、3、5 和 7 天。由对照处理的细胞看上去没有经历任何变化,而由 HIP2 和 HIP2B 处理的细胞显著地偏离它们初始的外观。图 10C 展示了当 HIP2 Dimer 和 HIP2 PEG 在 PANC-1 细胞培养中被处理时在形态变化的进程。总体来说,由对照处理的细胞没有经历任何显著的视觉变化,由 HIP2 和 HIP2B 处理的细胞显著地偏离它们初始的外观。

[0300] 实施例 9

[0301] 人胰腺组织培养中的 HIP2B 活性。宾夕法尼亚大学人类胰岛实验室展示了在人胰腺导管细胞培养中 HIP 和优化的 HIP 肽的影响。人类胰腺细胞的导管级分在胶原基质中培养 10 天,然后每隔一天使用 HIP2B 处理。细胞使用针对 CK19 的双抗体染色(针对导管组织的标记物)和 DAPI 染色做标记,以显示细胞核和胰岛素。如图 11 所示,细胞经历形态上的变化,所述变化诱导胰岛素在非诱导时为胰岛素阴性的细胞中的表达。

[0302] 实施例 10

[0303] HIP 和优化的 HIP 肽在非肥胖糖尿病模型中的影响的试点数据。

[0304] 与由 STZ 处理的小鼠(见上文)的增加了的胰岛质量、面积和数目的数据相一致,试点的 NOD 小鼠模型展示出针对优化的 HIP 在胰岛新生方面提供更好的效力的潜力的初步的证据,如由在 HIP 处理 39 天后的小鼠的 C-肽水平所测量的。

[0305] 所述非肥胖糖尿病(NOD)模型被用作针对 1 型自身免疫性糖尿病模型。糖尿病的这种形式为最具挑战性,在于对胰腺和其胰岛素产量的潜在破坏是由自身免疫性攻击导致的。因此,为了显示在这种形式的糖尿病中确切的胰岛新生,必须与 HIP 组合使用免疫耐受剂。所述 NOD 小鼠模型为极度困难的模型。因为许多小鼠可能仅暂时地成为患糖尿病的小鼠并得到缓解,而其他发展为严重的糖尿病。在这种转基因小鼠模型中的定时干涉难以确定。

[0306] 在使用免疫耐受剂,利索茶碱(lysophylline, LSF, 正在开发中)的初步研究中,三只 NOD 小鼠患上糖尿病并且随机地施以安慰剂与 LSF, HIP2 与 LSF, 以及 HIP2B 与 LSF。如图 12 所示,在适合的时间接收到 LSF 的组中,与单独由 LSF 处理的在研究中始终具有逐步升高的葡萄糖的 NOD 小鼠相比,两个由 HIP 处理的组在所述研究期间以稳定改善的葡萄糖水平作为响应。虽然并非统计上显著的研究,这些数据提供了针对免疫耐受剂和 HIP 组

合以治疗 1 型糖尿病的探索的非常可信的证据。

[0307] 实施例 11

[0308] HIP2B 和 HIP2 对 HIP 受体的影响。以下成套的研究展示了,在针对与 HIP 的细胞质膜受体之间的相互作用中以及在从受体到细胞核的运输 (trafficking) 中, HIP2B 与 HIP2 同样有效。针对人类前胰岛素的受体在稳定的人类胰腺细胞系中使用双抗体方法被标记。第一抗体为兔多克隆,并且第二抗体为使用 Cy3 荧光染料标记的羊 - 抗兔。

[0309] 这些细胞通常生长在无血清培养基 (SFM) 中,并且当使用胰蛋白酶处理时,被去稳定并使其有能力经历发育的变化。细胞在含有及不含 HIP 的无血清培养基中以及在含有胰蛋白酶的无血清培养基 (TSFM) 中培养。这是为了显示简单的去稳定,不激活发育的变化。

[0310] 当在稳定条件下使用 HIP 处理时,不导致变化。当在发育的优质条件下由 HIP 处理时,被标记的受体通过被细胞质膜包裹并移动至核膜响应 HIP 的存在,所述核膜是接收针对分化的信号的地点。

[0311] 当在稳定条件下使用 HIP 处理时,不导致变化。当在发育的优质条件下由 HIP 处理时,被标记的受体通过被细胞质膜包裹并移动至核膜响应 HIP 的存在,所述核膜是接收针对分化的信号的地点。

[0312] 图 13 展示了由胰蛋白酶处理的并在无血清培养基中孵育的 PANC-1 细胞分化成胰岛细胞团。HIP 受体在人类胰腺细胞分化期间被上调并且看上去与 HIP2 和 HIP2B 相互作用。HIP2 和优化的 HIP2B 刺激了从细胞质膜上的 HIP 受体向刺激胰腺祖细胞分化成产生胰岛素的新胰岛的细胞的细胞核的移动。

[0313] 图 14 展示了由 Cy3 标记的在 (A) 单独的 TSFM 和 (B) 具 $150 \mu\text{M}$ (优化的 HIP2B) 的 TSFM 中 48 小时的兔 - 抗人 HIP 受体的抗体。HIP 刺激所述与受体膜结合的蛋白质被细胞质膜包裹并被运送至核膜。

[0314] 图 15 展示了优化的 HIP2B 对 HIP 受体 (EXTL3) 的影响的重复的免疫荧光分析。上条显示了 EXTL3 的 Cy3 免疫荧光染色 (红色)。在图的下条中 EXTL3 的 Cy3 免疫染色已经被细胞核的 DAPI (蓝色) 染色所覆盖。细胞在标准的生长培养基中生长作为对照,并且与 HIP 存在或不存在下在无血清培养基中生长的细胞相比较。黄色箭头展示了在标准的生长培养基中生长的 EXTL3 的表面表达的例子。细胞的边界清晰,表明 EXTL3 在质膜上的表面表达。黄色箭头勾勒出细胞的边界,而细胞核显示为蓝色。中间的图像为在 SFM 中生长的细胞。EXTL3 定位于细胞质中,如细胞质的 Cy3 染色所表明的。绿色箭头表示在细胞核的位置缺乏染色。在生长于 SFM 中的细胞的下方图中绿色箭头展示出细胞核的鲜明的蓝色 DAPI 染色,表明 EXTL3 在细胞核中的缺失。在生长于 SFM 和 HIP 中的细胞的上方图中,由蓝色箭头指示的 EXTL3 免疫染色在核中的存在表明 EXTL3 向核迁移。在生长于 SFM 和 HIP 中的细胞的下方图中,蓝色箭头表明细胞核的位置。在下方图中有 EXTL3-Cy3 染色和细胞核 DAPI 染色的重叠,证实了 EXTL3 在细胞核的定位 (蓝色箭头)。在所有图像中比例尺为 $20 \mu\text{m}$ 。

[0315] 图 16 展示了优化的 HIP2B 增进 HIP 受体 (EXTL3) 在 PANC-1 细胞中从细胞质膜向细胞核的迁移。细胞质内和细胞核级分中的 HIP (EXTL3) 水平的蛋白质印迹分析在所示的时间点分离。蛋白质印迹分析展示了在无 HIP 的 SFM 中培养 6 小时后观察到 HIP 受体 (EXTL3) 的更高的细胞核水平。向培养基中添加 HIP2 和 HIP2B 增进 EXTL3 细胞核的迁

移,这由这种蛋白质在 30 分钟的更高的核水平展示。这些比较表明,在 HIP 存在下,EXTL3 从细胞质腔 (compartment) 向细胞核的增进的迁移时间,并且所述 EXTL3 核迁移可以通过 HIP 的存在进行调整。蛋白质印迹为使用这些细胞和时间点得到的重复的结果。

[0316] 实施例 12

[0317] 在随机的 HIP2、HIP2B 相对安慰剂的安慰剂对照研究中,八十 (80) 只小鼠用 STZ 处理以诱导糖尿病。小鼠被监控,直至它们达到与糖尿病的发作相一致的高血糖的水平。用于干涉小鼠的基线葡萄糖水平平均化为 $300 \pm 6 \text{mg/dL}$,并且在 HIP 干涉组和安慰剂组之间的葡萄糖水平中没有统计上显著的不同 ($p = 0.301$)。

[0318] 36 天后,所有 HIP 处理的小鼠不需要胰岛素,并且与安慰剂组相比,葡萄糖有显著的下降趋势。随机挑选的小鼠在对它们的胰腺的免疫组织化学进行研究的过程期间被宰杀。进行对于血清的 C-肽分析。在干涉的 39 天之后,在接下来的 60 天内,每天将测试剩余的小鼠的葡萄糖水平和总体健康状况。

[0319] 初步的评估展示了,HIP 处理导致与安慰剂相比有 38.7% 的减少 ($p < 0.05$)。此外,HIP2 形成 HIP2B 的稳定化未使体内活性下降。

[0320] 如图 17 所示,HIP 处理导致 116mg/dL 的葡萄糖水平较安慰剂低 ($\downarrow 38.7\%$, $p < 0.05$)。所有 HIP 处理的小鼠都脱离胰岛素。HIP 处理过的小鼠的 56% (9/16) 具有小于 230mg/dL 的葡萄糖水平。安慰剂处理的小鼠的 9% (1/11) 具有小于 230mg/dL 的葡萄糖水平。HIP2B 在 37 摄氏度下在体外在血清中显著地更稳定。HIP2B 还在盐溶液中具有更长的半衰期。对 HIP2 的形成 HIP2B 的修饰未削弱体内活性。

[0321] 为评估 HIP2B 的治疗潜力,利用了由 STZ 诱导的糖尿病小鼠模型。六十只 C57BL/6J 小鼠使用在柠檬酸缓冲液 (pH 4.5) 中 50mg/kg 的 STZ 腹膜内注射,注射连续 5 天,以使它们患糖尿病。当血糖水平在连续两天内都为 $\geq 200 \text{mg/dL}$ 时,小鼠被随机选择用于本研究。每日使用一滴血液监控血糖,所述血液通过在尾巴顶端割出刻痕收集。使用葡萄糖计确定葡萄糖的测量。如果任一动物中的血糖水平升高至 $\geq 324 \text{mg/dL}$,所述动物使用胰岛素处理 (1 单位每天,甘精胰岛素,肌肉) 直至血糖降至 324mg/dL 以下。做胰岛素定量给药的记录,由此能够进行对胰岛素需求的比较。额外的 3 只动物不用 STZ 处理,并用于确立非糖尿病基线值。

[0322] 将动物分配为三组,如表 4 所示。使用载体对照、HIP2 ($300 \mu\text{g}$) 或 HIP2B ($300 \mu\text{g}$) 对糖尿病动物进行连续 39 天的每天两次 (午前和午后) 腹腔注射。来自处理组 (arms) (组 1-3) 的每个的小鼠在第 39 天被宰杀。在宰杀的前一天的晚上,所有小鼠被禁食,得到在宰杀之前测量的的午前葡萄糖水平,所述午前葡萄糖水平被认为是空腹葡萄糖水平。保持剩余的动物组从第 40-60 天无医学干涉。它们每天接受午前葡萄糖测量和胰岛素给予 (在合适的情况下)。研究终点包括以下:1) 血糖变化和 2) 胰岛素需求变化。

[0323] 表 4:使用 STZ 所致的糖尿病小鼠的随机分组

[0324]

组	处理	用量	剂量水平	剂量体积	动物数目

1	载体	每天注射 2IP, 共 39 天	0	100 μ L	20
2	HIP2	每天注射 2IP, 共 39 天	300 μ g	100 μ L	20
3	HIP2B	每天注射 2IP, 共 39 天	300 μ g	100 μ L	20

[0325] 在本研究的过程期间, HIP2 和 HIP2B 组的血糖水平较之对照组都具有显著的降低。然而, 两个 HIP 组的血糖水平之间没有不同。图 17 展示了到第 36 天为止, 对 HIP2 形成 HIP2B 的修饰未削弱体内活性。HIP 处理导致 116mg/dL 的葡萄糖水平较安慰剂低 (\downarrow 38.7%, $p < 0.05$)。所有使用 HIP 处理的小鼠都脱离胰岛素。用 HIP 处理过的小鼠的百分之五十六 (56) (9/16) 具有小于 230mg/dL 的葡萄糖水平。安慰剂处理的小鼠的百分之九 (9) (1/11) 具有小于 230mg/dL 的葡萄糖水平。

[0326] 图 17 为描绘在给予 HIP2、HIP2B 和安慰剂之后 STZ- 糖尿病小鼠模型中的平均每日葡萄糖水平的图。平均基线葡萄糖水平为 300mg/dL \pm 2mg/dL, 在安慰剂和 HIP 处理的组之间没有显著的不同 ($p = 0.301$)。

[0327] 图 18 为描绘由 HIP2B 处理的组 (绿色) 和对照 (紫色) 和安慰剂组的小鼠中每日葡萄糖水平的图。每个组的线的斜率 (图 18) 代表葡萄糖水平的变化的速率, 我们称为“再生速度”。在本研究从第 1 天至第 39 天的过程中, HIP2B 处理导致葡萄糖水平下降的速率 (再生速度) 为 -0.602, 与其相比, 用安慰剂处理的组的葡萄糖水平升高的速率为 +0.381。

[0328] 图 19 展示在本研究的第 1 天和第 38 天的葡萄糖的不同, 比较 HIP2B、HIP2 和安慰剂。图 19 展示了在干涉的开始和结束时在优化的 HIP2B 接收者 (黄色)、由 HIP2 (绿色) 和由对照 (蓝色) 处理的组的小鼠之间改善了的葡萄糖控制。对照组具有相对于基线有 28.9mg/dL 至 334.6mg/dL 的平均增加。HIP2B 和 HIP2 组相对于基线有显著减少, HIP2B 组具有 235.3mg/dL 的平均非空腹葡萄糖 (相对于对照 $p = 0.024$) 并且 HIP2 组具有 231.6mg/dL 的平均非空腹葡萄糖 (相对于对照 $p = 0.029$)。

[0329] 图 20 展示了在本研究结束时在处理组之间的空腹葡萄糖水平。所述优化的 HIP2B 处理的组在研究结束时具有 106.7mg/dL \pm 0.58mg/dL ($p = 0.046$) 的空腹葡萄糖, 而由安慰剂处理的对照具有 258.00 \pm 84.5mg/dL 的平均空腹葡萄糖。用未被封闭的 HIP2 处理过的小鼠具有 115.3mg/dL \pm 16.5mg/dL ($p = 0.050$) 的平均空腹葡萄糖, 与用安慰剂处理过的组比较。

[0330] 图 21 展示了在所述处理过程之后且在宰杀之前在动物上进行的葡萄糖耐量测试结果。在 37 摄氏度优化的 HIP2B 在体外在血清中显著地更稳定。优化的 HIP2B 在盐溶液中还具有更长的半衰期。对 HIP2 的形成 HIP2B 的修饰未削弱体内活性。

[0331] 实施例 13

[0332] 为评估 HIP2B 的治疗潜力以及为显著改善糖血控制所必需的 HIP2B 最低有效剂量, 进行利用由 STZ 诱导的糖尿病小鼠模型的剂量响应研究。

[0333] 图 22 展示了, 当在小鼠的糖尿病模型中以变化的药剂量递送, 以确定产生最大效

力的最低潜在用量时,为评估和比较优化的 HIP2B 在葡萄糖控制上的效果,而进行的 HIP2B 的剂量响应分析的结果。本研究为在由 STZ 处理的小鼠模型中为了确定五种浓度的 HIP2B 对糖血控制和糖尿病衰减的影响的随机的试验。处理组在 100uL 生理盐水中优化的 HIP2B 的最大 1000 微克 BID 至 0.1 微克 BID 的范围内变化。所述六个研究组为以下所列。

[0334]

测试项	在人 (60kg) 体内的等效用量	小鼠剂量/天 = mg/kg/天 (小鼠重量~20 克)
1	100 mg/kg/天 6000 mg/天	1000 mcg/100 μ L BID = 2 mg/天=100 mg/kg/天
2	10 mg/kg/天 600mg/天	100 mcg/100 μ L BID = 0.2 mg/天 = 10 mg/kg/天
3	1 mg/kg/天 60 mg/天	10 mcg/100 μ L BID = 0.02 mg/天= 1 mg/kg/天
4	0.1 mg/kg/天 6 mg/天	1mcg 100 μ L BID=0.002mg/天=0.1 mg/kg/天
5	0.01 mg/kg/天 0.6 mg/天	0.1 mcg/100 μ L BID = 0.0002 mg/天 = 0.01 mg/kg/天
6	盐溶液安慰剂	盐溶液安慰剂 100 μ L BID

[0335] 在每天~09:00至11:00检查小鼠的葡萄糖水平,无论喂养模式如何。由于在每天葡萄糖测量时间的潜在的葡萄糖变化,每天在每个处理组计算五天移动的平均葡萄糖值。HIP2B 浓度的影响通过以下进行评估:1) 平均葡萄糖水平,以及 2) 如通过将干预组中的血糖漂移与对照组相比所确定的, HIP2B 变化的浓度减轻葡萄糖毒性的发展的程度。

[0336] 图 22 描绘了在由 STZ 处理的小鼠中进行的剂量响应研究并且确认了在由 10、100 和 1000 微克 BID 处理的糖尿病小鼠中效力是等效的。对小于 1mg/kg 的定量给药,在小鼠中有削弱的效力的信号,所述信号对应于 0.1 和 0.01mg/kg 的剂量水平。

[0337] 优化的 HIP2B 对于治疗糖尿病在许多方面与传统治疗(例如胰岛素)截然不同。HIP2B 初始了导致胰岛新生的信号级联(signal cascade)。与胰岛素(其中响应的效力主要通过其即刻的葡萄糖减少能力被测量)相反,任何胰岛新生剂的药效学响应在几天和几星期期间被测量。所以,胰岛新生剂(例如 HIP2B 和 INGAP)的效力不仅可以通过在重复的每天定量给药之后的糖血控制的长期修复被评估,还可以通过高血糖的减轻和/或正常血糖实现的速率被评估。所有 HIP 处理组都接近正常血糖。

[0338] 剂量衰减响应被计算为平均葡萄糖的变化,其中最大可获得响应等于糖尿病被减轻的最大程度。在本评估中,我们报道了响应于每单位剂量的变化,如通过在本研究全过程中每个处理组的最大血糖漂移与对照组的血糖漂移的不同所计算的。对照组不具有疾病的减轻并且得到 100%的疾病诱导。HIP2B 剂量减轻这种效果的程度被描述为在每个处理组中相对于安慰剂组的疾病的%减轻。

[0339] 图 23 描绘了 HIP2B 的变化的浓度对糖尿病的减轻的影响。三个最高治疗水平中的每个将糖尿病的严重性减轻至相同的程度。HIP 的两个最低治疗剂量(0.1 和 1 微克每天递送的 BID) 没有展示出像所述三个较高用量一样最佳的响应。

[0340] 在剂量水平 0.1 和 1 微克 BID, HIP2B 的响应展示出高于安慰剂的疾病衰减。当

HIP2B 浓度提高至 10 微克 BID, 得到最大的效力和糖尿病减轻。在剂量水平 1000、100 和 10 微克 BID, 糖尿病被减轻至在安慰剂组中所看到的最大疾病状态的 60% 至 70% 之间。从这些结果, 我们得到结论, 即 HIP2B 的将提供最佳效力的最低剂量水平为在小鼠中 1-10 微克 BID 或在人中等效于 0.5-1.0mg/kg (30-60mg BID) 的人类剂量的范围内。本剂量为用于 2B 期 INGAP 试验的剂量 (600mg/天) 的约 1/10。

[0341] 实施例 14

[0342] 进行药物动力学研究以确认使用所述优化的 HIP2B 结构实现的生物利用度的改进。绝对生物利用度和药效学研究在 Sprague Dawley 大鼠中, 在 HIP2、优化的 HIP2B 和 INGAP 的静脉内和皮下的剂量给予之后进行 (图 24)。目的为确定在两个不同途径的给予之后, HIP2、优化的 HIP2B 和 INGAP 在雄性大鼠中的吸收、绝对生物利用度和血浆水平。

[0343] 六个组, 每组五只雄性 Sprague Dawley 大鼠, 以静脉内和皮下途径被给予 HIP2、HIP2B 或 INGAP, 如以下的表格中。

[0344]

组	给予途径	测试项	正常浓度 (mg/mL)	剂量体积 (mL/kg)	正常剂量水平 (mg/kg)
1	皮下	HIP2	2	2	4
2	静脉内	HIP2	2	2	4
3	皮下	HIP2B	2	2	4
4	静脉内	HIP2B	2	2	4
5	皮下	INGAP	2	2	4
6	静脉内	INGAP	2	2	4

[0345] 在第 5、10、15、30 分钟和 45 分钟从每组的五只动物中从颈内静脉导管收集十个连序的血液血浆样品 (每个 0.03mL), 然后在剂量后 1、2、3、8 和 24 小时收集样品。血浆被收集到含有 EDTA 的管中。收集后, 样品在冷包装中保持冷却, 之后被离心, 并且转移至预先标记的微量离心管以在 -70°C 或以下储存。

[0346] 每个 200 μ L 的大鼠血浆样品被添加进含有 1mL 乙腈 (0.07% 三氟乙酸, TFA) 的微量离心管, 并且使用旋涡混合器搅拌 1 分钟。然后离心以移除沉淀的血浆蛋白质。上清溶液被移除并使用 Speed Vac 进行蒸发至干燥。向含有所述被干燥的沉淀物的微离心管添加 200 μ L 的 20 : 80 乙腈 : 水 (含有 0.07% TFA)。所述样品被离心以移除任何不可溶材料, 并且将上清液溶液转移至分析瓶用于 LC/MS MS 分析。质谱被校准以检测针对 HIP2B (M = 286.0)、HIP2 (M = 287.1) 和 INGAP (M = 212.2、356.1、373.9) 的各自基准样品的每个, 观察到的最丰富的一种或多种子离子。优化的 HIP2B、HIP2 和 INGAP 血浆样品在 C-18 反相柱 (50mmx2.0mm, Varian Pursuit XRS3) 上分析, 使用水中 0.07% TFA 作为缓冲液 A 以及乙腈中 0.07% TFA 作为缓冲液 B。使用从 98% A/2% B 在 9min 中渐进至 100% B 的线性梯度以 0.4mL/min 的流速进行。

[0347] 以下血浆对照如上文所描述的进行处理并且用于建立标准的浓度曲线：

[0348] 1. 空白血浆作为背景对照

[0349] 2. 含有 6.7×10^4 、 6.7×10^3 、 6.7×10^2 、67 和 6.7ng/mL 的 HIP2B、HIP2 和 INGAP 的五个标准的血浆样品

[0350] 还通过 LC/MS MS 分析优化的 HIP2B、HIP2 和 INGAP 的保留的药剂量的样品，以确定在注射时每个的浓度。分析确认了所述浓度（在实验误差内）为 2mg/mL。所有动物在剂量后的所有时间以及每种途径的给予之后表现正常。HIP2 和 INGAP：在 HIP2 的静脉内或皮下给予后，仅在给药之后的五分钟观察到非常低水平的 HIP2，所有接下来的样品都低于定量限度。在 INGAP 的静脉内或皮下给予之后，所有被测量的血浆样品都低于定量下限。作为结果，不能够计算在静脉内和皮下的剂量给予之后 HIP2 和 INGAP 的血浆药物动力学参数。

[0351] 在 HIP2B 静脉内给予之后，HIP2B 血浆浓度以单相形式减少，具有 0.19 小时（11 分钟）的平均末期血浆半衰期。平均 C_{max} 为 8237ng/mL，发生于 5 分钟的第一取样时间点。平均 C_0 估计为 18805ng/mL。平均 $AUC_{0-\infty}$ 为 2231ng*hr/mL。表观平均血浆清除率为 1.9L/hr/kg，具有 0.48L/kg 的表观平均分布容积。

[0352] 在优化的 HIP2B 的皮下给予之后，被吸收的 HIP2B 以单相形式减少，具有 0.34 小时（20 分钟）的平均末期血浆半衰期。平均 $AUC_{0-\infty}$ 为 1932ng*hr/mL。表观平均 Cl/F 为 2.1L/hr/kg，具有 1L/kg 的表观平均 V_d/F 。HIP2B 的绝对皮下生物利用度为 87%。图 25 展示了优化的 HIP2B 的皮下给予的药物动力学，优化的 HIP2B 血浆水平在直至 2 小时内为可检测的，具有 ~ 20 分钟的 $t_{1/2,e}$ 。

[0353] INGAP 血浆浓度在任何时间点都为不可检测的，表明 INGAP 被迅速地清除和 / 或代谢。优化的 HIP2B 血浆水平在皮下剂量给予之后相对于 HIP2 或 INGAP 显著地更高。基于所观察到的有多重峰的 LC/MS 色谱血浆谱图，优化的 HIP2B 与 HIP2 和 INGAP 相比十分不可能在体内迅速地代谢。HIP2B 的生物利用度为 87%。

[0354] 图 24 展示了作为药物动力学分析的一部分的对来源于大鼠血浆的优化的 HIP2B、HIP2 和 INGAP 样品的 LC/MS MS 分析，在药物动力学分析中，通过皮下或经由静脉内注射以 4mg/kg 剂量给予 HIP2B、HIP2 和 INGAP。

[0355] 在皮下给予之后，HIP2B 水平在直至 1.5 小时内为可检测的。 $T_{1/2}$ 大致为 0.5 小时。在第 5 分钟检测到非常低水平的 HIP2，在第 5 分钟后没有后续的检测。基于所观察到的有多重峰的 LC/MS 色谱谱图，优化的 HIP2B 与 HIP2 相比在体内的代谢更慢。

[0356] INGAP 的浓度在任何时间点都为不可检测的，表明 INGAP 被迅速地清除和 / 或代谢。以下表格汇总了本数据。

[0357] 比较药物动力学分析

[0358]

肽	途径	剂量 (mg/kg)	C_0 (ng/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	C_{1h} (ng/mL)	$AUC_{(0-\infty)}$ (ng*h/mL)	$T_{1/2}$ (h)	F
HIP2B	SQ	4	na	2739	0.167	611.5	1932	0.34	0.87
	IV	4	18805	8237	0.083	114	1614.3	0.19	na

HIP2	SQ	4	na	32	0.083	0	2.7	0.02	0.01
	IV	4	18805	29	0.083	0	441.9	0.02	na
INGAP	SQ	4	na	0	na	0	0	< 0.025	0
	IV	4	18805	0	na	0	439.5*	< 0.025	na

[0359] n = 5 ;na =不可用

[0360] * 外推得出的

[0361] 我们得到结论,即优化的 HIP2B 的血浆水平在皮下给予之后相对于 HIP2 或 INGAP 显著地更高。HIP2B 血浆水平在静脉内给予之后相对于 HIP 或 INGAP 显著地更高。在静脉内注射之后,优化的 HIP2B 显示出与时间相关的耗尽,在第 45min 具不可检测的浓度。 $T_{1/2}$ 大致为 9 分钟。仅在第 5 分钟的时间点观察到 HIP2,并且 INGAP 在任何时间点都为不可检测的,表明二者都迅速地被清除和 / 或代谢。

[0362] 虽然本发明已经参照某些优选的实施方案被相当详细地描述,但是其他形式也是可能的。因此所附的权利要求的精神和范围不应限于本说明书和本说明书中包含的优选的形式。

序列表

<110>CureDM, Inc.

Levetan, Claresa S.

<120> 使用前胰岛肽及其类似物的组合物和方法

<130>132163. 00502

<150>US 60/969, 019

<151>2007-08-30

<150>US 60/979, 526

<151>2007-10-12

<150>US 60/991, 964

<151>2007-12-03

<150>US 61/031, 479

<151>2008-02-26

<160>94

<170>PatentIn 版本 3.5

<210>1

<211>528

<212>DNA

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>1

atgctgcctc ccatggcct gccagtgta tcttgatgc tgctttcctg cctcatgetg	60
ctgtctcagg ttcaaggtga agaaccacag agggactgc cctctgcaag gatccgetgt	120
cccaaaggct ccaaggccta tggtccac tgctatgcct tgttttgtc accaaaatcc	180
tggacagatg cagatctggc ctgccagaag cggccctctg gaaacctggt gtctgtgetc	240
agtggggctg agggatcctt cgtgtcctcc ctgggaaga gcattggtaa cagetaactca	300
tacgtctgga ttgggctcca tgaccacaca caggcaccg agcccaatgg agaaggttg	360
gagtggagta gcagtgatgt gatgaattac tttgcatggg agagaaatcc ctccaccatc	420
tcaagccccg gccactgtgc gagcctgtcg agaagcacag catttctgag gtggaaagat	480

<220>

<221>AMIDATION

<222>(15)... (15)

<400>5

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu

1

5

10

15

<210>6

<211>15

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>SITE

<222>(1)... (1)

<223> 酰化

<220>

<221>AMIDATION

<222>(15)... (15)

<400>6

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly

1

5

10

15

<210>7

<211>14

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>SITE

<222>(1)... (1)

<223> 酰化

<220>

<221>AMIDATION

<222>(14)... (14)

<400>7

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly

1 5 10

<210>8

<211>16

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>8

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys

1 5 10 15

<210>9

<211>16

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>9

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210>10

<211>15

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>10

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1 5 10 15

<210>11

<211>15

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>DISULFID

<222>(15)... (15)

<400>11

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210>12

<211>17

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>DISULFID

<222>(17)... (17)

<400>12

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu
1 5 10 15
Cys

<210>13

<211>15

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>DISULFID

<222>(15)... (15)

<400>13

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys
1 5 10 15

<210>14

<211>16

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>SITE

<222>(1)... (1)

<223> 酰化

<220>

<221>AMIDATION

<222>(16)... (16)

<400>14

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys

1

5

10

15

<210>15

<211>16

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>SITE

<222>(1)... (1)

<223> 酰化

<220>

<221>AMIDATION

<222>(16)... (16)

<400>15

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1

5

10

15

<210>16

<211>15

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>SITE

<222>(1)... (1)

<223> 酰化

<220>

<221>AMIDATION

<222>(15)... (15)

<222>(16)... (16)

<220>

<221>AMIDATION

<222>(16)... (16)

<400>18

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1

5

10

15

<210>19

<211>15

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>SITE

<222>(1)... (1)

<223> 酰化

<220>

<221>DISULFID

<222>(15)... (15)

<220>

<221>AMIDATION

<222>(15)... (15)

<400>19

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1

5

10

15

<210>20

<211>16

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>SITE

<222>(16)... (16)

<220>

<221>SITE

<222>(1)... (1)

<223> 酰化

<220>

<221>SITE

<222>(16)... (16)

<223> 聚乙二醇化

<220>

<221>AMIDATION

<222>(16)... (16)

<400>23

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys

1

5

10

15

<210>24

<211>16

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>SITE

<222>(1)... (1)

<223> 酰化

<220>

<221>SITE

<222>(16)... (16)

<223> 聚乙二醇化

<220>

<221>AMIDATION

<222>(16)... (16)

<400>24

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1

5

10

15

<210>25

<211>15

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221>SITE

<222>(1)... (1)

<223> 酰化

<220>

<221>SITE

<222>(15)... (15)

<223> 聚乙二醇化

<220>

<221>AMIDATION

<222>(15)... (15)

<400>25

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys

1

5

10

15

<210>26

<211>15

<212>PRT

<213> 金仓鼠 (Mesocricetus auratus)

<400>26

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser

1

5

10

15

<210>27

<211>15

<212>PRT

<213> 金仓鼠 (Mesocricetus auratus)

<400>27

1	5	10	
<p><210>30 <211>16 <212>PRT <213> 人类 (Homo sapiens)</p>			
<p><400>30 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu 1 5 10 15</p>			
<p><210>31 <211>16 <212>PRT <213> 黑猩猩 (Pan troglodytes)</p>			
<p><400>31 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Gly 1 5 10 15</p>			
<p><210>32 <211>16 <212>PRT <213> 金仓鼠 (Mesocricetus auratus)</p>			
<p><400>32 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser 1 5 10 15</p>			
<p><210>33 <211>16 <212>PRT <213> 小鼠 (Mus musculus)</p>			
<p><400>33 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly 1 5 10 15</p>			
<p><210>34 <211>16</p>			

<212>PRT

<213> 大鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400>34

Trp	Ile	Trp	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Met	Gly	Gln	Gln	Pro	Asn	Gly	Gly
1				5					10					15	

<210>35

<211>16

<212>PRT

<213> 牛 (*Bos taurus*)

<400>35

Trp	Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Glu	Gly	Ser	Glu	Pro	Asp	Ala	Gly
1				5					10					15	

<210>36

<211>16

<212>PRT

<213> 狗 (*Canis familiaris*)

<400>36

Trp	Met	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Glu	Gly	Tyr	Glu	Pro	Asn	Ala	Asp
1				5					10					15	

<210>37

<211>16

<212>PRT

<213> 绵羊 (*Ovis aries*)

<400>37

Trp	Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Glu	Gly	Ser	Glu	Pro	Asn	Ala	Gly
1				5					10					15	

<210>38

<211>15

<212>PRT

<213> 黑猩猩 (*Pan troglodytes*)

<400>38

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly
1 5 10 15

<210>39

<211>15

<212>PRT

<213> 金仓鼠 (*Mesocricetus auratus*)

<400>39

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly
1 5 10 15

<210>40

<211>15

<212>PRT

<213> 小鼠 (*Mus musculus*)

<400>40

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10 15

<210>41

<211>15

<212>PRT

<213> 大鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400>41

Trp Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly
1 5 10 15

<210>42

<211>15

<212>PRT

<213> 牛 (*Bos taurus*)

<400>42

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala
1 5 10 15

<210>43

<211>15

<212>PRT

<213> 狗 (*Canis familiaris*)

<400>43

Trp	Met	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Glu	Gly	Tyr	Glu	Pro	Asn	Ala
1				5					10					15

<210>44

<211>15

<212>PRT

<213> 绵羊 (*Ovis aries*)

<400>44

Trp	Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Glu	Gly	Ser	Glu	Pro	Asn	Ala
1				5					10					15

<210>45

<211>14

<212>PRT

<213> 黑猩猩 (*Pan troglodytes*)

<400>45

Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Gln	Gly	Ser	Glu	Pro	Asp	Gly
1				5					10				

<210>46

<211>14

<212>PRT

<213> 金仓鼠 (*Mesocricetus auratus*)

<400>46

Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Ser	His	Gly	Thr	Leu	Pro	Asn	Gly
1				5					10				

<210>47

<211>14

<212>PRT

<211>15

<212>PRT

<213> 狗 (*Canis familiaris*)

<400>56

Met	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Glu	Gly	Tyr	Glu	Pro	Asn	Ala	Asp
1				5					10					15

<210>57

<211>15

<212>PRT

<213> 绵羊 (*Ovis aries*)

<400>57

Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Glu	Gly	Ser	Glu	Pro	Asn	Ala	Gly
1				5					10					15

<210>58

<211>15

<212>PRT

<213> 人类 (*Homo sapiens*)

<400>58

Trp	Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Gln	Gly	Ser	Glu	Pro	Asp	Gly
1				5					10					15

<210>59

<211>15

<212>PRT

<213> 人类 (*Homo sapiens*)

<400>59

Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Gln	Gly	Ser	Glu	Pro	Asp	Gly	Asp
1				5					10					15

<210>60

<211>14

<212>PRT

<213> 黑猩猩 (*Pan troglodytes*)

<210>65

<211>14

<212>PRT

<213> 狗 (*Canis familiaris*)

<400>65

Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala

1 5 10

<210>66

<211>14

<212>PRT

<213> 绵羊 (*Ovis aries*)

<400>66

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala

1 5 10

<210>67

<211>14

<212>PRT

<213> 人类 (*Homo sapiens*)

<400>67

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210>68

<211>14

<212>PRT

<213> 人类 (*Homo sapiens*)

<400>68

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210>69

<211>14

<212>PRT

<213> 大鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400>69

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Asn Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210>70

<211>14

<212>PRT

<213> 小鼠 (*Mus musculus*)

<400>70

Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Arg Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210>71

<211>14

<212>PRT

<213> 小鼠 (*Mus musculus*)

<400>71

Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Ser Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210>72

<211>14

<212>PRT

<213> 金仓鼠 (*Mesocricetus auratus*)

<400>72

Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Asn Asn Arg Arg Trp His Trp

1 5 10

<210>73

<211>14

<212>PRT

<213> 大鼠 (*Rattus norvegicus*)

<210>78

<211>14

<212>PRT

<213> 小鼠 (*Mus musculus*)

<400>78

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Tyr Glu Pro Asn Arg

1 5 10

<210>79

<211>14

<212>PRT

<213> 大鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400>79

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Arg

1 5 10

<210>80

<211>14

<212>PRT

<213> 金仓鼠 (*Mesocricetus auratus*)

<400>80

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Gly

1 5 10

<210>81

<211>14

<212>PRT

<213> 人类 (*Homo sapiens*)

<400>81

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly

1 5 10

<210>82

<211>14

<212>PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400>82

Ile Gly Leu His Asp Leu Ser Leu Gly Ser Leu Pro Asn Glu
1 5 10

<210>83

<211>14

<212>PRT

<213> 牛 (Bos taurus)

<400>83

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Ala Asn Ala
1 5 10

<210>84

<211>14

<212>PRT

<213> 金仓鼠 (Mesocricetus auratus)

<400>84

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly
1 5 10

<210>85

<211>14

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>85

Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp
1 5 10

<210>86

<211>14

<212>PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400>86

<223> 酰化

<220>

<221>AMIDATION

<222>(15)... (15)

<220>

<221>SITE

<222>(15)... (15)

<223> 半胱氨酸加合物

<400>94

Ile Gly His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys Cys

1

5

10

15

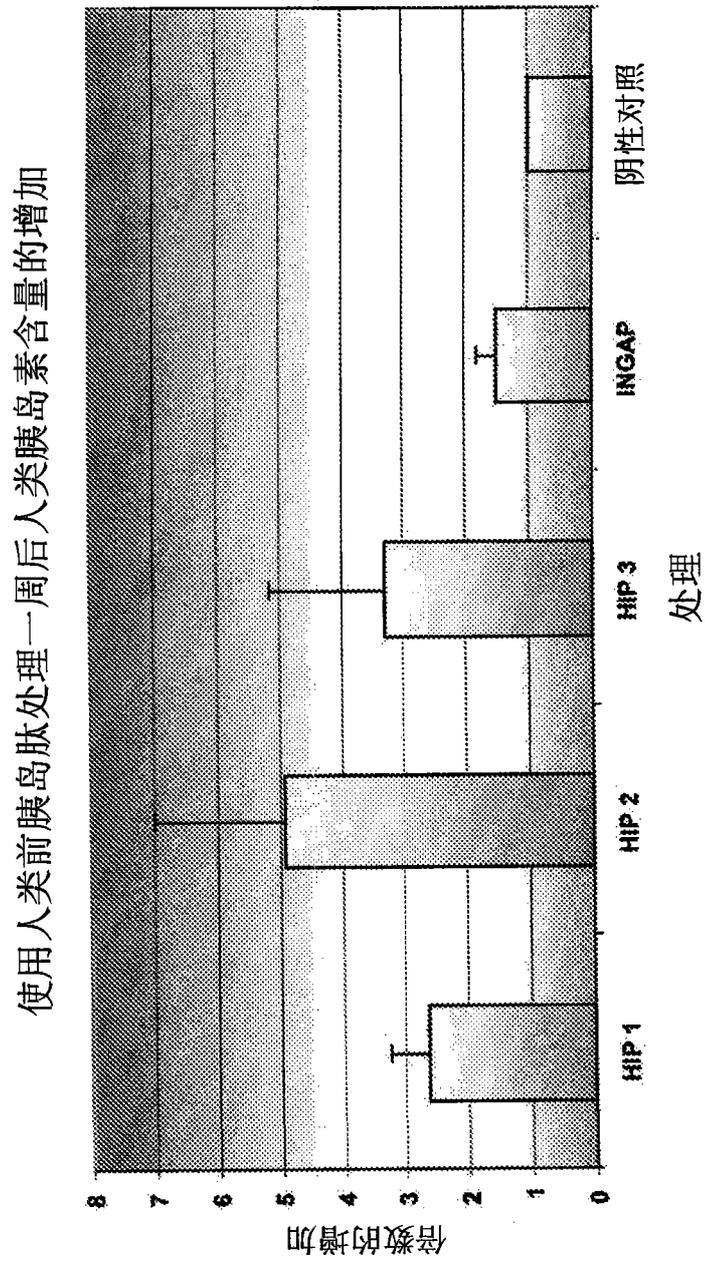


图 1

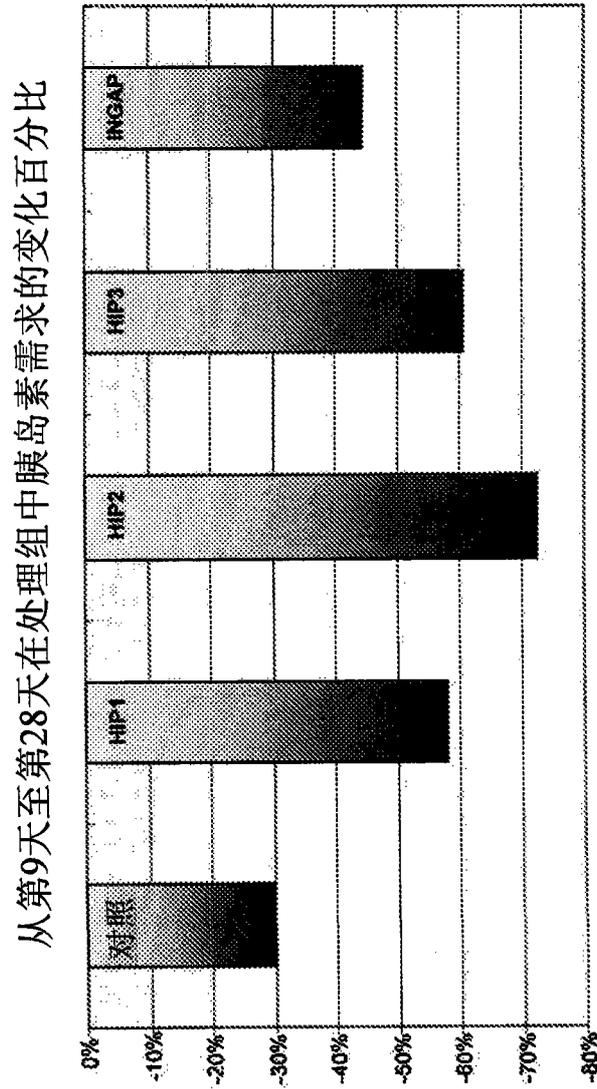


图 2

第27天处理组的小鼠的葡萄糖

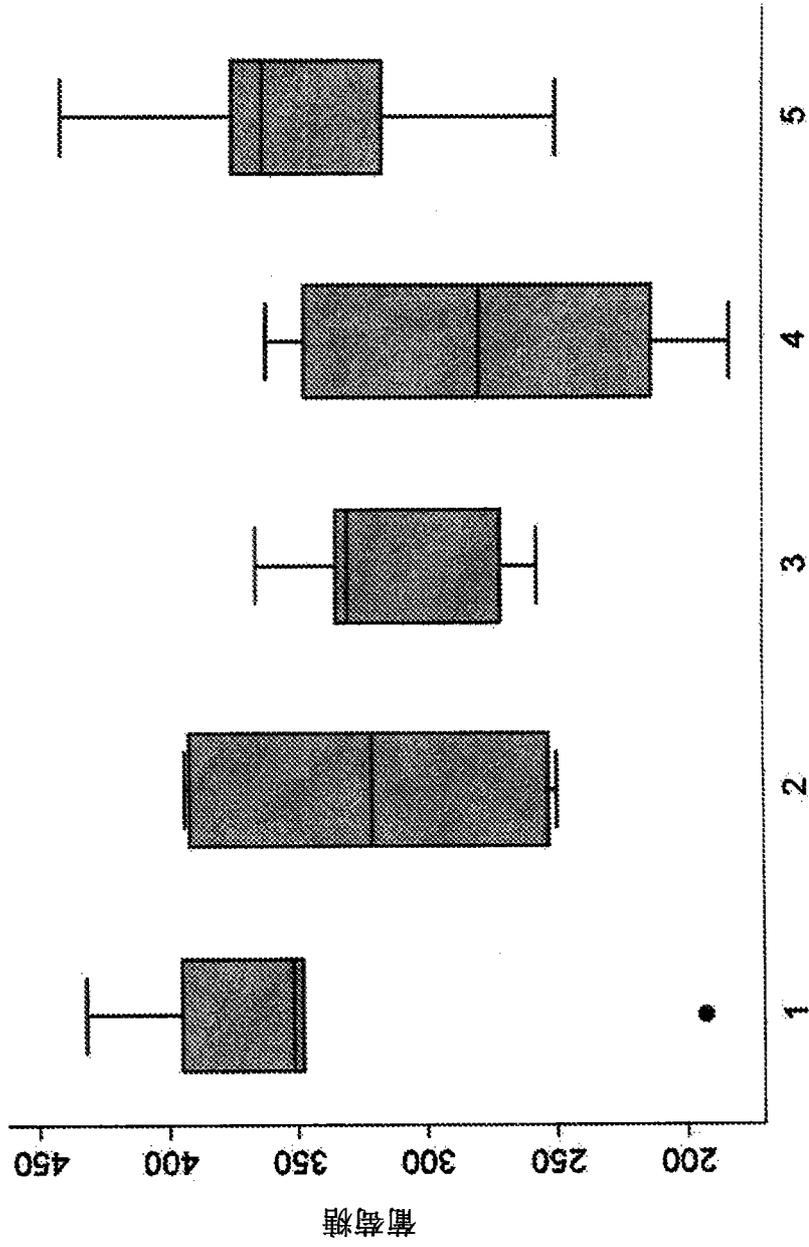


图 3

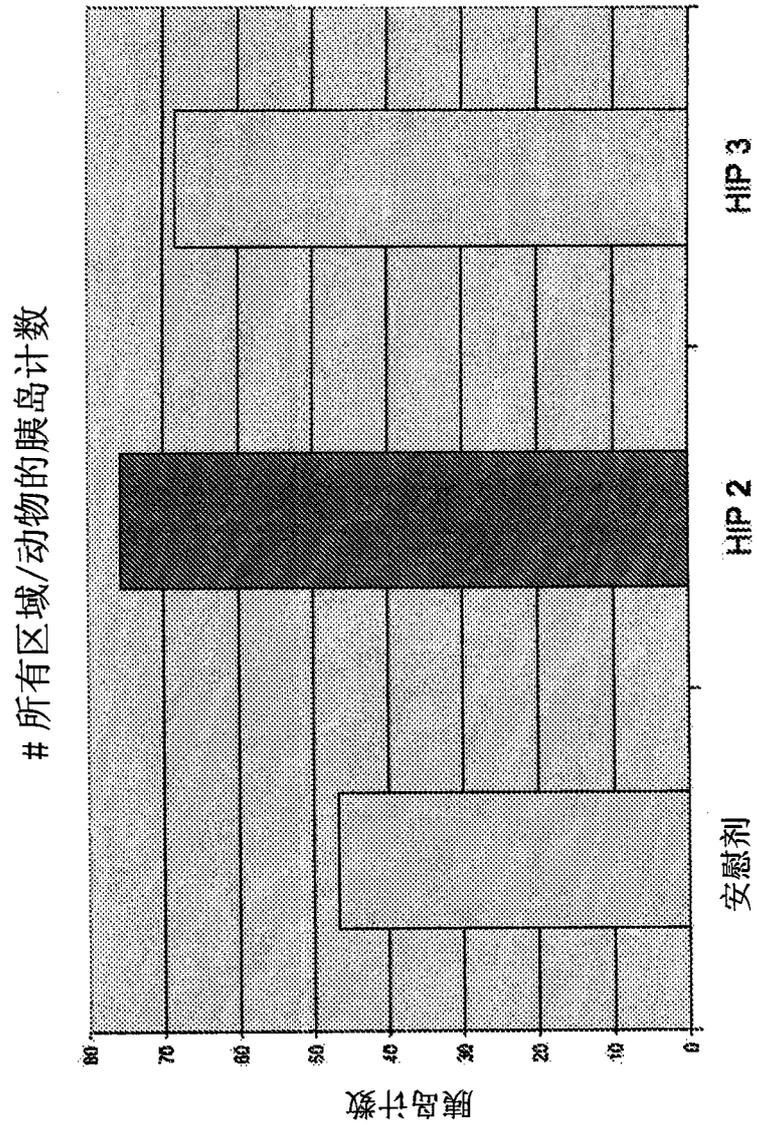


图 4A

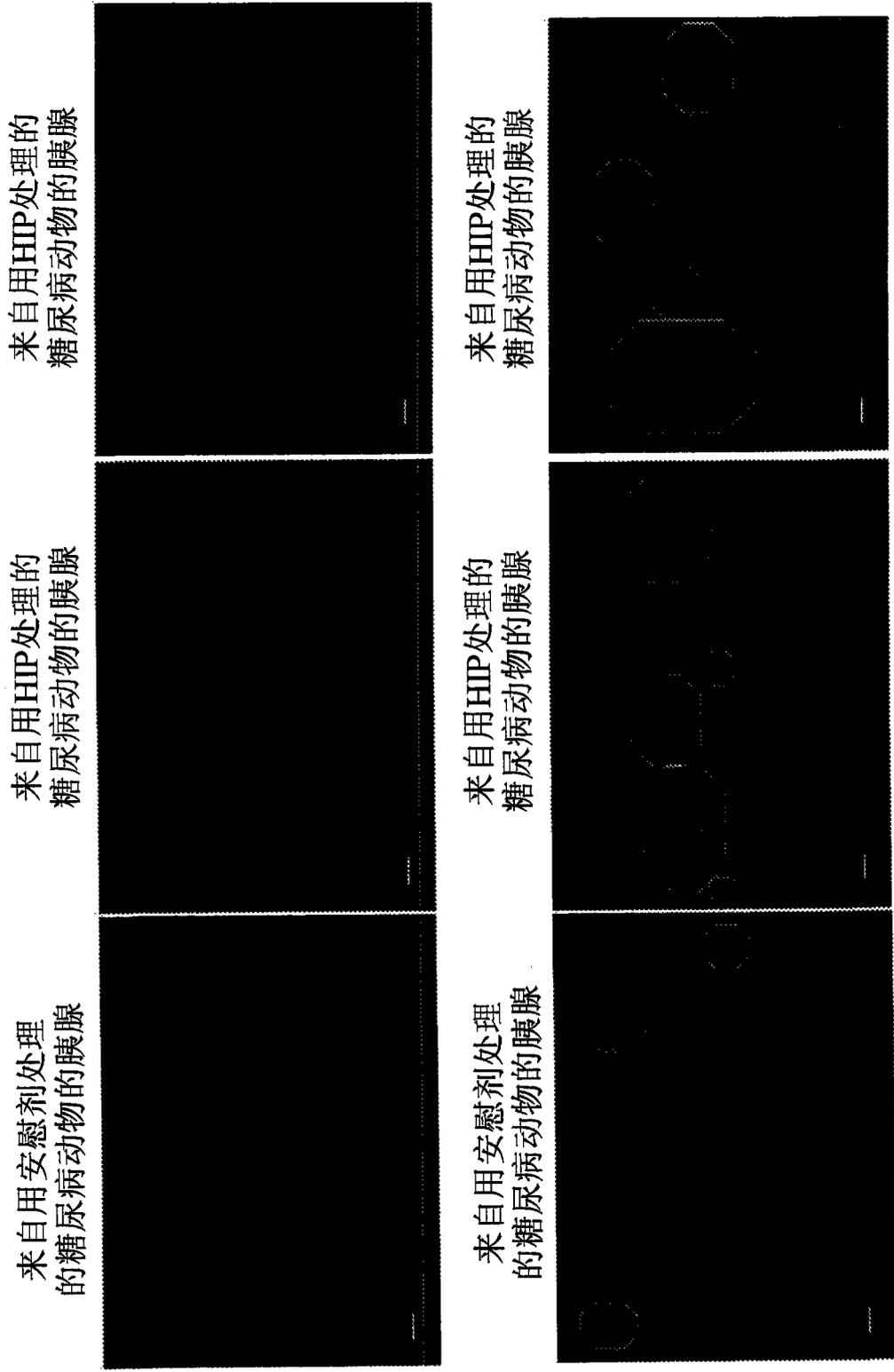


图 4B

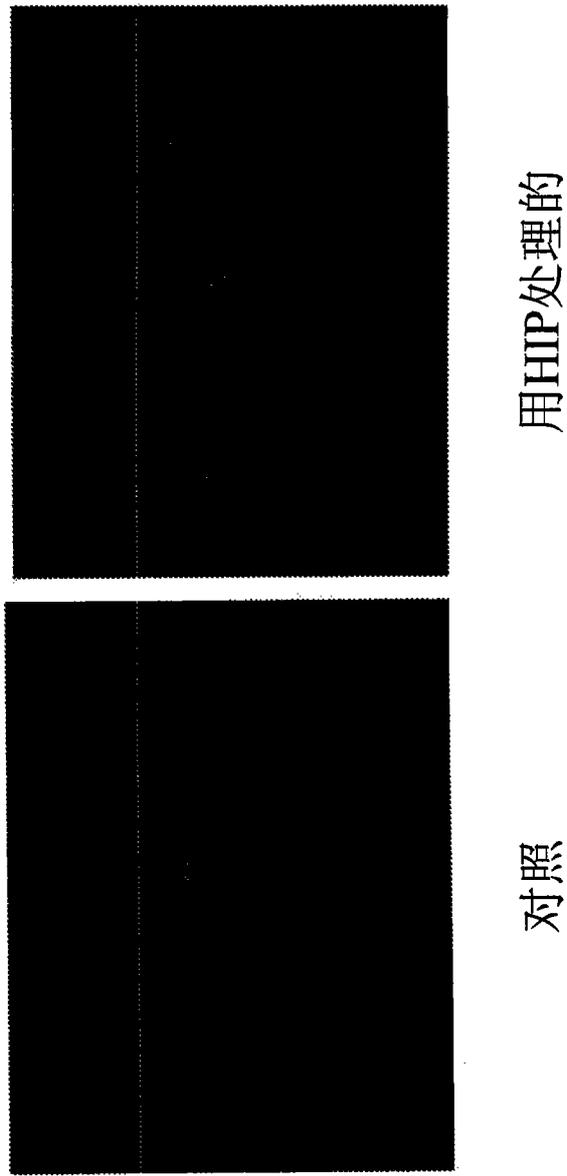


图 5

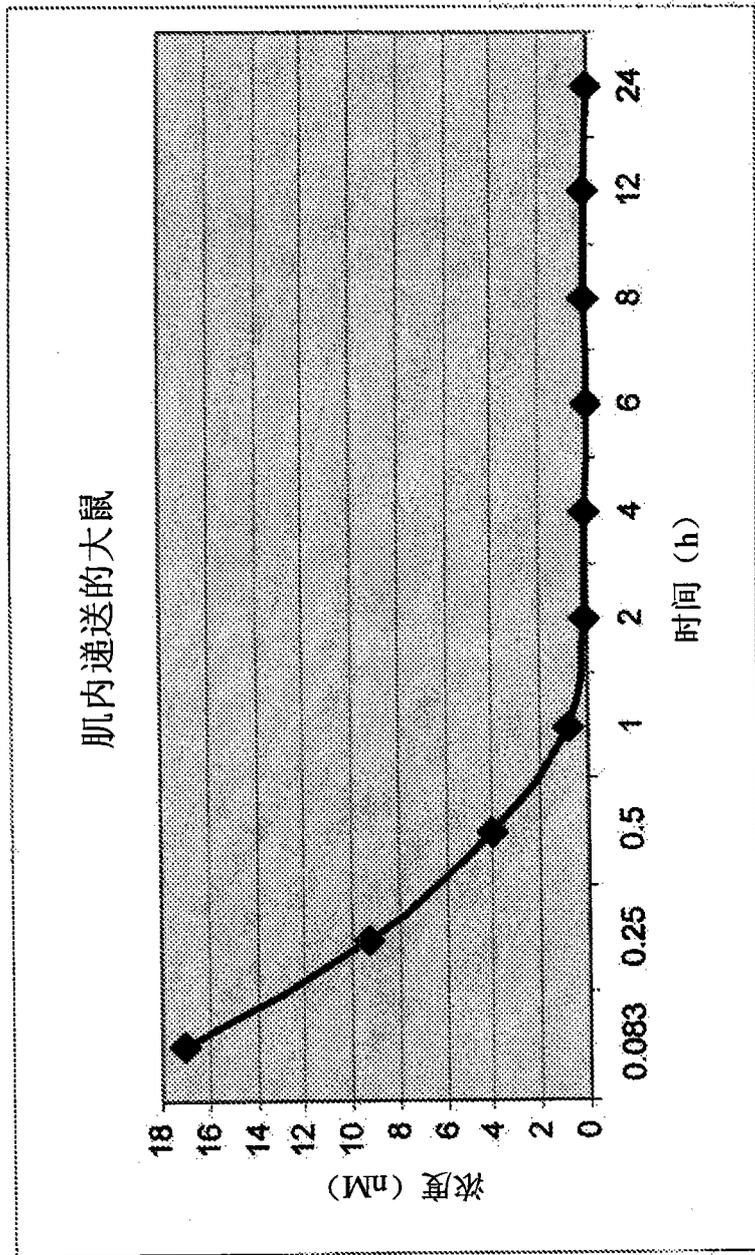


图 6

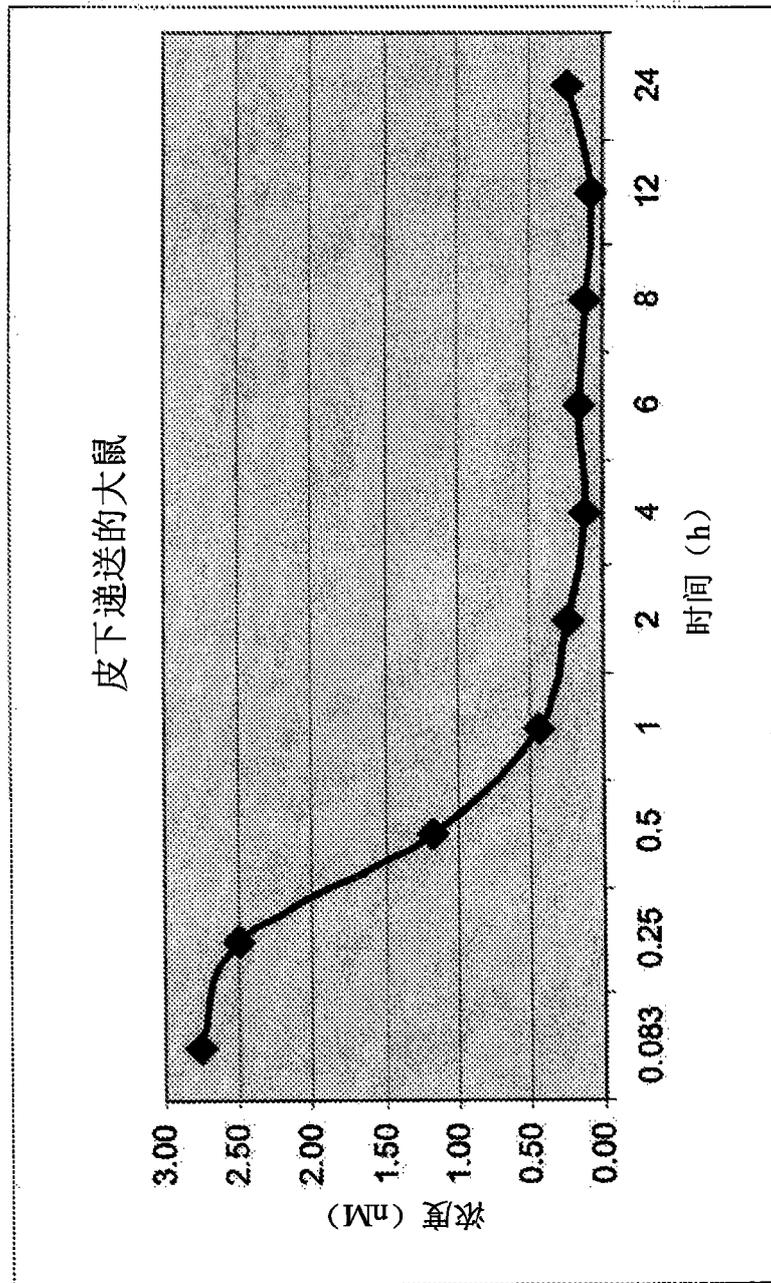


图 7

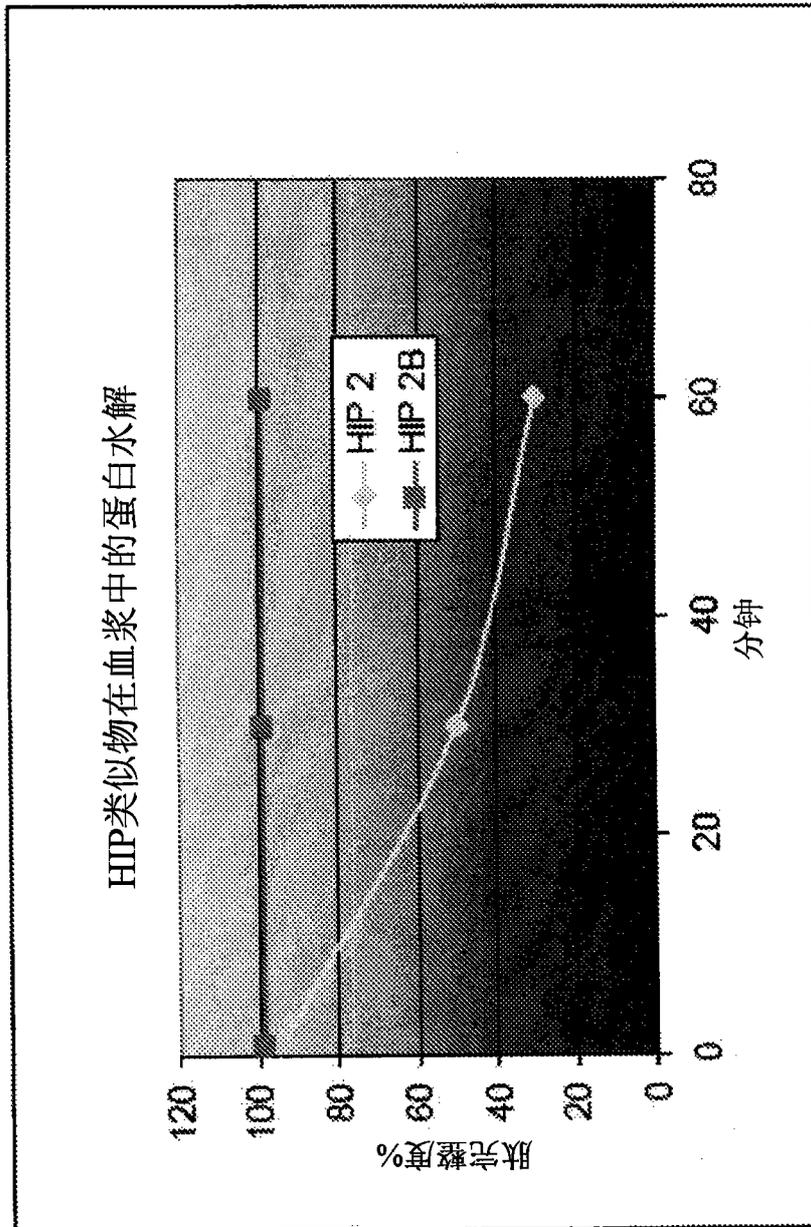


图 8

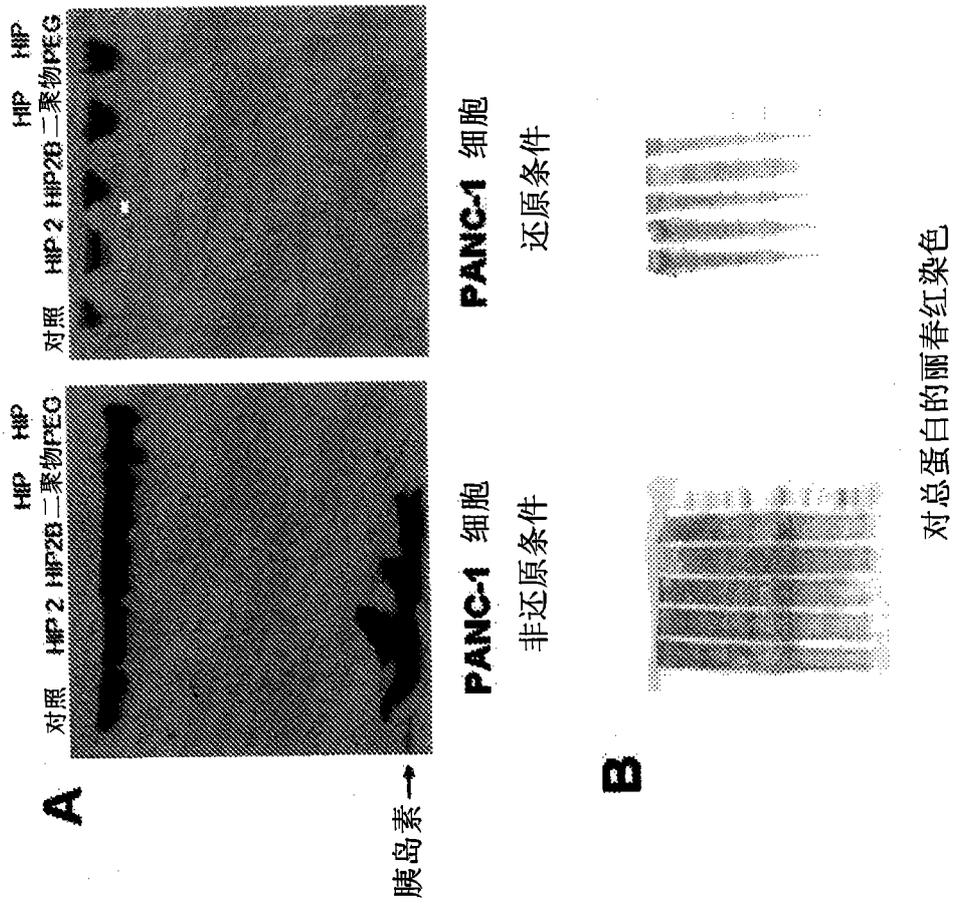


图 9

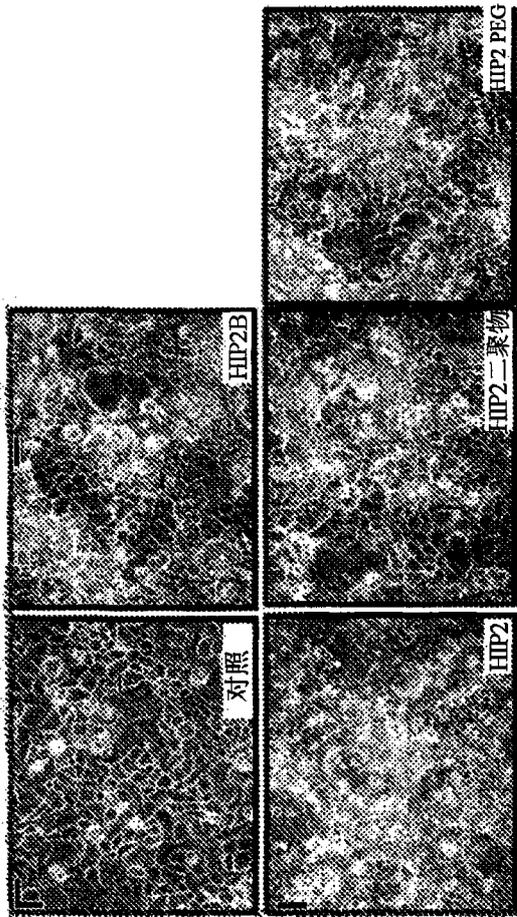


图 10A

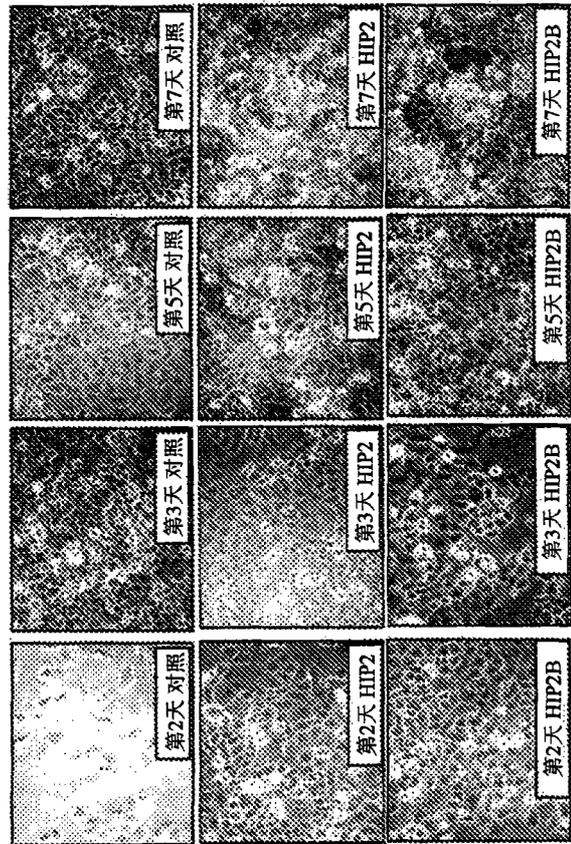


图 10B

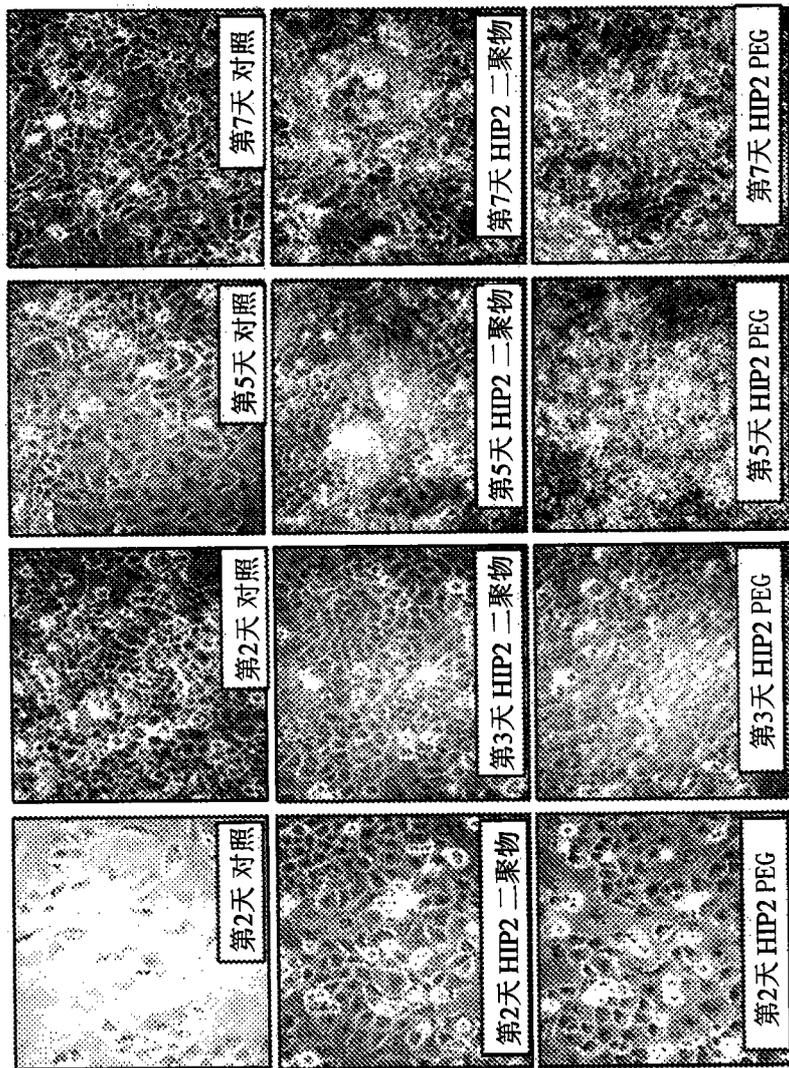


图 10C

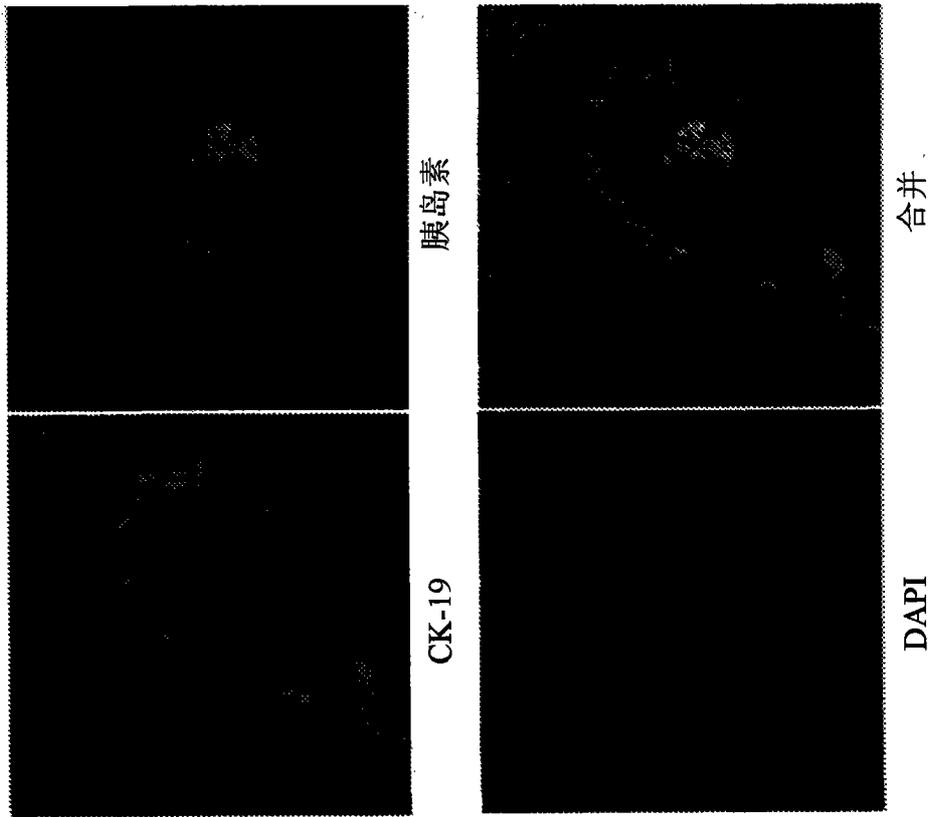


图 11

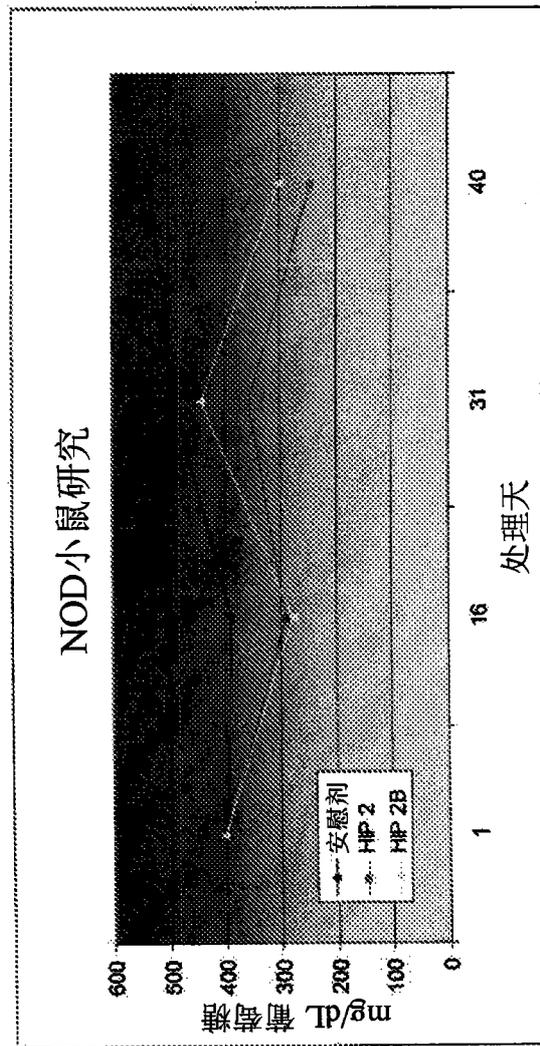


图 12

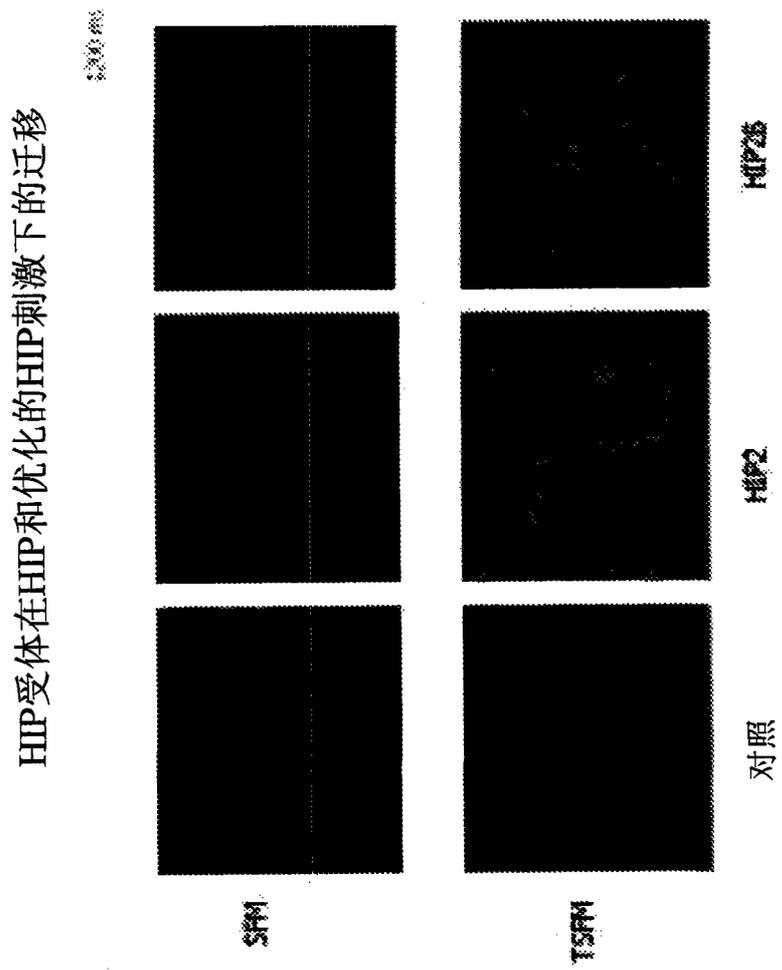


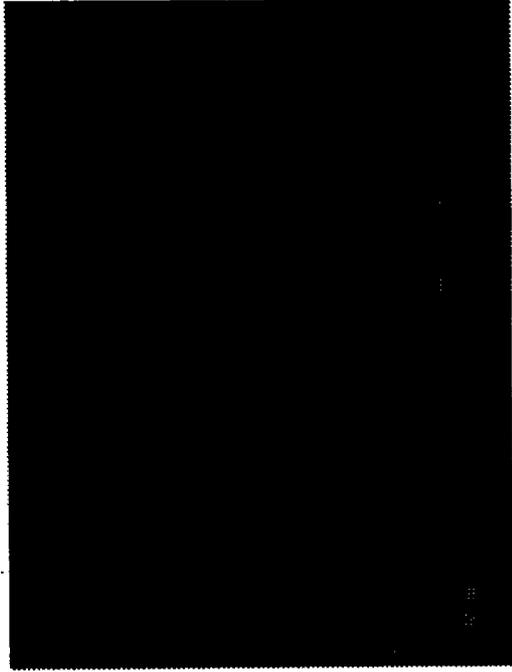
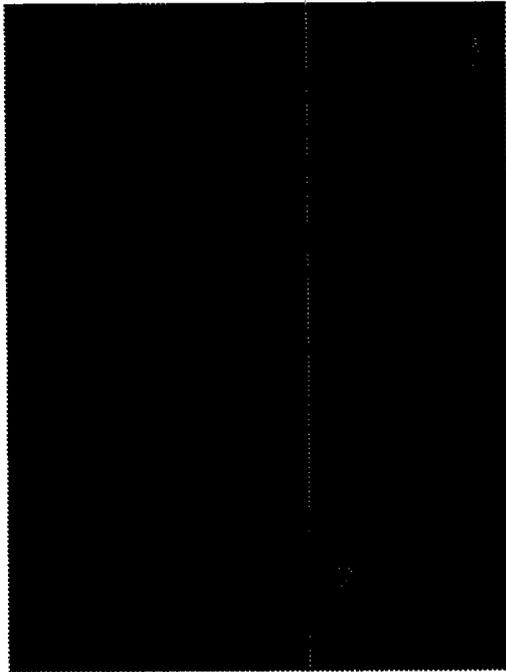
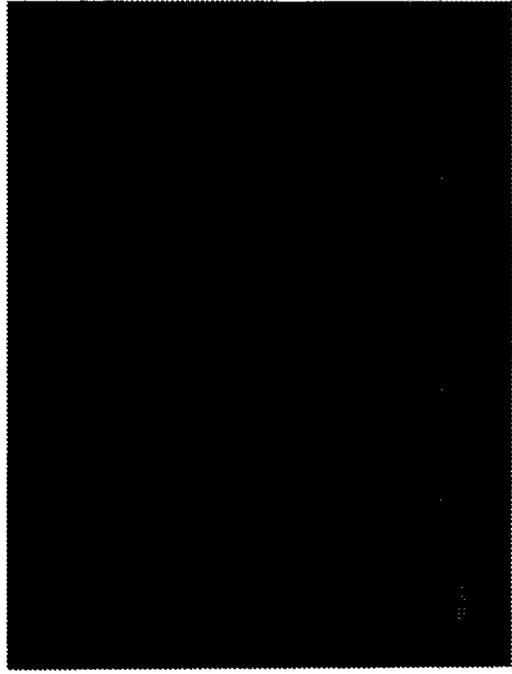
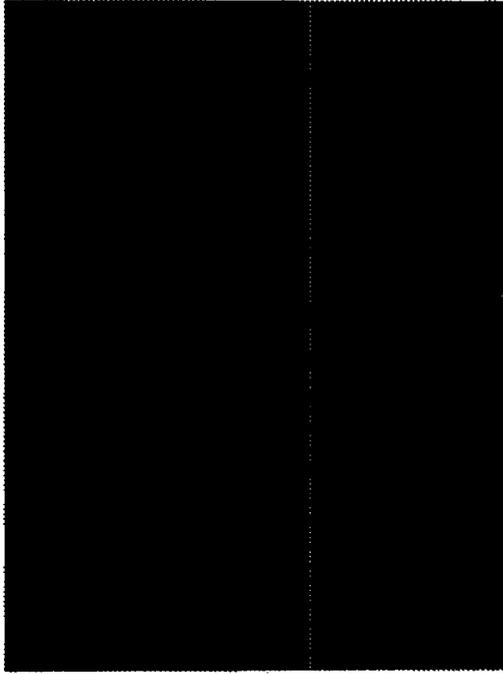
图 13

220 ms

HIP2B

已调整的曝光

HIP2



SFM

TSFM

图 14

在用优化的HIP2肽刺激下HIP受体从细胞质膜到细胞核的迁移

优化的HIP2B

HIP2

SFM

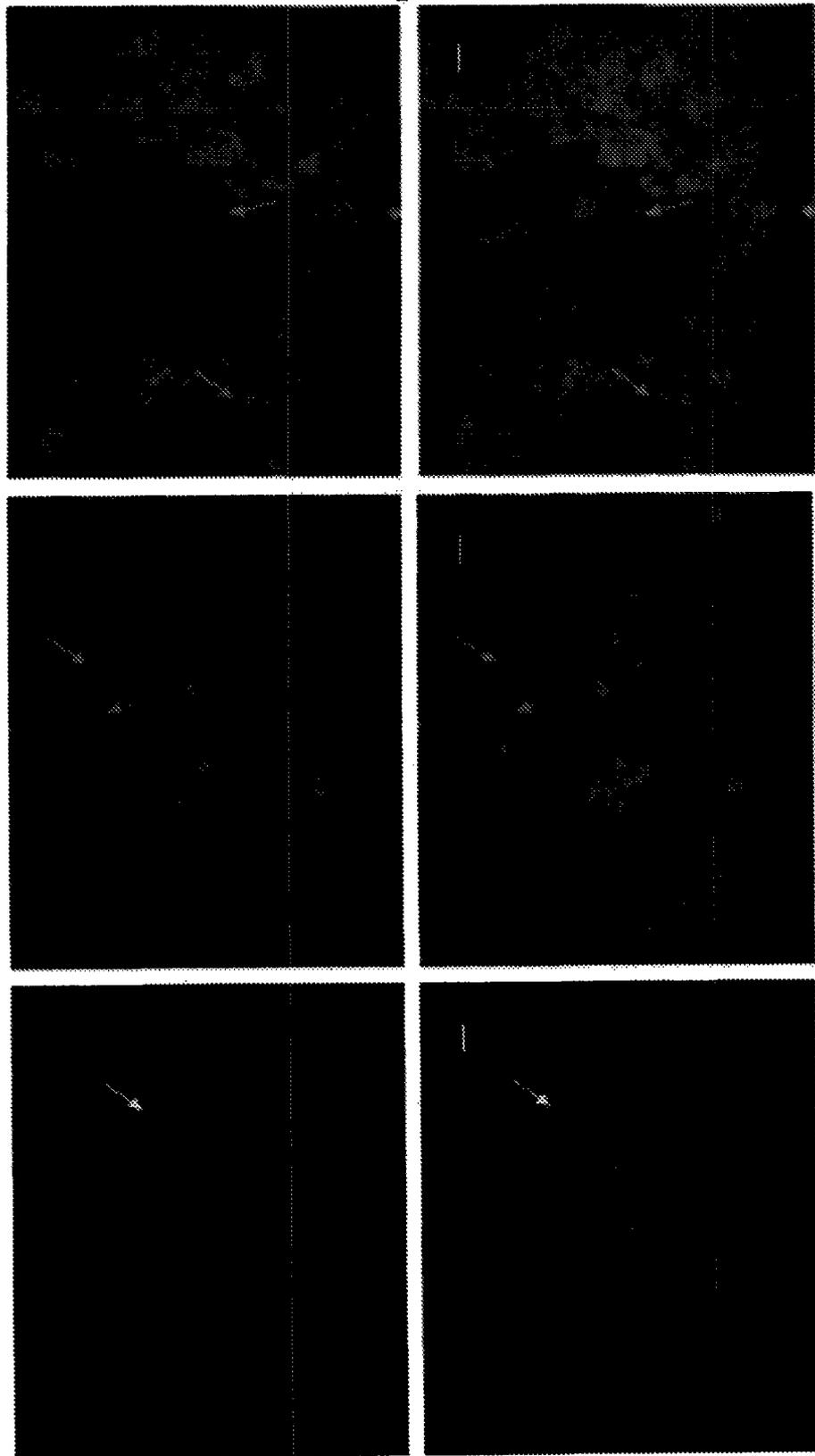
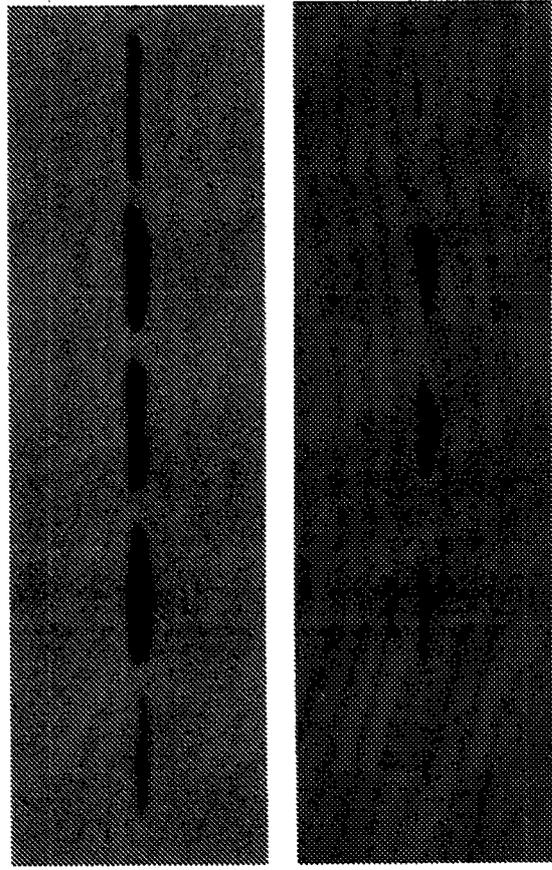


图 15

优化的HIP2B 对从细胞质到细胞核的迁移时间的影响

SFM **SFM +**
优化的HIP

Std 30m 6h 30m 6h

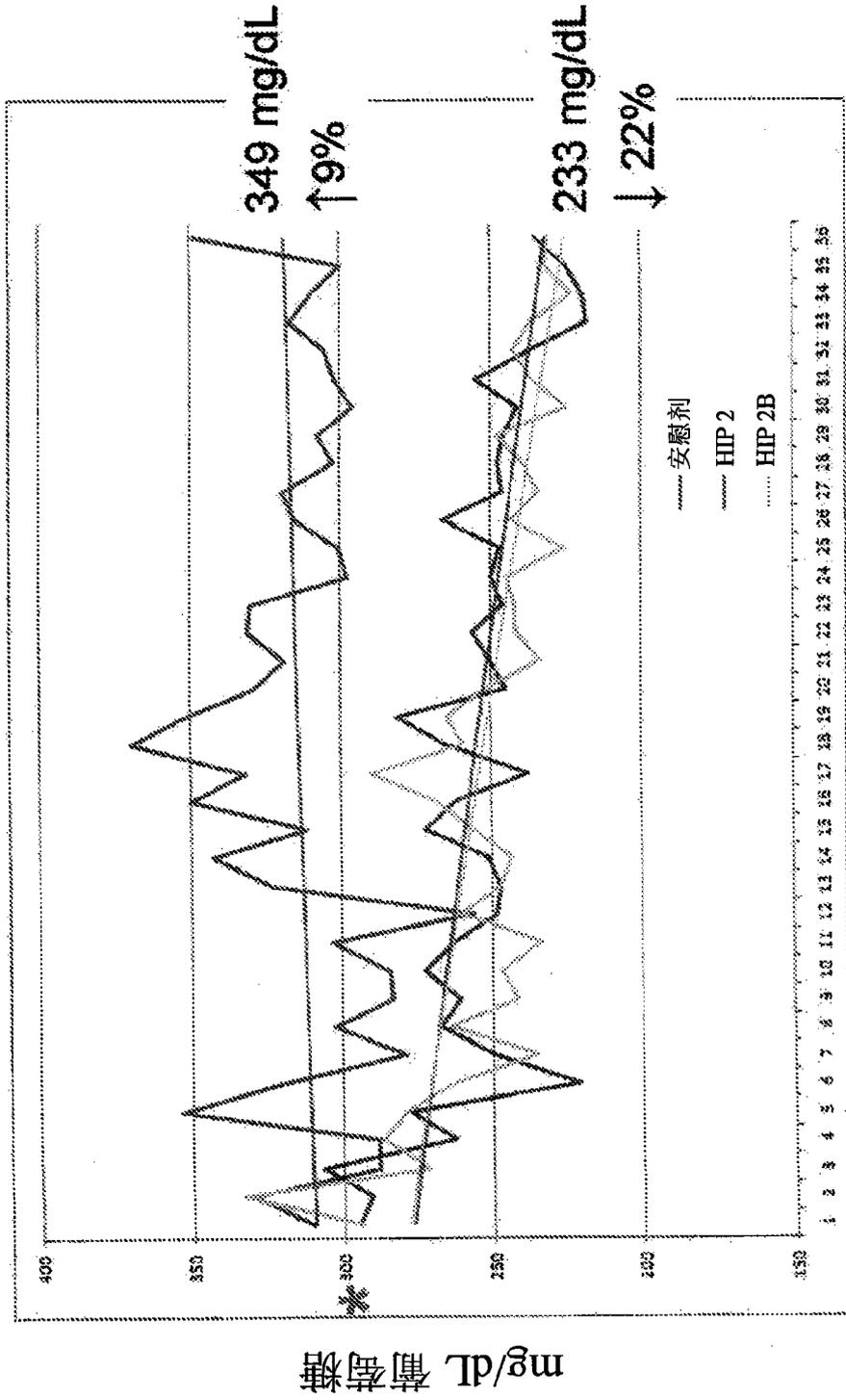


细胞质

细胞核

图 16

STZ-糖尿病小鼠模型
 HIP2和HIP2B相对安慰剂的平均每日葡萄糖水平



处理天

* 平均基线葡萄糖300 +/- 2% mg/dL, 在各组之间没有显著不同 (p=0.301)

图 17

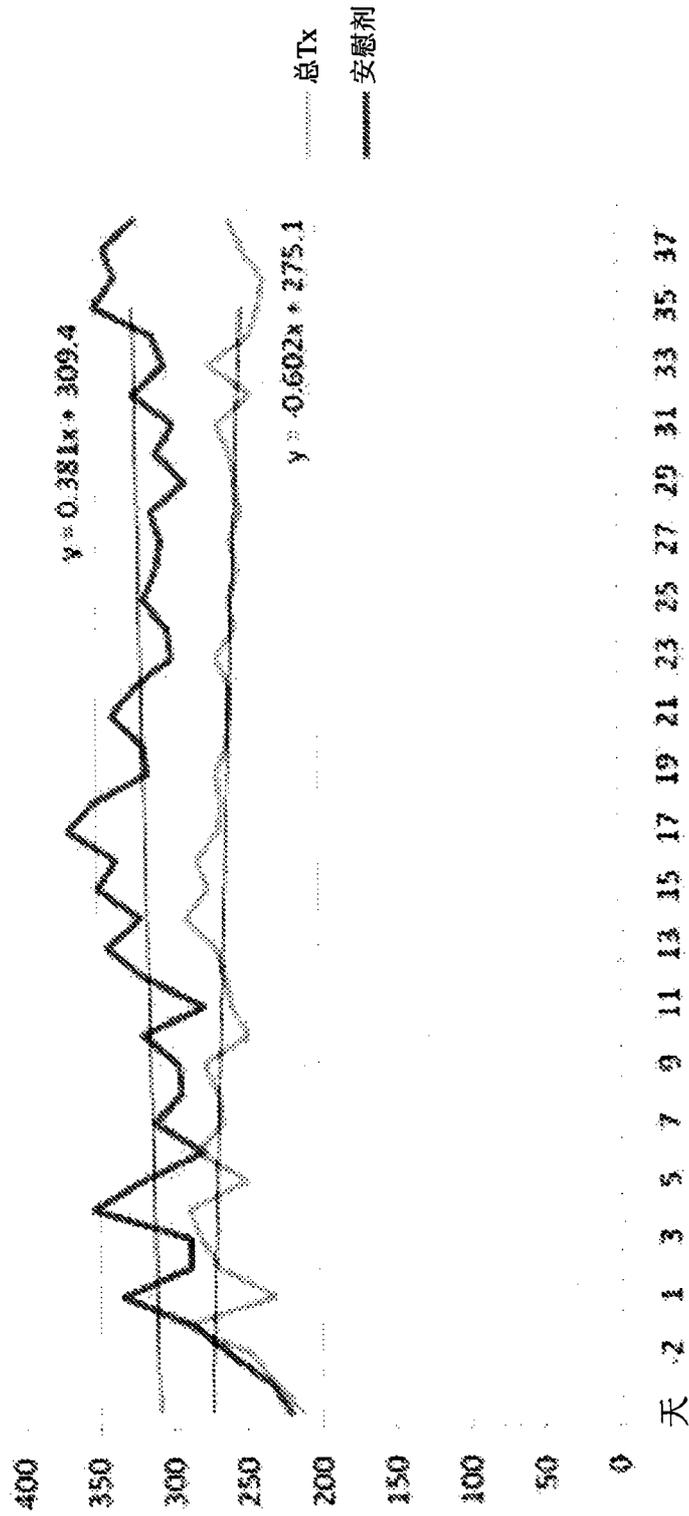


图 18

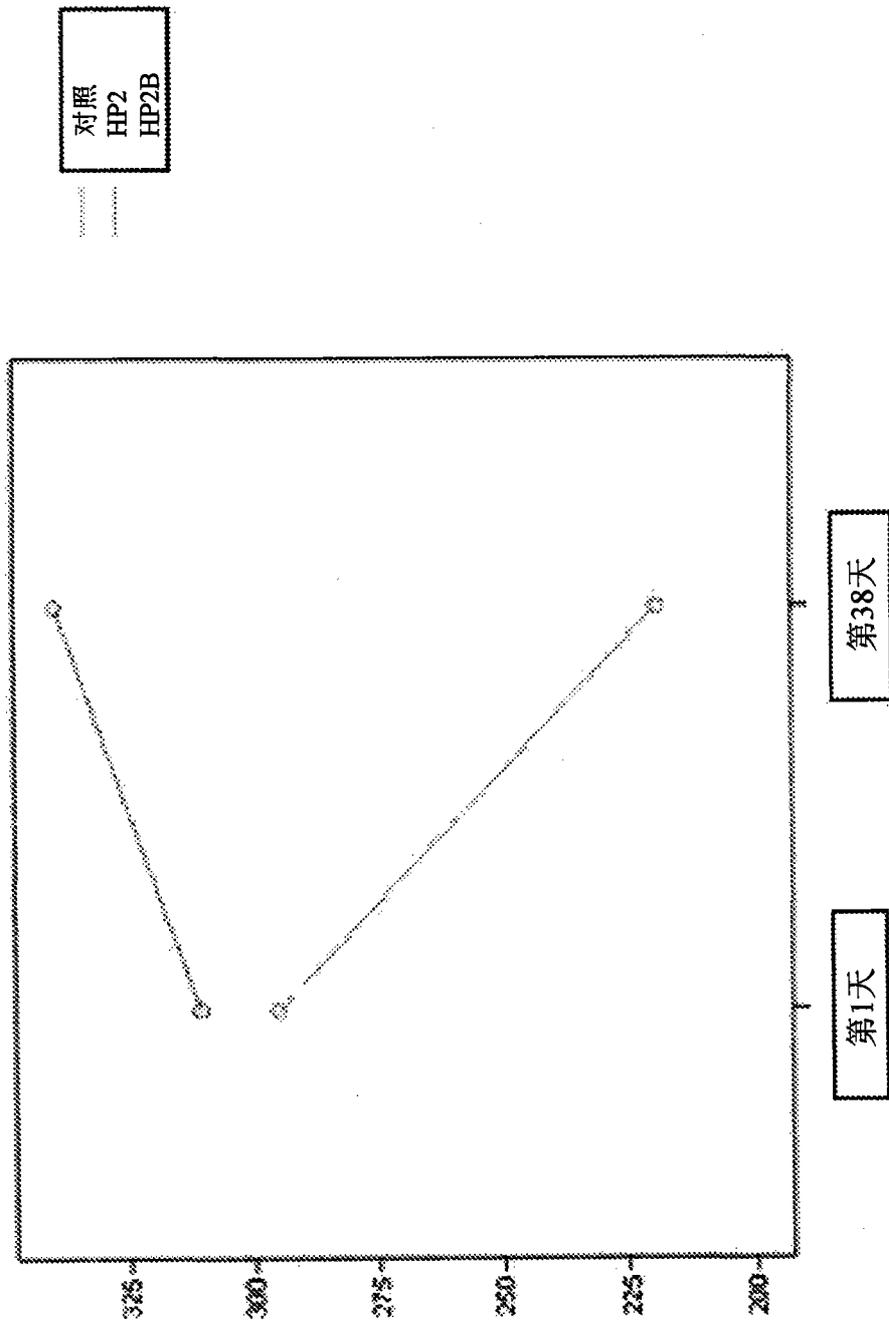


图 19

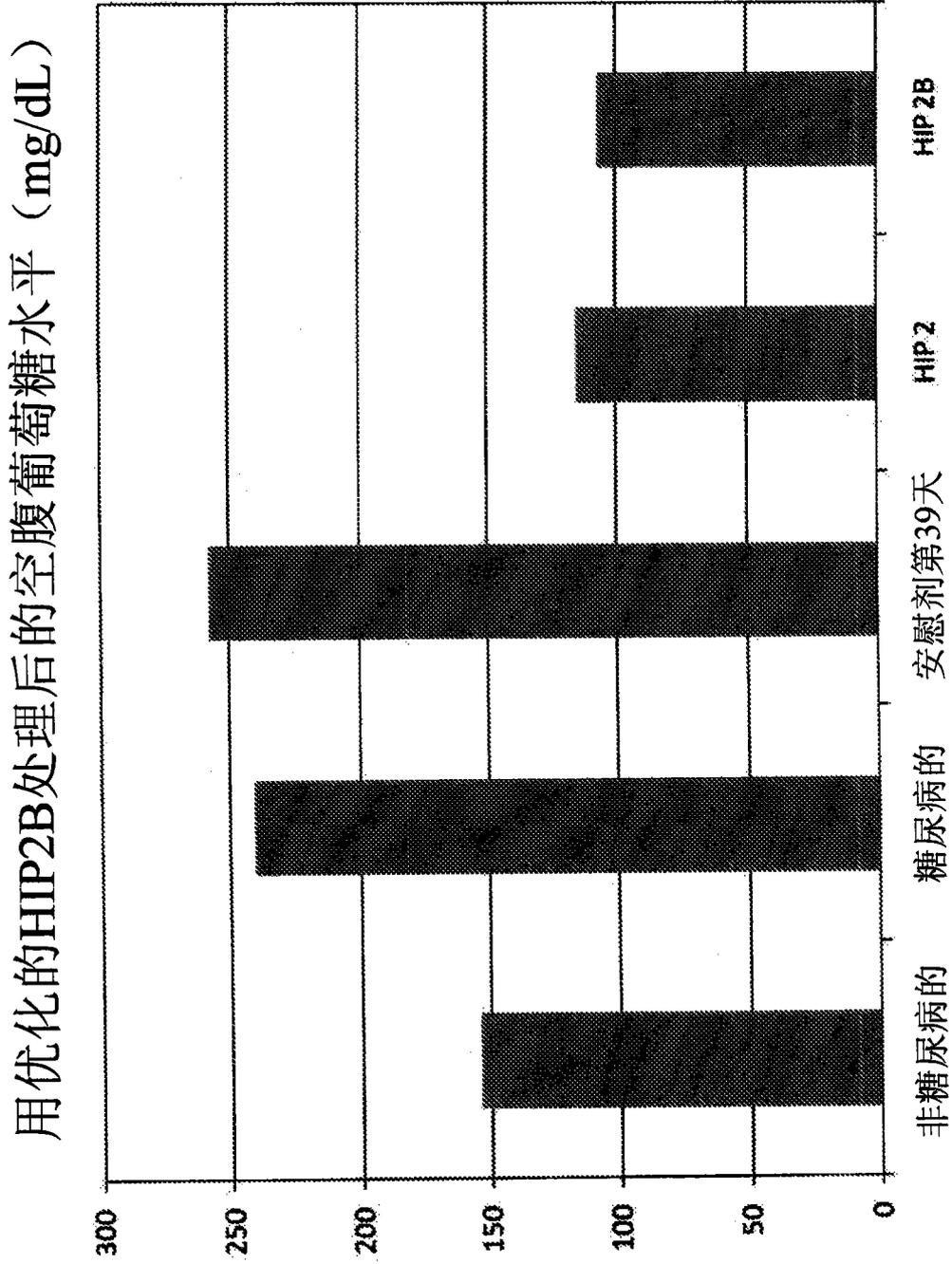


图 20

给予优化的HIP2B之后葡萄糖耐量测试结果

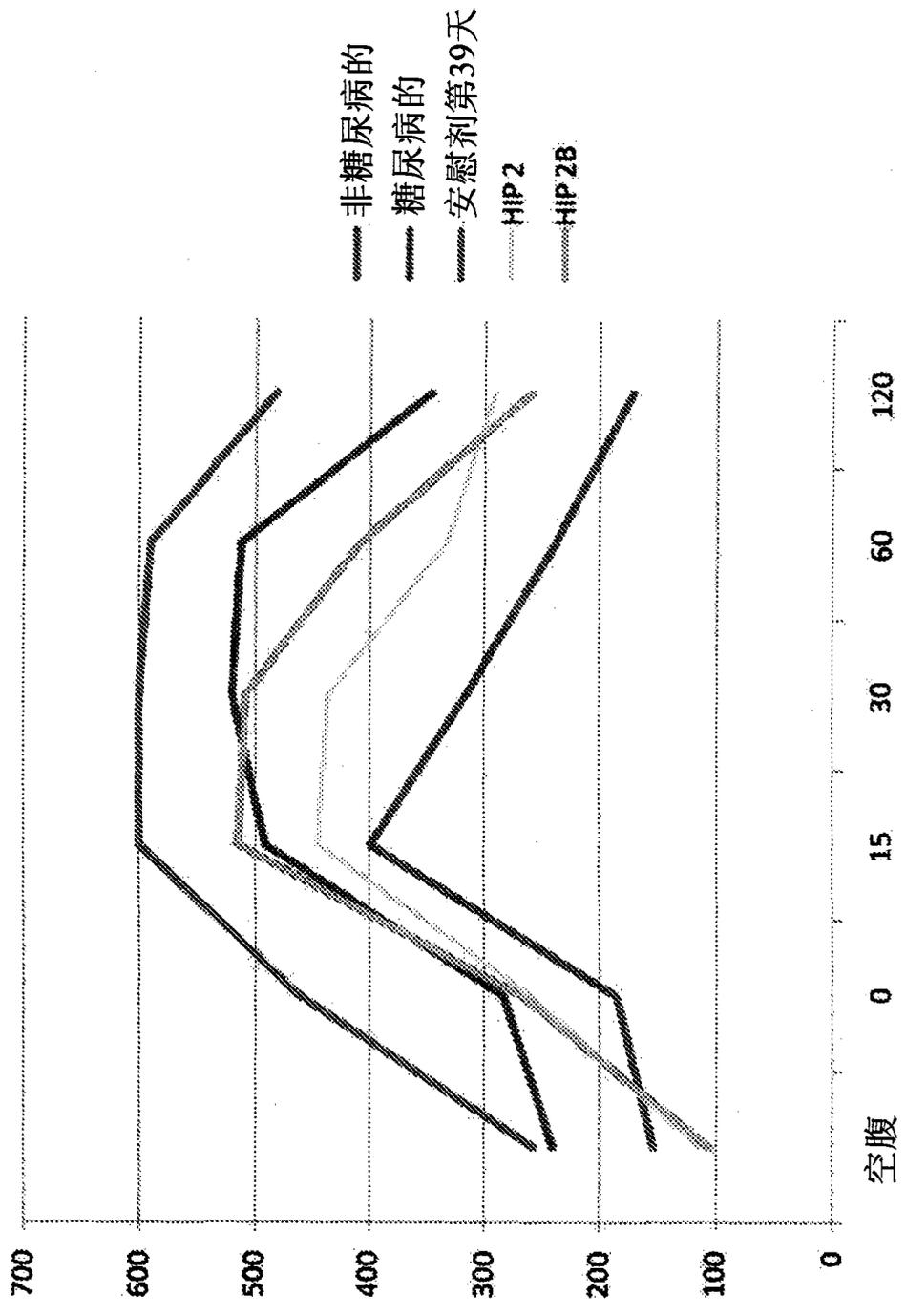


图 21

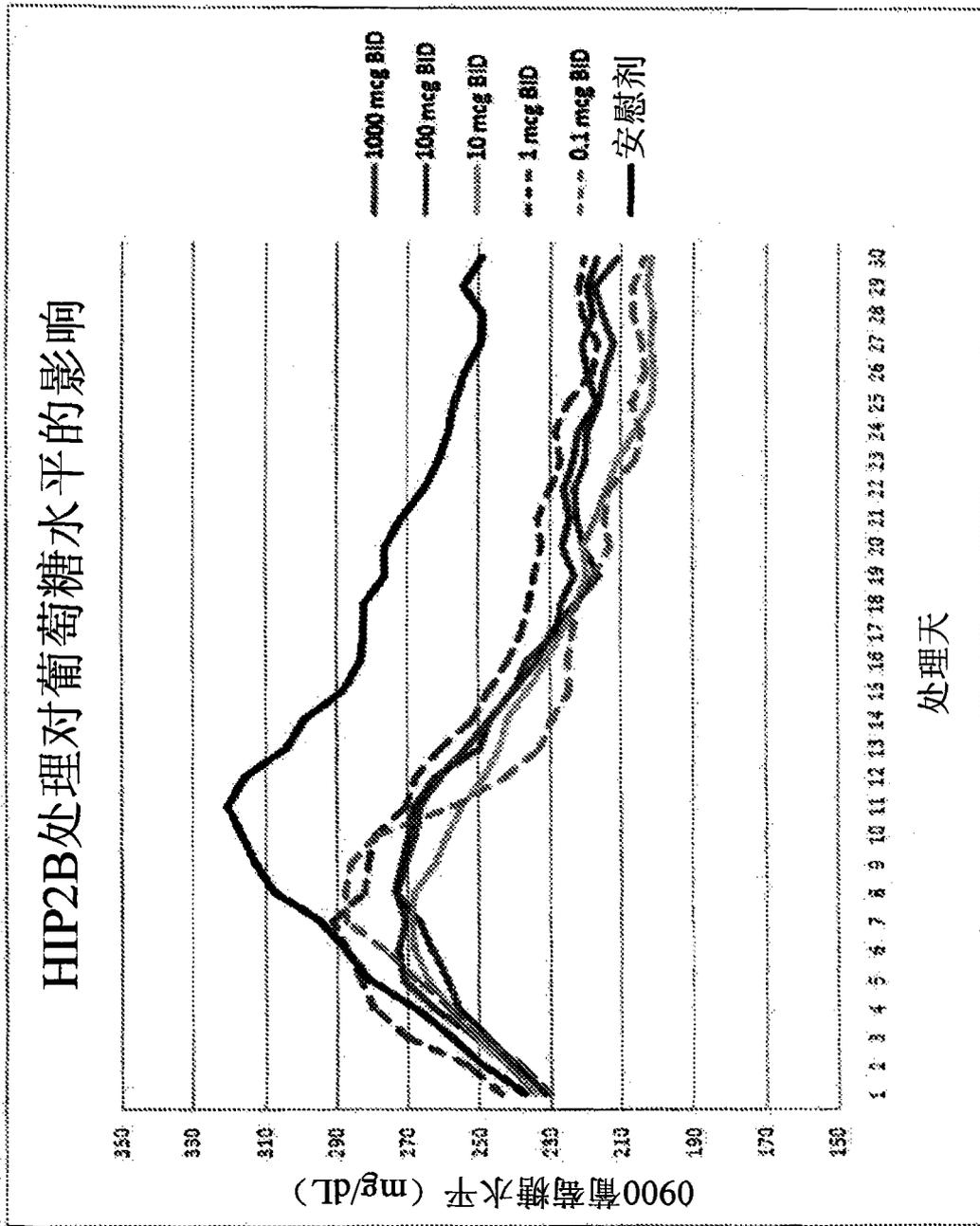


图 22

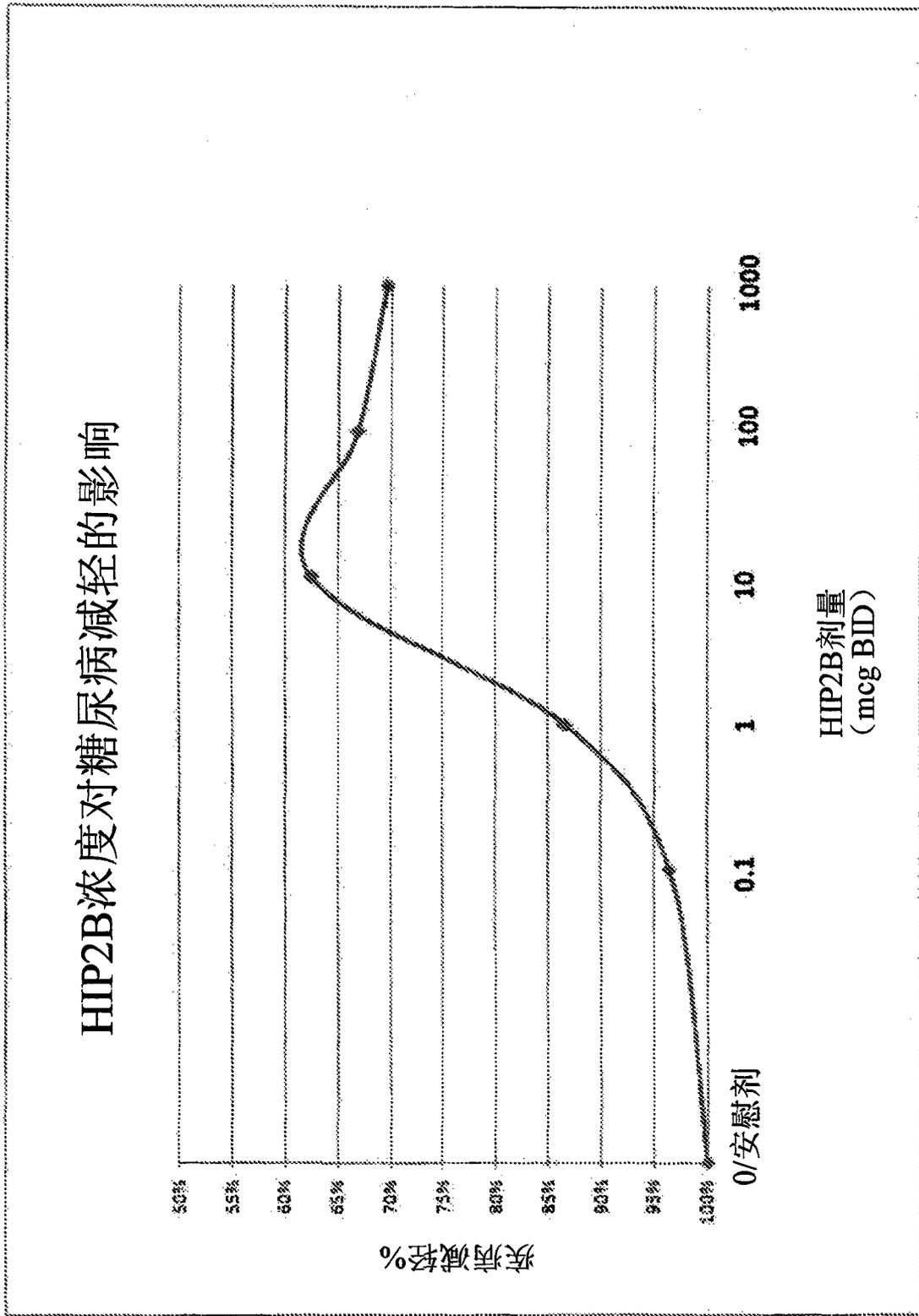


图 23

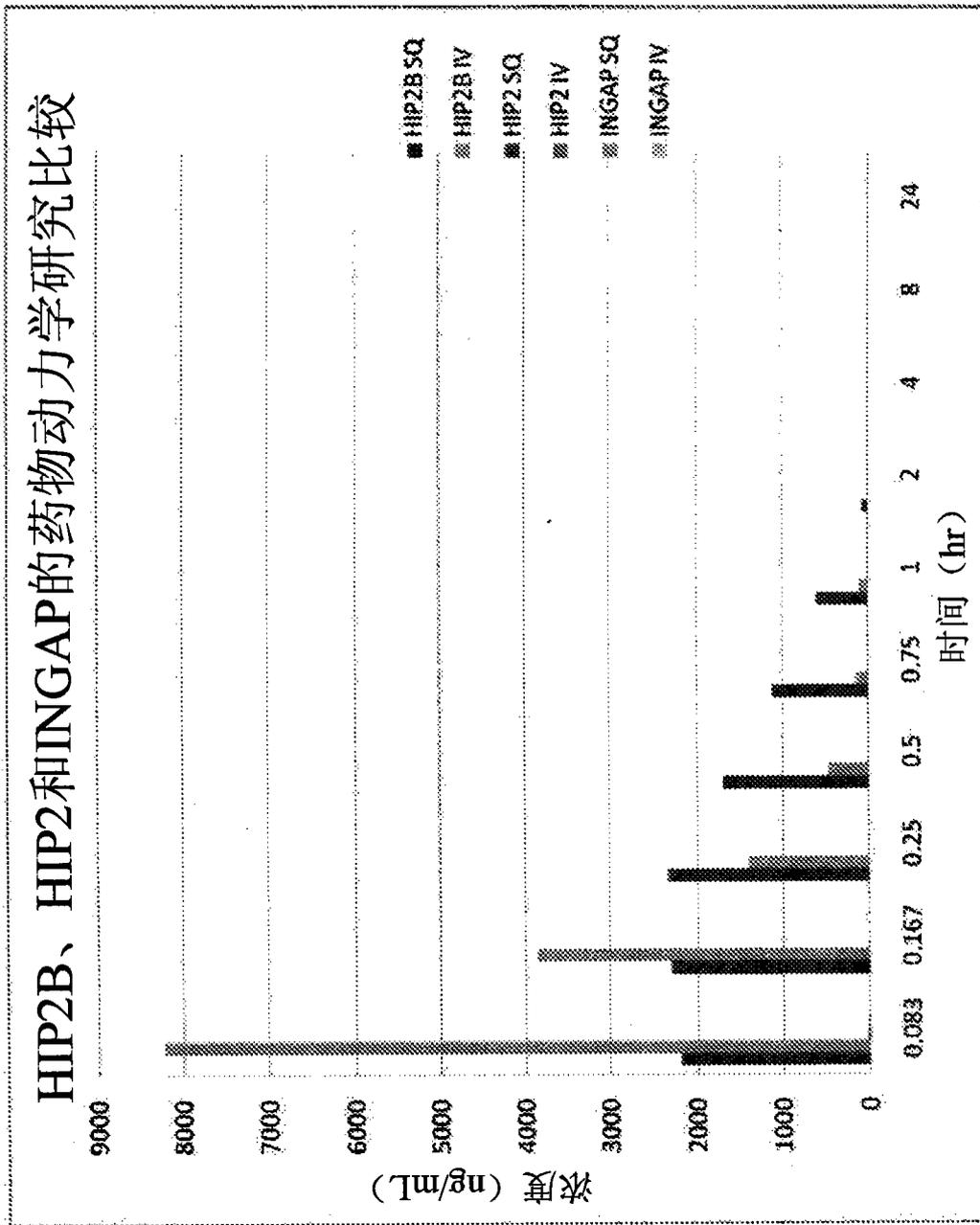


图 24

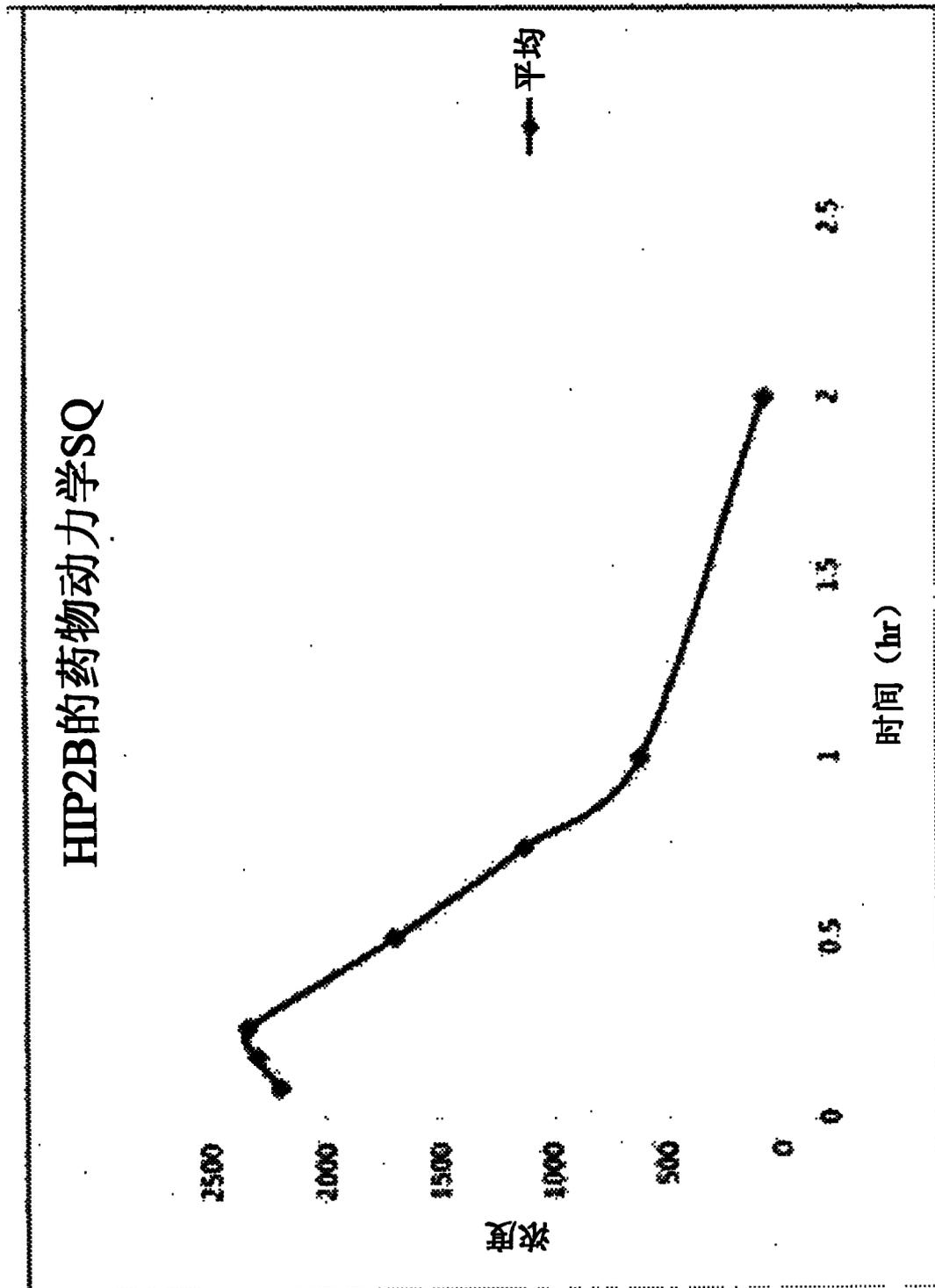


图 25