

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506362

(P2005-506362A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 K 38/00

A 6 1 P 3/10

F I

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 3/10

Z N A

テーマコード (参考)

4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁)

(21) 出願番号	特願2003-536523 (P2003-536523)	(71) 出願人	504151941
(86) (22) 出願日	平成14年10月15日 (2002.10.15)		ジーエムピー エンドテラピューティク
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月16日 (2004.4.16)		ス インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/032904		アメリカ合衆国 3 3 3 0 1 フロリダ州
(87) 国際公開番号	W02003/033808		フォート ローダーデール ワン イー
(87) 国際公開日	平成15年4月24日 (2003.4.24)		スト ブロワード ブールバード (番地
(31) 優先権主張番号	60/329, 330		なし) スイート 1 7 0 1
(32) 優先日	平成13年10月16日 (2001.10.16)	(74) 代理人	100077481
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 谷 義一
		(74) 代理人	100088915
			弁理士 阿部 和夫
		(72) 発明者	アーロン アイ. ヴィニック
			アメリカ合衆国 2 3 5 1 0 バージニア
			州 ノーフォーク ラダー ストリート
			4 0 ナンバー 6 0 3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病治療のための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、島細胞新生に関連するタンパク質 (I N G A P) 及び I N G A P ペプチドの投与計画及び製剤を含む。本明細書に開示されている製剤は、医薬組成物として許容できる安定性を有することが明らかにされている。更に、前記製剤は機能性島を再生することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自然発生の哺乳類島新生関連タンパク質の少なくとも 15 の連続するアミノ酸を有するポリペプチドを含む医薬組成物であって、該アミノ酸配列が配列識別番号：1、配列識別番号：2 又は配列識別番号：3 及びその断片に由来しており、pH が約 4 ～ 約 6 である医薬組成物。

【請求項 2】

前記組成物が凍結乾燥粉末又は溶液であることを特徴とする、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記組成物の pH が約 4 ～ 約 5 であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、製薬上許容できるエステル、塩、及びこれらの混合物から成る群から選択される形態であることを特徴とする、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 5】

約 0.1 mg ～ 約 300 mg のポリペプチドを含むことを特徴とする、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 6】

ヒト又はその他の哺乳類における糖尿病治療のための薬剤の製造における、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

【請求項 7】

哺乳類におけるランゲルハンス島、膵β細胞の再生、又は正常な生理学的グルコース調節の確立のための薬剤の製造における、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

【請求項 8】

投与が 1 日 1 回、1 日 2 回、1 日 3 回、1 週間に 1 回、2 週間に 1 回、月 1 回、連続注入及びこれらの組み合わせから成る群から選択される頻度である、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

【請求項 9】

a. 請求項 1 の医薬組成物、及び

b. 用法指示書

を含む、請求項 6 ～ 8 のいずれかに記載の使用のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

膵島細胞塊は、I 型真性糖尿病で失われ、この疾病では進行性自己免疫反応がインスリン産生β細胞の選択的破壊を生じさせる。2 型真性糖尿病は、いわゆる成人発症の疾病であるが若い肥満の人々にも増えている症状で、β細胞塊が正常の 60 % も減少する場合がある。膵臓内で機能するβ細胞の数は、糖尿病の発生、経過及び結果にきわめて重要である。I 型糖尿病では、正常の 2 % 未満までのβ細胞塊の減少がある。II 型糖尿病で発生するような重度のインスリン抵抗性に直面しても、糖尿病が発生するのは、β細胞塊の不十分な代償性増加がある場合に限られる。従って、どちらの主形態の糖尿病の発生でも、適応β細胞成長がないこと及びその後のインスリン分泌の欠乏とみなすことができる。前駆体細胞からの島及びβ細胞の成長を刺激する能力は、島新生として知られ、糖尿病の回復への新規及び魅力的なアプローチである。

【0002】

一連の実験を通じて、イロトロピン (ilotropin) と呼ばれる膵抽出物が調製され、膵管系に関連する先在する前駆細胞からのβ細胞新生を刺激することが実証された。島新生に

10

20

30

40

50

つながる膵管細胞の形質転換は内因成長因子、遺伝子及びタンパク質産生に依存するという仮説に基づいて、その後イロトロピン (ilotropin) 中の活性成分を識別するための研究が行われた。この一連の研究は、新規遺伝子及びその関連タンパク質、島新生関連タンパク質 (INGAP) の発見につながった。

【0003】

INGAPペプチド (INGAP^{104~118}) は、175アミノ酸INGAP内に含有される15アミノ酸配列で、ハムスターで管細胞増殖を刺激することが明らかになっている。INGAPペプチドは、本願に引用され援用される米国特許第5, 834, 590号の配列識別番号: 2のアミノ酸103~117である。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、INGAPペプチドの投与計画及び製剤を含む。本明細書に開示されている製剤は、製薬剤として許容できる安定性及びヒト臨床試験のための十分な安全性を有することが明らかにされている。このようにして調製されたINGAPペプチドは、更に、正常なフィードバック制御を維持する機能性島細胞を再生することが明らかにされている。

【0005】

従って、本発明の目的は、ランゲルハンス島新生に関与する製薬上許容できる安定なINGAPペプチド組成物を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、哺乳類の糖尿病を治療する方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、哺乳類の異常な生理学的グルコース調節を治療する方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、哺乳類の膵β細胞又はランゲルハンス島の数を増加させる方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、島細胞移植を受けた哺乳類を治療する方法を提供することである。

本発明のもう1つの目的は、膵前駆細胞の分化を誘発する方法を提供することである。

【0006】

引用されるすべての文献は、その関連部分において本明細書に引用して援用される；いずれの文献の引用もそれが本発明に関連する先行技術であることの容認として解釈されるべきではない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

(用語の解説)

次のリストは本明細書において使用する用語の定義である。

【0008】

「薬学上許容できる塩」とは、本発明の化合物上のいずれかの酸性 (例えば、カルボキシル) 基に形成された陽イオン性の塩、又はいずれかの塩基性 (例えば、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、モルフィリノ (morphylino) など) 基に形成された陰イオン性の塩である。INGAPペプチドは双性イオン性であることから、いずれの塩も可能であり許容できる。このような塩の多くが、当該技術分野で既知である。好ましい陽イオン性の塩には、アルカリ金属塩 (例えばナトリウム及びカリウム)、アルカリ土類金属塩 (例えばマグネシウム及びカルシウム)、及び有機塩 (例えばアンモニウム) が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい陰イオン性の塩には、ハロゲン化物、スルホン酸塩、カルボン酸塩、リン酸塩などが挙げられる。このような塩には、かつては存在しなかった光学中心を提供し得る付加塩が明らかに企図される。例えば、本発明の化合物からキラル酒石酸塩を調製してもよく、この定義にはこのようなキラル塩が含まれる。意図される塩は、患者である動物、哺乳類、又はヒトに投与される量で毒性のないものである。適切な酸付加塩の例としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、硫酸水素塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、硝酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、蟻酸塩、ステアリン

10

20

30

40

50

酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、アジピン酸塩、グルタル酸塩、乳酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ドデシル硫酸塩、シクロヘキサンスルファミン酸塩などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0009】

「生加水分解性エステル」とは、本発明の化合物のエステル類であり、エステルが化合物の生物活性に本質的に干渉せず、好ましくは化合物の生物活性に干渉せず、又はエステルが宿主内で容易に変換されて活性化化合物を生成するものである。このようなエステルの多くが、米国特許第4,783,443号（ジョンストン（Johnston）及びモバシェリー（Mobashery）、1988年11月8日発行）に記載されているように、当該技術分野において既知である。このようなエステルには、低級アルキルエステル、低級アシルオキシアルキルエステル（アセトキシメチルエステル、アセトキシエチルエステル、アミノカルボニルオキシメチルエステル、ピバロイルオキシメチルエステル、及びピバロイルオキシエチルエステルなど）、ラクトニルエステル（フタリジルエステル及びチオフタリジルエステルなど）、低級アルコキシアシルオキシアルキルエステル（メトキシカルボニルオキシメチルエステル、エトキシカルボニルオキシエチルエステル、及びイソプロポキシカルボニルオキシエチルエステルなど）、アルコキシアルキルエステル、コリンエステル、及びアルキルアシルアミノアルキルエステル（アセトアミドメチルエステルなど）が挙げられる。

10

【0010】

用語「治療」は、本明細書では、少なくとも、本発明の化合物の投与が、被験体、好ましくは哺乳類被験体、より好ましくはヒトで、異常な生理学的グルコース調節に関連する疾病を軽減することを意味するために使用される。従って、「治療」という用語は、被験者の異常な生理学的グルコース調節に媒介される疾患の予防、特に被験者が該疾病にかかりやすいがまだ該疾病と診断されていないときの該疾患の予防；異常な生理学的グルコース調節を媒介とする疾患の抑制；及び／又は異常な生理学的グルコース調節を媒介とする疾患の緩和又は後退を含む。本発明の方法が異常な生理学的グルコース調節を媒介とする疾患の予防を指向する限り、用語「予防」は、疾病状態が完全に防止されることを必要としないことが理解される（ウェブスター（Webster）の大学生用辞典第9版）。むしろ、本明細書で使用する時、予防という用語は、異常な生理学的グルコース調節を媒介とする疾患が現れる前に本発明の化合物を投与できるように、異常な生理学的グルコース調節を媒介とする疾患にかかりやすい集団を識別する、当業者の能力を指す。この用語は、疾病状態を完全に回避することを意味するものではない。異常な生理学的グルコース調節を媒介とする疾患（例えば、I型及びII型糖尿病）の危険がある集団は、該疾病の家族歴によって示される、糖尿病にかかりやすい遺伝的体質を有する人である。その他のリスク要因には、肥満又は食事が挙げられる。

20

30

【0011】

（製造及び安定性）

INGAPペプチドは天然の175アミノ酸INGAP内に含有されるアミノ酸番号104～118から成る15アミノ酸配列である。INGAPペプチドは、当該技術分野において既知の種々の手段のいずれでも合成できるが、好ましい合成手段は、9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）固相合成を通じる手段である。INGAPペプチドの好ましい形態は、製薬上許容できる塩の形態、好ましくは酢酸塩のINGAPペプチドである。ペプチドの塩の生成は、当該技術分野において既知である。Fmoc合成は、米国特許第4,108,846号に記載されている。Fmocは、ピペリジンを使用して樹脂からメトキシカルボニル（moc）を分割し、トリフルオロ酢酸（TFA）を使用してペプチドを分割する。この方法に従って製造されたINGAPは、分取HPLCクロマトグラフィーによって容易に精製できる。

40

【0012】

INGAPペプチドは、次のアミノ酸配列を有する：

50

NH₂-I l e-G l y-L e u-H i s-A s p-P r o-S e r-H i s-G l y-T h r-L e u-P r o-A s n-G l y-S e r-C O O H (配列識別番号: 3)

I N G A P ペプチドは、化学式が C₆₄H₁₀₀N₂₀O₂₂ であり、分子量が 1 5 0 1 . 6 ± 1 ダルトンであり、比旋光度が 1 % 酢酸中で - 1 0 3 . 2 ° である。

【0013】

I N G A P ペプチドの構造は、I N G A P ペプチド分子をその構成要素のアミノ酸に加水分解するアミノ酸解析によって確認される。アミノ酸は分子構造に基づいて定量化され、正しいモル比で存在することが証明される。ペプチドの分子質量は、エレクトロスプレー質量分析を用いて測定でき、分子の計算された理論質量と一致すべきである (1 5 0 1 . 6 ± 1 質量単位)。

10

【0014】

合成分子が生物活性であることを確認するため、バイオアッセイを使用して活性を確認してもよい。A T C C (米国バージニア州マナッサス) から入手できるラット臍管細胞系の A R I P 細胞が該アッセイに使用される。細胞を 9 6 穴培養プレートに 1 0 , 0 0 0 個/穴で播き、1 0 % のウシ胎児血清を含有するダルベッコ (Dulbecco) の最少必須培地 (D M E M) 中で 2 4 時間培養する。2 4 時間後、血清を含有しない D M E M で培地を置き換える。一対の穴を種々の用量 (0、1 0⁻³ 及び 1 0⁻⁵ g / m l) の I N G A P ペプチドで処理する。2 1 時間後、培地にブロードオキシウリジン (B r d U) 細胞増殖 E L I S A キット (ロッシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ (Roche Molecular Biochemicals)) からの B r d U 標識溶液を追加し、更に 3 時間培養する。2 4 時間後、細胞を 6 0 ° C で 6 0 分間乾燥し、固定及び変性する。これらを、すべてキットの指示に従って B r d U 抗体に 9 0 分間暴露し、1 5 分間成長させる。B r d U 標識を、ワラック・ビクトール (Wallac Victor) 1 4 2 0 マルチラベルカウンタ (Multilabel Counter) で定量する。結果を、1 穴当たり 1 0 0 ~ 2 0 , 0 0 0 細胞の密度で播種され同じ培養プレートで成長した細胞の標準曲線と比較する。図 1 に示すように、このアッセイを使用したとき、0 . 1 µ g / m l の I N G A P ペプチドで処理した培養の対照と比べて細胞数が約 1 . 6 倍増加する。

20

【0015】

(バルク I N G A P ペプチドの安定性)

安定性は、試料の純度、不純物の全パーセンテージ、(H P L C 又はその他の好適な定量法によって測定された) 個々の不純物のパーセンテージ、外観、及び水分含有量が挙げられるがこれらに限定されない種々のパラメータを比較することによって決定される。H P L C 法は、I N G A P ペプチドのレベルと比較した分解生成物のレベルの増加を決定するのに使用できる。I N G A P ペプチド試料 (溶液及び凍結乾燥粉末のいずれも) は、種々の温度で、湿気の存在又は非存在下で、及び明色又は暗色バイアル瓶で保管される。異なる保管条件での分解は、不純物の増加及び I N G A P ペプチド含有量の減少につながる。試料調製は、8 0 % を超える純度、好ましくは 9 0 % を超える純度、より好ましくは 9 5 % を超える純度、及び最も好ましくは 9 7 % を超える純度であることが望ましい。

30

【0016】

凍結乾燥粉末としての I N G A P ペプチドは、種々の保管条件下で安定である。I N G A P ペプチドの純度は、これらの条件下で維持され、分解生成物は許容できるレベルよりも低い。最大 6 ヶ月までの更なる保管は、I N G A P ペプチドのいかなる目立つ分解も引き起こさない。

40

【0017】

(組成物)

本発明の別の態様は、(a) 安全且つ有効な量の本発明のペプチドと (b) 製薬上許容できる担体とを含む組成物である。レミントンの製薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences) (マック出版社 (Mack Publishing Company) (ペンシルバニア州イーストン)) 最新版に開示されているものなどの、標準的な医薬品製剤技術が使用される。

【0018】

50

「安全且つ有効な量」とは、それを必要とする動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒト被験者で、治療される症状において良い方向への変化を有意に誘発するのに十分であるが、重大な副作用（毒性、炎症、アレルギー反応など）を回避する程十分に低く、本発明の方法で使用されたときに妥当な利益対危険性比に相応の本発明のペプチドの量を意味する。具体的な「安全且つ有効な量」は、明らかに、治療される特定の症状、被験者の身体的条件、治療持続期間、併用療法の性質（もしあれば）、使用される固有の剤形、用いられる担体、その中におけるペプチドの溶解度、及び組成物に望まれる投与計画のような要因によって変化する。当業者は本発明による「安全且つ有効な量」の決定に、次の教示を使用してもよい。スピルカー（Spilker）B. 著、臨床研究及びプロトコル作成の手引（Guide to Clinical Studies and Developing Protocols）、レーブン・プレス・ブックス社（Raven Press Books, Ltd.）、ニューヨーク、1984年、7～13頁、54～60頁；スピルカー（Spilker）B. 著、臨床試験の手引（Guide to Clinical Trial）、レーブン・プレス社（Raven Press, Ltd.）、ニューヨーク、1991年、93～101頁；クレイグ（Craig）C.、及びR. スティツェル（Stitzel）編、現代薬理学（Modern Pharmacology）、第2版、リトルブラウン社（Little, Brown and Co.）、ボストン、1986年、127～33頁；T. スピート（Speight）編、エイブリーの薬物治療：臨床薬理学及び治療の原理と実践（Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics）、第3版、ウィリアムス・アンド・ウイルキンス（Williams and Wilkins）、ボルチモア、1987年、50～56頁；R. タラリダ（Tallarida）、R. ラファ（Raffa）及びP. マクゴニグル（McGonigle）著、一般薬理学の原理（Principles in General Pharmacology）、スプリングー・フェアラー（Springer-Verlag）、ニューヨーク、1988年、18～20頁。

【0019】

本発明のペプチドは、製薬上許容できる緩衝液に溶解又は懸濁される。ペプチドが溶解される緩衝液は、ペプチドのpH、溶解度及び従って生物学的利用能に影響しうる。緩衝液の選択はペプチド組成物、投与経路、並びに望ましいペプチドの溶解性、生理学的環境でのペプチドの半減期、及び生理学流体のpH及び緩衝能の程度によって異なる。好ましい緩衝液のpHは、ペプチドの pK_a 値に近くてもよく、又はペプチドが送達される生理学的環境に依存してもよい。好適な緩衝液には、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、グリシン、クエン酸塩、イミダゾールなどが挙げられるが、これらに限定されない。特に好ましい緩衝液は、酢酸塩緩衝液である。

【0020】

対象となるペプチドに加えて、対象の発明の組成物は、製薬上許容できる担体を含有する。本明細書中使用するとき、「製薬上許容できる担体」という用語は、動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトへの投与に好適な、1つ以上の適合性のある固体又は液体充填剤希釈溶液又はカプセル化物質を意味する。本明細書中使用するとき、「適合性のある」という用語は、この組成物の構成成分が、通常の使用状況下で、組成物の薬学的有効性を実質的に減少させる相互作用がないような方式で、対象のペプチドと互いに混ざり合うことができることを意味する。当然、製薬上許容できる担体は治療される動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトへの投与に好適であるように、十分に純度が高く、且つ十分に毒性が低くなければならない。対象の化合物と併せて使用すべき製薬上許容できる担体の選択は、ペプチドの投与手段によって基本的に決定される。対象のペプチドが注入される場合、製薬上許容できる好ましい担体は、血液適合性のあるコロイド状懸濁剤を用いて無菌に調製される。

【0021】

特に、全身投与のための製薬上許容できる担体には、糖、デンプン、セルロース及びその誘導体、麦芽、ゼラチン、タルク、硫酸カルシウム、植物油、合成油、ポリオール、アルギン酸、リン酸塩緩衝液、乳化剤、等張生理食塩水、及び発熱物質を含まない水が挙げられる。非経口投与のために好ましい担体には、プロピレングリコール、エチルオレエート、ピロリドン、エタノール、及びゴマ油が挙げられる。好ましくは、製薬上許容できる担

体は、非経口投与のための組成物では全組成物の少なくとも約90重量%含まれる。

【0022】

本発明の組成物は、好ましくは単位剤形で提供される。本明細書で使用するとき、「単位剤形」とは、優良医療基準に準じ、1回の投薬において動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒト被験体への投与に好適な量のINGAPペプチドを含有する本発明の組成物である。これらの組成物は好ましくは約0.1mg（ミリグラム）～約300mg、より好ましくは約5mg～約150mgのINGAPペプチドを含有する。本発明の組成物を用いた治療の頻度は、所望の大粒丸薬（ボラス：bolus）を達成するために、並びに副作用を回避するために変更されてもよい。従って、治療スケジュールの非限定例には、1日1回、1日2回、1日3回、1週間に1回、2週間に1回、月1回、及びこれらの組み合わせが挙げられる。あるいは、本発明の組成物は、連続注入で投与されてもよい。

【0023】

本発明の組成物は、例えば経口投与、局所投与、鼻腔又は非経口投与に適した、さまざまな形態のいずれにすることもできる。所望する特定の投与経路によって、当該技術分野において周知の製薬上許容できるさまざまな担体を使用してもよい。これらには、固体又は液体の充填剤、希釈剤、ヒドロトロップ、界面活性剤、及びカプセル化物質が挙げられる。INGAPペプチドの活性に実質的に干渉しない、任意の医薬品活性物質を含んでもよい。INGAPペプチドと共に用いる担体の量は、INGAPペプチドの1回用量につき実用的な投与物質質量を与えるのに十分な量である。本発明の方法において有用な剤形を作るための技術と組成物は、以下の参考文献に記載されている：現代薬剤学（Modern Pharmaceutics）、9章及び10章、バンカー&ロードス（Banker & Rhodes）編（1979年）；リーバーマン（Lieberman）ら、製薬剤形：錠剤（Pharmaceutical Dosage Forms：Tablets）（1981年）；及びアンセル（Ansel）、製薬剤形入門（Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms）、第2版（1976年）。

【0024】

（INGAPペプチド製剤）

好ましいINGAPペプチド製剤は、無菌水及び張度の調節のため必要に応じて塩化ナトリウムを用いた注入溶液であり、0、7.5、30、及び120mg／0.5ml／バイアルの4種類の濃度で調製される。pHを好ましいレベルに調節するため、必要に応じて塩酸及び水酸化ナトリウムを使用してもよい。更なる濃度を、高濃度原料液を等張生理食塩水を用いて希釈することによって調製してもよい。希釈はINGAPペプチドの生物学的効力に影響しない。

【0025】

こうして調製されたINGAPペプチド製剤は、5℃で保管され、暗色又は明色の容器に入れられたとき、pH4～6の範囲内で安定である。ただし、組成物が25℃で保管された場合には多少の分解が観察される。分解は、pH4.5の組成物よりもpH6の組成物の方で、より明白である。INGAPペプチドは、8℃未満及びpH6未満で保管したときに、より安定であるように見える。

【実施例】

【0026】

（実施例1） 注入用INGAPペプチド溶液

INGAPペプチドの溶液120mgを以下の規格に従って調製する。

【0027】

【表1】

10

20

30

40

(表 1)

パラメータ	規格
外観	無色透明溶液
アッセイ	各バイアル瓶は 90.0%～110.0%のINGAPペプチドを含有
不純物	各不純物:1.0% 全不純物:3.0%
pH	4.0～5.0
細菌内毒素	NMT2.92EU/mg
無菌	USP準拠

10

【0028】

(実施例2) 正常なハムスターへのINGAPペプチド投与

INGAPペプチドを、正常なハムスターにおける島形成に対する影響について調査した。INGAPペプチド5mg/kg(25mg/m²)を1日1回4週間腹腔内投与し、10日目及び30日目にβ細胞塊を評価した。INGAPペプチド処置によって、プラセボ処置動物と比較して島の数の有意な増加が生じた(図2)。島新生効果は、より多くのインスリンの産生及び膵臓内の島の数の増加によって明らかであった。新たに形成されたβ細胞は、膵管の壁に現れ、膵管から発達していた。これらのインスリン陽性細胞は、管の上皮細胞の分化及び島細胞の成長の結果生じ、その出現はINGAPペプチド処置の用量及び持続時間に比例した。より長期間の処置の間に、これらの細胞は管から離れて膵臓の実質組織で島を形成した。INGAPペプチドの10日間連続投与の後、島の数は30%増加し、30日までに組織内の島の数は2倍になり、動物モデルでイロトロピン(ilotropin)、rINGAP及びセロハンラッピングを用いた過去の観察と一致した。

20

【0029】

(実施例3) インビボ有効性試験

C57BL/6JマウスをSTZ(35mg/kg/日×5日)で糖尿病にし、INGAPペプチド処置(250μgを1日2回)群及び生理食塩水対照群に各4匹ずつ分けた。INGAPペプチド処置動物は4匹すべてで血糖濃度が正常値に回復したのに対し、生理食塩水処置マウスはすべて高血糖のままであった(図3)。39日後に投与を停止し、更なる観察により、試験を終了した48日後までの効果の持続性が明らかになった。INGAPペプチド処置動物の組織病理学的評価の結果、正常に出現している島の存在と新たな島の形成領域の両方が、インスリン及びグルカゴン分泌細胞の正常な補体及び分布を含めて明らかになった(図4及び6)。グルカゴンは低血糖症に対する防御において主要な役割を果たすことから、グルカゴン産生細胞の出現は注目に値する。INGAPペプチドが誘発する島新生のこの特徴は、過剰な糖尿病治療に付随して起こる低血糖症の対応調整管理障害の逆転に役立つ可能性がある。低血糖症は、INGAPペプチド処置動物のいずれにも観察されなかった。生理食塩水処置した対照動物では、新しい島の形成は観察されなかった。INGAPペプチド投与は、転写因子PDX-1を発現する細胞によって証明されるように、管細胞の分化転換を誘発した(図5)。生理食塩水処置したSTZ-糖尿病動物の島は、重度の炎症細胞浸潤を示し、壊死していた。INGAPペプチド処置動物では、炎症は著しく減少し、島は健康に見えた(図6)。

30

40

【0030】

図4は、ストレプトゾトシン処置し、更にINGAPペプチド処置したC57BL/6Jマウスの膵臓の免疫細胞化学的特徴を示す。左上のパネルは、抗インスリン抗体で染色した管上皮のセグメントになお結合している島で、インスリンタンパク質の正常な存在及び分布を示している。左下のパネルは、抗グルカゴン抗体と抗ソマトスタチン抗体との混合物で染色した同じ島を示し、これも島外套領域におけるこれらの島細胞タンパク質の正常な分布を示している。右上のパネルは、H&E染色で染色した管から発達した、新たに形成された島を示す。右下のパネルは、管の壁の中のインスリン陽性細胞を示す。

【0031】

50

(実施例4) 31日間マウス試験(反復投与)

マウスにINGAPペプチドを0、2、20、及び100mg/kg/日で1日1回31日間注入して、反復投与毒性試験を実施した。この試験では、オス10匹及びメス10匹ずつを4つの処置群に割り当て、及び回復動物(オス5匹及びメス5匹)の2つの処置群を割り当てた。終了時に血液を採取し、肉眼及び顕微鏡観察のために剖検を実施した。各群の動物の約半分で、臨床病理学及び血清レベルを評価した。選択された器官(脳、副腎、心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、及び脾臓)の重量を測定し、相対的な器官重量を計算した。膵臓の切片を除去し、インスリン含有量評価のために液体窒素中で凍結した。膵臓組織の切片を独立顕微鏡検査に提出した。回復動物は、投与停止から28日後に屠殺した。更なる調査のための種々のパラメータ並びに潜在的に薬剤に関連する異常知見を評価し、再現性及び潜在的臨床有意性を決定した。 10

【0032】

筋肉内注射による31日間連続INGAPペプチド投与は、投与停止時及び処置後28日間の評価で、用量関連の悪影響が生じなかった。注入部位の炎症が、最高用量のとき大きい頻度でオス及びメスに観察されたが、同じ用量で回復動物にはもはや観察されず、炎症の可逆性を示した。この31日試験で、高用量のオスの動物1匹に、脾臓での髄外造血が認められた。炎症細胞浸潤、浮腫、壊死又は萎縮の顕微鏡的証拠は観察されなかった。顕著な所見は、小さな島の数が、管関連及び腺房組織中の両方で増加したことであった。31日連続投与2時間後のINGAPペプチドの血清レベルは、定量限界以下であった。インスリン陽性組織面積の増大によって測定される製薬活性が、これらの動物で観察された(図7)。この結果は、無有害性影響量(NOAEI)が31日投与したCD-1マウスで100mg/kgより大きいことを示唆する。 20

【0033】

(実施例5) 34日間イヌ試験(反復投与)

ビーグル犬にINGAPペプチドを0、0.5、1.5、及び10mg/kg/日で1日1回34日間筋肉内注射して、反復投与毒性試験を実施した。34日目の処置終了時に屠殺した動物から、及び処置終了から25日後に屠殺した回復動物から、膵臓組織をβ細胞塊の定量化のために免疫組織化学によって得た。膵臓β細胞塊は、INGAPペプチド投与後に増加した(図8参照)。これらの結果は、試験した用量範囲でのINGAPペプチドの筋肉内注射が、正常なビーグル犬で生物学的に重要な反応を生じさせることを示す。更に、膵臓組織切片の詳細な評価で、浮腫、炎症細胞浸潤、壊死又は萎縮のような変化は認められなかった。 30

【0034】

(実施例6) ヒト臨床試験

用量は、多くの場合、動物での有効性及び安全性試験の結果に基づく。I型又はII型真性糖尿病の治療で、7.5mg(60kgの患者の場合、0.125mg/kg、又は4.625mg/m²)及び120mg(60kgの患者の場合、1.6mg/kg、又は74mg/m²)の2つの用量のINGAPペプチドを例証する。INGAPペプチド処置の有効性を決定するため、以下のパラメータを評価する。

【0035】

1. 全インスリン用量が維持された状態で、空腹時グルコースレベルが35mg/dlより大きく減少。
2. 空腹時グルコースレベルが米国糖尿病学会(ADA)基準により決められた正常範囲に維持された状態で、インスリン用量の減少が25%。
3. 空腹時C-ペプチドの1ng/mlを超える増加が得られる。サスタカル(Sustacal)(登録商標)(ブースト(Boost)(登録商標))に反応してC-ペプチドの2ng/mlを超える増加が得られる。

【0036】

各患者は無作為にINGAPペプチドの1回の単回筋肉内注射を受ける。有効性及び安全性データの評価後、患者は、医師が適切と考えた場合に更にINGAPペプチド注入を受 50

けてもよい。

【0037】

以下の表に、INGAPペプチド処理又はプラセボ処置を受けた患者に実施された評価の部分的一覧を要約する。

【0038】

【表2】

(表2) 評価スケジュール

手順	スクリーン	基礎	処置期間 1～34日						フォローアップ 35～63±2日			
			1	7	14	21	28	34	42	49	56	63
訪問日												
理学的検査	X	X						X				X
生命徴候	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
臨床的実験室試験	X	X		X	X	X	X	X				X
INGAPペプチドの血漿PK		X	X	X	X	X	X	X	X			

10

【0039】

(刺激C-ペプチド)

刺激C-ペプチド試験は、少なくとも10時間の一晚絶食期間の後の朝に実施される。試験は、空腹時グルコースが80～250mg/dlである場合に限り実施される。患者は、前日の夜に自分の糖尿病薬を飲むことができるが、試験の朝は試験が終了するまで該薬を服用すべきではない。ブースト(Boost)(登録商標)摂取の直前、及び摂取の0.5、2、及び4時間後にC-ペプチド測定用の血液試料を採取する。ブースト(Boost)(登録商標)は経口摂取で投与される。患者は、その空腹時C-ペプチドが1.0ng/ml未満であり、その最大刺激C-ペプチド値が2.0ng/ml未満である場合、インスリン欠乏とみなされる。

20

【0040】

処置の結果、INGAPペプチドを受けた患者は糖負荷の改善、空腹時グルコースレベルの低下、必要なインスリン用量の低下、空腹時C-ペプチドレベルの増大、及びブースト(Boost)(登録商標)に反応したC-ペプチドレベルの増大を示した。プラセボ処置を受けた患者はこのような改善を示さない。

【0041】

特に指定された場合を除き、数量、パーセンテージ、部分、及び割合を含むすべての量は、「約」という語で修飾されると理解され、量は有効数字を表すことを意図しない。特に指定された場合を除き、「a」、「an」及び「the」は「1又はそれ以上」を意味する。

30

【0042】

本発明の特定の実施形態について説明し記載したが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、様々な他の変更及び修正が可能であることは、当業者に明らかである。従って、添付の特許請求の範囲に、本発明の範囲内にあるすべてのこうした変更及び修正を包含することを意図する。

【図面の簡単な説明】

【0043】

40

【図1】細胞数の用量依存性増加を示すINGAPペプチド処置したARIP細胞(ラット膵管細胞系)を示す。

【図2】正常なシリアンハムスターへのINGAP投与後の島細胞塊の増加を示す。

【図3】ストレプトゾトシン誘発糖尿病のC57BL/J6マウスでのINGAPペプチド又は生理食塩水投与後の血糖の時間的経過を示す。

【図4】INGAPペプチド処置したストレプトゾトシン誘発糖尿病のC57BL/J6マウスから得た膵臓のインスリン及びグルカゴンの正常な分布を示す。

【図5】INGAPペプチドがC57BL/J6マウスの膵管壁細胞内でPDX-1発現を刺激することを示す。

【図6】ストレプトゾトシン処置した、及びストレプトゾトシン後にINGAP処置した

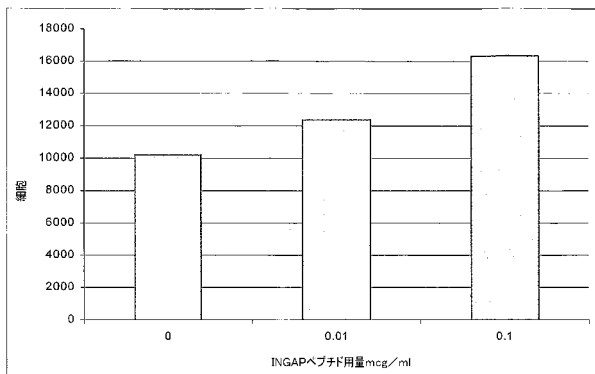
50

C57BL/J6マウスから採取した膵臓の組織学的比較を示す。

【図7】INGAPペプチドで31日間処置した正常なマウスでのインスリン免疫反応性組織面積の増加を%で示す。

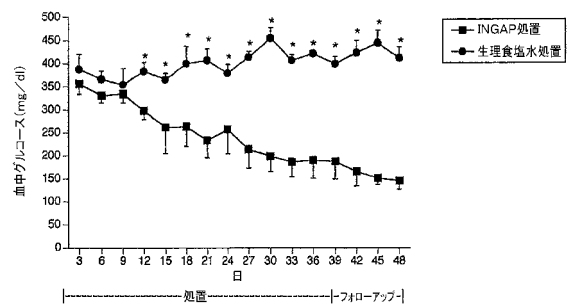
【図8】INGAPペプチドで34日間処置した正常な犬でのインスリン免疫反応性組織面積の増加を%で示す。

【図1】



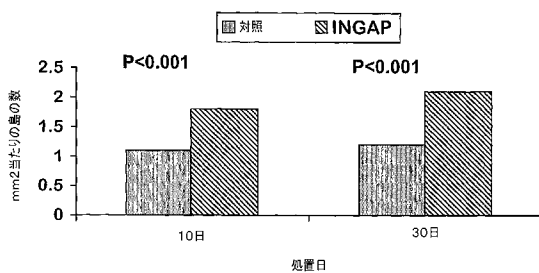
細胞数の用量依存性増加を示すINGAPペプチド処置されたARIP細胞(ラット膵管細胞系)。

【図3】



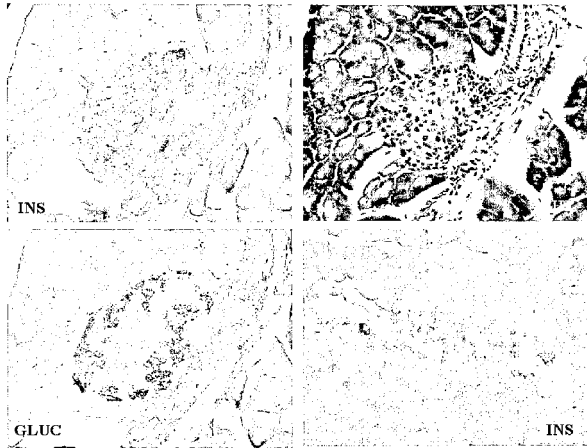
マウスにINGAPペプチド250 μ g/kgを1日2回又は生理食塩水を39日間投与した後の血中ぶどう糖の時間的変化。血中グルコース濃度は、3日毎に測定した。動物は、INGAPペプチド注入停止後更に9日間追跡され、処置効果の持続性が実証された。* $P < 0.025$ 生理食塩水処置した動物と比較

【図2】



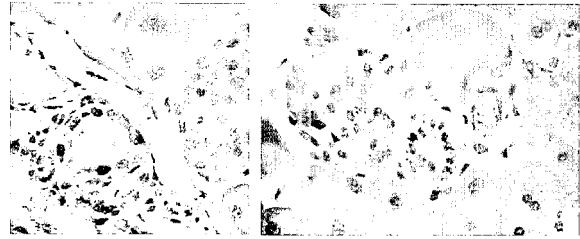
INGAPペプチドによる膵臓内分泌細胞増殖の増大。正常なシリアンゴールデンハムスターを、生理食塩水(対照)又はINGAPペプチドの腹腔内投与で10日又は30日間処置した。島の数/mm²を、イメージプロプラス(Image-pro Plus)ソフトウェアを用いるコンピュータ援用形態測定システムを用いて求めた。

【図 4】



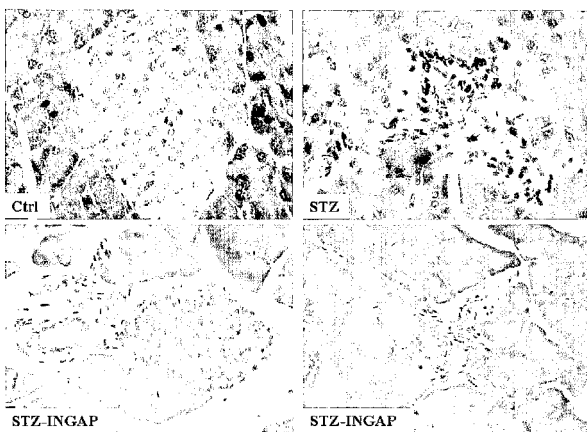
INGAPペプチド処置したストレプトゾトシン糖尿病C57BL/6Jマウスの膵臓の免疫細胞化学的特徴。左上のパネルは、抗インスリン抗体で染色した管上皮のセグメントにおお結合している島で、インスリンタンパク質の正常な存在及び分布を示している。左下のパネルは、抗グルカゴン及び抗ソマトスタチン抗体の混合物で染色した同じ島を示し、これも島外を領域におけるこれらの島細胞タンパク質の正常な分布を示している。右上のパネルは、HE染色で染色した管から発達した、新たに形成された島を示す。右下のパネルは、島の壁の中のインスリン陽性細胞を示す。

【図 5】



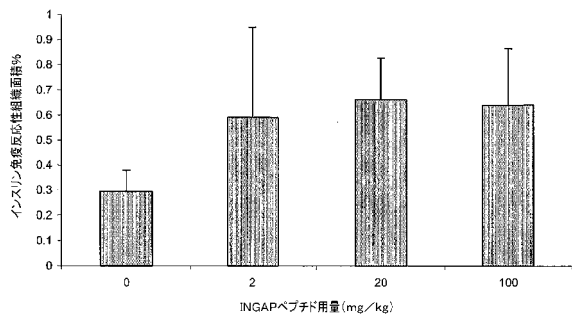
INGAPペプチドは、C57BL/6Jマウスの膵管でのPDX-1発現を刺激する。右のパネルは、島細胞新生に関連するPDX-1免疫反応性の第2の領域である。暗く染色された物質は、管壁中の細胞のPDX-1の出現である。

【図 6】



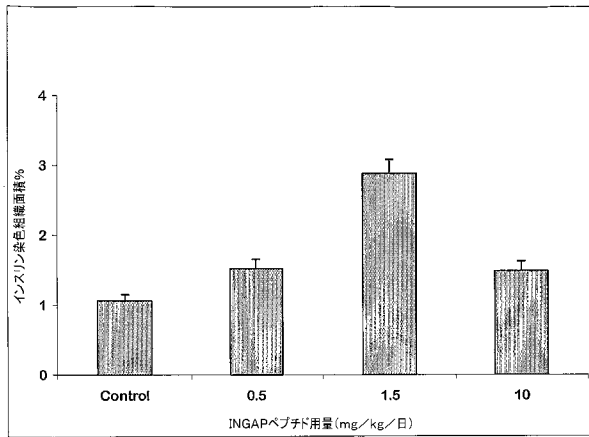
ストレプトゾトシン処置したC57BL/6Jマウスの膵臓の組織学的特徴。右下のパネル(STZ-INGAP)は、INGAPペプチド処置した動物の膵臓を、隣接する小葉内細導管から発達する細胞として観察される島細胞新生領域と共に示す。左下のパネル(STZ-INGAP)は、INGAPペプチド処置した動物の膵臓内に正常に出現している島である。右上のパネル(STZ)は、インスリン炎に特徴的な炎症細胞浸潤を伴う壊死島を示す生理食塩水処置した動物の膵臓を示す。左上(Ctrl)は、正常な島の組織学的特徴を示す正常な年齢一致対照マウスの膵臓を、比較のために示す。INGAPは島組織を正常な方向へ回復していることに注意する。

【図 7】



INGAPペプチドで31日処置した後の正常なマウスの免疫陽性組織面積。データは平均±SEM。インスリン染色された断面のパーセンテージを、オリンパス(Olympus)顕微鏡(150×)及び画像解析ソフトウェア(イメージプロプラス(Image Pro Plus)、バージョン4.0、メディアサイバネティクス(Media Cybernetics))を用いて決定した。

【図 8】



INGAPペプチドの犬への1日1回34日間投与が、免疫組織化学的染色によってインスリン陽性になる膵臓内の細胞面積に及ぼす影響。データは平均±SEM。インスリン染色された断面積のパーセンテージを、オリンパス(Olympus)顕微鏡(150×)及び画像解析ソフトウェア(イメージプロプラス(Image Pro Plus)、バージョン4.0、メディアサイバネティクス(Media Cybernetics))を用いて決定した。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 April 2003 (24.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/033808 A2

- (51) International Patent Classification: D06M
- (21) International Application Number: PCT/US02/32904
- (22) International Filing Date: 15 October 2002 (15.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/329,330 16 October 2001 (16.10.2001) US
- (71) Applicant: **THE PROCTER & GAMBLE COMPANY**
[US/US]; One Procter & Gamble Plaza, Cincinnati, OH 45202 (US).
- (72) Inventors: **VINIK, Aaron, I.**; 40 Radar Street, #603, Norfolk, VA 23510 (US). **ROSENBERG, Lawrence**; 16507 Fern Road, Montreal, Quebec H4V1E4 (CA). **PITTENGER, Gary**; 3701 Prince Andrew Lane, Virginia Beach, VA 23452 (US). **TAYLOR-FISHWICK, David**; 6117 Rolfe Avenue, Norfolk, VA 23508 (US). **SALEM, Michael**; 2100 North Ocean Boulevard, Apt. 904, Ft. Lauderdale, FL 33305 (US). **MOHRLAND, Scott**; 10833 Blackhawk Street, Plantation, FL 33324 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CIL, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EL, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GL, GH, GM, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*
- (74) Agents: **REED, T, David et al.**; The Procter & Gamble Company, 6110 Center Hill Road, Cincinnati, OH 45224 (US).

WO 03/033808 A2

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR TREATING DIABETES

(57) Abstract: The present invention comprises dosing regimens and formulations of islet cell neogenesis associated protein (INGAP) and INGAP Peptide. The formulation disclosed herein is shown have acceptable stability as a pharmaceutical composition. Further, the formulation is able to regenerate functional islets

WO 03/033808

PCT/US02/32904

COMPOSITION AND METHOD FOR TREATING DIABETES**Background**

Pancreatic islet cell mass is lost in type I diabetes mellitus, a disease in which a progressive autoimmune reaction results in the selective destruction of insulin-producing β -cells. In type 2 diabetes mellitus, so-called adult-onset disease, but also increasingly a condition in young overweight people, the β -cell mass may be reduced by as much as 60% of normal. The number of functioning β -cells in the pancreas is of critical significance for the development, course, and outcome of diabetes. In type 1 diabetes, there is a reduction of β -cell mass to less than 2% of normal. Even in the face of severe insulin resistance as occurs in type II diabetes, the development of diabetes only occurs if there is inadequate compensatory increase in β -cell mass. Thus, the development of either major forms of diabetes can be regarded as a failure of adaptive β -cell growth and a subsequent deficiency in insulin secretion. The ability to stimulate the growth of islets and β -cells from precursor cells, known as islet neogenesis, would be a novel and attractive approach to the amelioration of diabetes.

Through a series of experiments a pancreatic extract, termed ilotropin, was prepared and demonstrated to stimulate β -cell neogenesis from pre-existing progenitor cells associated with the pancreatic ductal system. Based on the hypothesis that

WO 03/033808

PCT/US02/32904

pancreatic ductal cell transformation leading to islet neogenesis is dependent upon endogenous growth factors, genes, and protein products, a search ensued to identify the active ingredient in ilotropan. This line of investigation led to the discovery of a novel gene and its associated protein, the islet neogenesis associated protein (INGAP).

5 INGAP Peptide (INGAP¹⁰⁴⁻¹¹⁸), a 15 amino acid sequence contained within the 175 amino acid INGAP, has been shown to stimulate ductal cell proliferation in hamsters. INGAP Peptide is amino acids 103-117 of SEQ ID. NO: 2 of U.S. Patent 5,834,590 which is incorporated herein by reference.

10 **Summary of the Invention**

The present invention comprises dosing regimens and formulations of INGAP Peptide. The formulation disclosed herein is shown to have acceptable stability as a pharmaceutical agent and adequate safety for human clinical trials. INGAP Peptide thus prepared is further shown to regenerate functional islet cells that maintain normal

15 feedback controls.

Thus, it is an object of the present invention to provide a pharmaceutically acceptable and stable composition of INGAP Peptide that is involved in islet of Langerhans neogenesis.

20 Another object of the invention is to provide methods for treating diabetes in a mammal.

It is another object of the invention to provide methods for treating abnormal physiological glucose regulation in a mammal.

It is another object of the invention to provide methods of increasing the number of pancreatic beta cells or islets of Langerhans in a mammal.

25 It is another object of the invention to provide a method of treating mammals receiving islet cell transplants.

It is another object of the invention to provide a method for inducing differentiation of pancreatic progenitor cells.

30 All documents cited are, in relevant part, incorporated herein by reference; the citation of any document is not to be construed as an admission that it is prior art with respect to the present invention.

WO 03/033808

PCT/US02/32904

Description of Drawings and Figures

Figure 1 shows INGAP Peptide treated ARIP cells (a rat pancreatic duct cell line) showing a dose dependant increase in cell number.

Figure 2 shows an increase in islet cell mass following administration of INGAP to Normal Syrian Hamsters.

Figure 3 shows the time course of blood glucose following administration of INGAP Peptide or saline in streptozotocin-induced diabetic C57BL/J6 mice.

Figure 4 shows the normal distribution of insulin and glucagon in a pancreas from a streptozotocin-induced diabetic C57BL/J6 mouse treated with INGAP Peptide.

Figure 5 shows that INGAP Peptide stimulates PDX-1 expression in cells in the pancreatic duct wall of a C57BL/J6 mouse.

Figure 6 shows a histological comparison of pancreases taken from C57BL/J6 mice treated with streptozotocin and streptozotocin followed by treatment with INGAP.

Figure 7 shows the increase in % insulin immunoreactive tissue area in normal mice treated with INGAP Peptide for 31 days.

Figure 8 shows the increase in % insulin immunoreactive tissue area in normal dogs treated with INGAP Peptide for 34 days.

Detailed Description of the Invention**Glossary of Terms**

The following is a list of definitions for terms used herein.

A "pharmaceutically-acceptable salt" is a cationic salt formed at any acidic (e.g., carboxyl) group, or an anionic salt formed at any basic (e.g., amino, alkylamino, dialkylamino, morpholino, and the like) group on the compound of the invention. Since INGAP Peptide is zwitterionic, either salt is possible and acceptable. Many such salts are known in the art. Preferred cationic salts include, but are not limited to, the alkali metal salts (such as sodium and potassium), alkaline earth metal salts (such as magnesium and calcium) and organic salts, such as ammonium. Preferred anionic salts include halides, sulfonates, carboxylates, phosphates, and the like. Clearly contemplated in such salts are addition salts that may provide an optical center, where once there was none. For example, a chiral tartrate salt may be prepared from the compounds of the invention, and this definition includes such chiral salts. Salts contemplated are nontoxic in the amounts

WO 03/033808

PCT/US02/32904

administered to the patient-animal, mammal or human. Examples of appropriate acid-addition salts include, but are not limited to hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, sulfate, hydrogensulfate, acetate, trifluoroacetate, nitrate, citrate, fumarate, formate, stearate, succinate, maleate, malonate, adipate, glutarate, lactate, propionate, butyrate, 5 tartrate, methanesulfonate, trifluoromethanesulfonate, p-toluenesulfonate, dodecyl sulfate, cyclohexanesulfamate, and the like.

“Biohydrolyzable esters” are esters of compounds of the invention, where the ester does not essentially interfere, preferably does not interfere, with the bioactivity of the compound, or where the ester is readily converted in a host to yield an active 10 compound. Many such esters are known in the art, as described in U.S. Patent No. 4,783,443, issued to Johnston and Mobashery on November 8, 1988. Such esters include lower alkyl esters, lower acyloxy-alkyl esters (such as acetoxymethyl, acetoxylethyl, aminocarbonyloxymethyl, pivaloyloxymethyl and pivaloyloxyethyl esters), lactonyl esters (such as phthalidyl and thiophthalidyl esters), lower alkoxyacyloxyalkyl esters 15 (such as methoxycarbonyloxymethyl, ethoxycarbonyloxyethyl and isopropoxycarbonyloxyethyl esters), alkoxyalkyl esters, choline esters and alkylacylaminoalkyl esters (such as acetamidomethyl esters).

The term “treatment” is used herein to mean that, at a minimum, administration of a compound of the present invention mitigates a disease associated with the abnormal 20 physiological glucose regulation in a subject, preferably in a mammalian subject, more preferably in humans. Thus, the term “treatment” includes: preventing an abnormal physiological glucose regulation mediated disorder in a subject, particularly when the subject is predisposed to acquiring the disease, but has not yet been diagnosed with the disease; inhibiting the abnormal physiological glucose regulation mediated disorder; 25 and/or alleviating or reversing the abnormal physiological glucose regulation mediated disorder. Insofar as the methods of the present invention are directed to preventing the abnormal physiological glucose regulation mediated disorder, it is understood that the term “prevent” does not require that the disease state be completely thwarted (Webster’s ninth collegiate dictionary). Rather, as used herein, the term preventing refers to the ability of the skilled artisan to identify a population that is susceptible to the abnormal 30 physiological glucose regulation mediated disorders, such that administration of the

WO 03/033808

PCT/US02/32904

compounds of the present invention may occur prior to onset of the abnormal physiological glucose regulation mediated disorder. The term does not imply that the disease state be completely avoided. The population that is at risk of an abnormal physiological glucose regulation mediated disorder (e.g. type I and type II diabetes), are those who have a genetic predisposition to diabetes as indicated by family history of the disease. Other risk factors include obesity or diet.

Manufacturing and stability

INGAP Peptide is a 15 amino acid sequence consisting of amino acids number 104-118 contained within the native 175 amino acid INGAP. INGAP Peptide can be synthesized through any of various means known in the art although the preferred means of synthesis is through 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) solid-phase synthesis. The preferred form of INGAP Peptide is the INGAP Peptide in a pharmaceutically acceptable salt form, preferably acetate salt. Formation of salts of peptides is known in the art. Fmoc synthesis is described in U.S. Patent number 4,108,846. Fmoc uses piperidine to cleave the methoxycarbonyl (moc) and trifluoroacetic acid (TFA) to cleave the peptide from the resin. INGAP manufactured according to this process can be readily purified by preparative HPLC chromatography.

INGAP Peptide has the following amino acid sequence:

NH₂-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser-COOH (SEQ ID NO: 3)

The INGAP Peptide has a chemical formula of C₆₄H₁₀₀N₂₀O₂₂, a molecular weight of 1501.6 ± 1 Daltons and a specific rotation of -103.2° in 1% acetic acid.

The structure of INGAP Peptide is confirmed by amino acid analysis in which the INGAP Peptide molecule is hydrolyzed to its constituent amino acids. The amino acids are quantitated and shown to be present in the correct molar ratio based on the molecular structure. The molecular mass of the peptide can be determined utilizing electrospray mass spectrometry and should be in agreement with the calculated, theoretical mass of the molecule (1501.6 ± 1 mass unit).

To confirm that the synthetic molecule is bioactive, a bioassay may be used to

WO 03/033808

PCT/US02/32904

confirm the activity. ARIP cells, a rat pancreatic duct cell line, obtained from ATCC (Manassas, VA) are used in the assay. Cells are plated into a 96-well culture plate at 10,000 cells/well, and cultured for 24 hours in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum. After 24 hours, the medium is replaced
5 with DMEM without serum. Duplicate wells are treated with varying doses (0, 10^{-3} and 10^{-5} g/ml) of INGAP Peptide. After 21 hours, the medium is supplemented with bromodeoxyuridine (BrdU) labeling solution from a BrdU cell proliferation ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals) and cultured for a further 3 hours. At 24 hours the cells are dried at 60°C for 60 minutes, fixed and denatured. They are exposed to BrdU
10 antibody for 90 minutes and developed for 15 minutes, all according to kit instructions. BrdU labeling is quantitated on a Wallac Victor 1420 Multilabel Counter. Results are compared against a standard curve of cells grown on the same culture plate, seeded at densities from 100 to 20,000 cells per well. As shown in Figure 1, when using this assay there is approximately a 1.6-fold increase in cell count compared with controls in cultures
15 treated with 0.1 µg/ml of INGAP Peptide.

Stability of Bulk INGAP Peptide

Stability is determined by comparing various parameters including, but not limited to, degree of purity, total percentage of impurities, percentage of individual impurities (as
20 determined by HPLC or other suitable quantitative method), appearance, and water content of the sample. An HPLC method can be used to determine any increase in the levels of degradation products relative to the level of INGAP Peptide. INGAP Peptide samples (both solution and lyophilized powder) are stored at various temperatures, in the presence or absence of humidity, and in light or dark vials. Degradation during different
25 storage conditions can lead to an increase in impurities and decrease in INGAP Peptide content. It is desirable that the sample preparation is more than 80% pure, preferably more than 90% pure, more preferably more than 95%, and most preferably more than 97% pure.

The INGAP Peptide as a lyophilized powder is stable under various storage
30 conditions. Purity of the INGAP Peptide is maintained under these conditions and degradation products are lower than the acceptable levels. Further storage up to six-months does not cause any noticeable degradation of the INGAP Peptide.

WO 03/033808

PCT/US02/32904

Compositions

Another aspect of this invention is compositions which comprise: (a) a safe and effective amount of a peptide of the present invention; and (b) a pharmaceutically acceptable carrier. Standard pharmaceutical formulation techniques are used, such as those disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa., most recent edition.

A "safe and effective amount" means an amount of the peptide of the invention sufficient to significantly induce a positive modification in the condition to be treated, but low enough to avoid serious side effects (such as toxicity, irritation, or allergic response) in an animal, preferably a mammal, more preferably a human subject, in need thereof, commensurate with a reasonable benefit/risk ratio when used in the manner of this invention. The specific "safe and effective amount" will, obviously, vary with such factors as the particular condition being treated, the physical condition of the subject, the duration of treatment, the nature of concurrent therapy (if any), the specific dosage form to be used, the carrier employed, the solubility of the peptide therein, and the dosage regimen desired for the composition. One skilled in the art may use the following teachings to determine a "safe and effective amount" in accordance with the present invention. Spilker B., *Guide to Clinical Studies and Developing Protocols*, Raven Press Books, Ltd., New York, 1984, pp. 7-13, 54-60; Spilker B., *Guide to Clinical Trials*, Raven Press, Ltd., New York, 1991, pp. 93-101; Craig C., and R. Stitzel, eds., *Modern Pharmacology*, 2d ed., Little, Brown and Co., Boston, 1986, pp. 127-33; T. Speight, ed., *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 3d ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1987, pp. 50-56; R. Tallarida, R. Raffa and P. McGonigle, *Principles in General Pharmacology*, Springer-Verlag, New York, 1988, pp. 18-20.

The peptide of the invention is dissolved or suspended in a pharmaceutically acceptable buffer. The buffer that the peptide is dissolved in can affect the pH, solubility and therefore the bioavailability of the peptide. Choice of buffer varies depending on the peptide composition, route of administration, and extent of solubility of the peptide desired, half-life of the peptide in physiological setting, and pH and buffering capacity of the physiological fluid. The pH of a favored buffer may be closer to pK_a value of the

WO 03/033808

PCT/US02/32904

peptide, or it may be dependent upon the physiological setting where the peptide is to be delivered. Suitable buffers include, but are not limited to, phosphate, acetate, carbonate, bicarbonate, glycine, citrate, imidazole and others. Particularly preferred buffer is an acetate buffer.

5 In addition to the subject peptide, the compositions of the subject invention contain a pharmaceutically acceptable carrier. The term "pharmaceutically-acceptable carrier," as used herein, means one or more compatible solid or liquid filler diluents or encapsulating substances which are suitable for administration to an animal, preferably a mammal, more preferably a human. The term "compatible", as used herein, means that
10 the components of the composition are capable of being commingled with the subject peptide, and with each other, in a manner such that there is no interaction that would substantially reduce the pharmaceutical efficacy of the composition under ordinary use situations. Pharmaceutically-acceptable carriers must, of course, be of sufficiently high purity and sufficiently low toxicity to render them suitable for administration to the
15 animal, preferably a mammal, more preferably a human being treated. The choice of a pharmaceutically acceptable carrier to be used in conjunction with the subject compound is basically determined by the way the peptide is to be administered. If the subject peptide is to be injected, the preferred pharmaceutically acceptable carrier is prepared sterile, with a blood-compatible colloidal suspending agent.

20 In particular, pharmaceutically-acceptable carriers for systemic administration include sugars, starches, cellulose and its derivatives, malt, gelatin, talc, calcium sulfate, vegetable oils, synthetic oils, polyols, alginic acid, phosphate buffer solutions, emulsifiers, isotonic saline, and pyrogen-free water. Preferred carriers for parenteral administration include propylene glycol, ethyl oleate, pyrrolidone, ethanol,
25 and sesame oil. Preferably, the pharmaceutically acceptable carrier, in compositions for parenteral administration, comprises at least about 90% by weight of the total composition.

The compositions of this invention are preferably provided in unit dosage form. As used herein, a "unit dosage form" is a composition of this invention
30 containing an amount of INGAP Peptide that is suitable for administration to an animal, preferably a mammal, more preferably a human subject, in a single dose,

WO 03/033808

PCT/US02/32904

according to good medical practice. These compositions preferably contain from about 0.1 mg (milligrams) to about 300 mg, and more preferably from about 5 mg to about 150 mg of INGAP Peptide. The frequency of treatment with the composition of the invention may be changed to achieve the desired bolus as well as to avoid side effects. Thus, no limiting examples of treatment schedules include daily, twice daily, three times daily, weekly, biweekly, monthly, and combinations thereof. Alternatively, the composition of the invention may also be administered as a continuous infusion.

The compositions of this invention may be in any of a variety of forms, suitable, for example, for oral, topical, nasal, or parenteral administration. Depending upon the particular route of administration desired a variety of pharmaceutically acceptable carriers well known in the art may be used. These include solid or liquid fillers, diluents, hydrotropes, surface-active agents, and encapsulating substances. Optional pharmaceutically active materials may be included, which do not substantially interfere with the activity of the INGAP Peptide. The amount of carrier employed in conjunction with the INGAP Peptide is sufficient to provide a practical quantity of material for administration per unit dose of the INGAP Peptide. Techniques and compositions for making dosage forms useful in the methods of this invention are described in the following references: *Modern* *Pharmaceutics*, Chapters 9 and 10 (Banker & Rhodes, editors, 1979); Lieberman et al., *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* (1981); and Ansel, *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms* 2d Edition (1976).

INGAP Peptide Formulation

A preferred INGAP Peptide formulation is a solution for injection using sterile water and sodium chloride as needed to adjust tonicity and produced at four different concentrations: 0, 7.5, 30, and 120 mg/0.5 ml/vial. Hydrochloric acid and sodium hydroxide may be used as necessary to adjust the pH to the preferred level. Additional concentrations may be prepared by diluting the higher concentration stocks using isotonic saline. Dilution does not affect the biological potency of INGAP Peptide.

Thus prepared INGAP Peptide formulation is stable within the pH range of 4 to 6 when stored at 5°C and placed in either dark or light containers. However, some

WO 03/033808

PCT/US02/32904

degradation is observed when the composition is stored at 25°C. The degradation is more evident for composition with pH of 6 than with pH of 4.5. It appears that INGAP Peptide is more stable when stored below 8°C and below pH of 6.

5 EXAMPLE 1 INGAP Peptide Solution for Injection

A solution of 120 mg of INGAP Peptide is prepared with the following specifications:

Table 1

Parameter	Specifications
Appearance	Clear colorless solution
Assay	Each vial contains 90.0 % to 110.0% of INGAP Peptide
Impurities	Each Impurity: 1.0% Total Impurities: 3.0%
pH	4.0 to 5.0
Bacterial Endotoxins	NMT 2.92 EU/mg
Sterility	Complies with USP

10

EXAMPLE 2 Administration of INGAP Peptide to Normal Hamsters.

INGAP Peptide was studied for its effects on islet formation in normal hamsters. INGAP Peptide 5 mg/kg (25 mg/m²) was given IP daily for 4 weeks and β -cell mass was assessed at 10 days and at 30 days. INGAP Peptide treatment resulted in a significant increase in the number of islets compared with placebo-treated animals (Figure 2). The islet neogenesis effect was manifested by production of more insulin and an increase in the number of islets in the pancreata. Newly formed β -cells appeared in the wall of, and budding from, pancreatic ducts. These insulin-positive cells resulted from ductal epithelial cell differentiation and islet cell growth, and their appearance was proportional to the dose and duration of treatment with INGAP Peptide. Over longer periods of treatment, these cells migrated away from the duct and formed islets in the parenchyma of the pancreas. After 10 consecutive days of INGAP Peptide administration, there was a 30% increase in islet number, and by 30 days there was a doubling of the number of islets in the tissues, consistent with the prior observations using ilotropin, rINGAP, and cellophane wrapping in animal models.

25

WO 03/033808

PCT/US02/32904

EXAMPLE 3 In Vivo Efficacy Study

C57BL/6J mice were made diabetic with STZ (35 mg/kg/day x 5 days) and divided into INGAP Peptide-treated (250 µg twice daily) and saline control groups of 4 animals each. All four of the INGAP Peptide-treated animals had their blood glucose concentrations restored to normal, whereas all of the saline-treated mice remained hyperglycemic (Figure 3). After 39 days, dosing was stopped and further observation showed durability of the effect to 48 days, when the study was terminated. Histopathologic evaluation of INGAP Peptide-treated animals showed both the presence of normal-appearing islets and areas of new islet formation, including a normal complement and distribution of insulin and glucagon secreting cells (Figure 4, and 6). The appearance of glucagon producing cells is noteworthy since glucagon plays a major role in the defense against hypoglycemia. This feature of the INGAP Peptide induced islet neogenesis could help to reverse the impaired counter regulatory control of hypoglycemia associated with the overzealous treatment of diabetes. Hypoglycemia was not observed in any of the INGAP Peptide-treated animals. In saline-treated control animals, no new islet formation was observed. INGAP Peptide administration induced transdifferentiation of ductal cells as evidenced by cells expressing the transcription factor PDX-1 (Figure 5). Islets in the saline-treated STZ-diabetic animals showed heavy inflammatory cell infiltrate and were necrotic. In INGAP Peptide-treated animals, inflammation was markedly reduced and the islets appeared healthy (Figure 6).

Figure 4 shows the immunocytochemical characteristics of the pancreas of streptozotocin-treated C57BL/6J mice further treated with INGAP Peptide. The upper left panel shows an islet still associated with a segment of duct epithelium stained with anti-insulin antibody, which demonstrates a normal presence and distribution of insulin protein. The lower left panel shows the same islet stained with a mixture of anti-glucagon and anti-somatostatin antibodies also demonstrating a normal distribution of these islet cell proteins in the islet mantle region. The upper right panel shows a newly formed islet budding off a duct stained with H & E stain. The lower right panel shows an insulin-positive cell in the wall of the duct.

Example 4 31-Day Mouse Study (repeat dosing)

WO 03/033808

PCT/US02/32904

A repeat-dose toxicology study was conducted in mice with 31 days of daily injection of INGAP Peptide at 0, 2, 20, and 100 mg/kg/day. In this study, four treatment groups of 10 males and 10 females each were allocated, as were two groups of recovery animals (5 males and 5 females). Blood was collected at termination and necropsies were performed for gross and microscopic observations. Clinical pathology and serum levels were evaluated in approximately half the animals in each group. Selected organs (brain, adrenal, heart, kidney, liver, lung, pancreas, and spleen) were weighed and relative organ weights were calculated. A section of the pancreas was removed and frozen in liquid nitrogen for evaluation for insulin content and sections of pancreas tissue were submitted for independent microscopic examination. Recovery animals were terminated 28 days after cessation of dosing. Various parameters for further study as well as potentially drug-related abnormal findings were evaluated to determine the reproducibility and potential clinical significance.

Administration of INGAP Peptide by IM injection for 31 consecutive days produced no dose-related adverse effects when evaluated at cessation of dosing and through 28 days post-treatment. Injection site irritation was observed in males and females with increased frequency at the highest dose, but was no longer observed in recovery animals at that same dose, showing reversibility of irritation. Extramedullary hematopoiesis in the spleen was seen in one male animal at the high dose in this 31-day study. No microscopic evidence of inflammatory cell infiltration, edema, necrosis or atrophy was observed. The salient observation was the increase in the number of small islets, both duct-associated, and in amongst the acinar tissue. Serum levels of INGAP Peptide at 2 hours after dosing for 31 consecutive days were below the limits of quantitation. Pharmacological activity as measured by an increase in insulin-positive tissue area was observed in these animals (Fig. 7). The results suggest that the no adverse effect level (NOAEL) greater than 100 mg/kg in CD-1 mice with 31-day dosing.

Example 5 34-Day Dog Study (repeat dosing)

A repeat-dose toxicology study was conducted in beagle dogs for 34 days with daily IM injection of INGAP Peptide at 0, 0.5, 1.5, and 10 mg/kg/day. Pancreatic tissue was obtained for quantitation of β -cell mass by immunohistochemistry from animals sacrificed on Day 34, at termination of treatment, and from recovery animals sacrificed

WO 03/033808

PCT/US02/32904

25 days after termination of treatment. Pancreatic β -cell mass was increased following INGAP Peptide administration (see Figure 8). These results indicate that IM injections of INGAP Peptide in the range of doses studied achieve a biologically important response in the normal beagle dog. Furthermore, an in-depth review of the pancreatic tissue sections

5 showed no changes such as edema, inflammatory cell infiltration, necrosis or atrophy.

Example 6 Human Clinical Studies

Doses are often based on the results of efficacy and safety studies in animals.

Two doses of INGAP Peptide, 7.5 mg (0.125 mg/kg, or 4.625 mg/m² for a 60 kg patient) and 120 mg (1.6 mg/kg, or 74 mg/m² for a 60 kg patient) are exemplified in the treatment

10 of type I or type II diabetes mellitus. The following parameters are evaluated to determine efficacy of INGAP Peptide treatment.

1. A reduction of fasting glucose levels by > 35 mg/dl while the total insulin dose is maintained.
- 15 2. A reduction of insulin dose by 25% with fasting glucose levels maintained in the normal range as determined by the American Diabetes Association (ADA) criteria.
3. An increase in fasting C-peptide > 1 ng/ml is obtained. An increase in C-peptide of > 2 ng/ml in response to Sustacal[®] (Boost[®]) is obtained.

20 Each patient is randomized to receive one single intramuscular injection of INGAP Peptide. After evaluating efficacy and safety data, patients could be given further INGAP Peptide injections as deemed appropriate by the physician.

The following table summarizes a partial list of assessments that are made on patients receiving the INGAP Peptide or placebo treatment.

25 **Table 2 Schedule of Assessments**

Procedure	Screen	Baseline	Treatment Period Days 1 - 34						Follow-Up Days 35 - 63 $\pm$ 2			
			1	7	14	21	28	34	42	49	56	63
Visit Day												
Physical examination	X	X						X				X
Vital signs	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Clinical laboratory tests	X	X		X	X	X	X	X				X
Plasma PK for INGAP Peptide		X	X	X	X	X	X	X	X			

Stimulated C-peptide

WO 03/033808

PCT/US02/32904

Stimulated C-peptide tests are performed in the morning after an overnight fasting period of at least 10 hours. The tests are performed only if the fasting glucose is between 80 and 250 mg/dl. Patients can take their diabetes medications the evening before, but should not take them the morning of the test until the test is completed. Blood samples
5 for the determination of C-peptide are drawn immediately before Boost® ingestion, and at 0.5, 2, and 4 hours post-ingestion. Boost® is administered through ingestion. Patients are considered insulin deficient if their fasting C-peptide is < 1.0 ng/ml and their maximum stimulated C-peptide value is < 2.0 ng/ml.

As a result of the treatment, patients receiving the INGAP Peptide show improved
10 sugar tolerance, a reduction in fasting glucose level, a reduction in insulin dose required, an increase in fasting C-peptide level, and an increase in C-peptide level in response to Boost®. Patients receiving placebo treatment show no such improvements.

Except as otherwise noted, all amounts including quantities, percentages, portions, and proportions, are understood to be modified by the word "about", and amounts are not
15 intended to indicate significant digits.

Except as otherwise noted, the articles "a", "an", and "the" mean "one or more".

While particular embodiments of the present invention have been illustrated and described, it would be obvious to those skilled in the art that various other changes and modifications can be made without departing from the spirit and scope of the invention.

20 It is therefore intended to cover in the appended claims all such changes and modifications that are within the scope of this invention.

WO 03/033808

PCT/US02/32904

What is claimed is:

1. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide having at least fifteen consecutive amino acids of a naturally occurring mammalian islet neogenesis associated protein, wherein the amino acid sequence is from SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 3 and fragments thereof, with a pH of from about 4 to about 6.
2. The pharmaceutical composition according to Claim 1, wherein the composition is a lyophilized powder or a solution.
3. The pharmaceutical composition according to any of the preceding claims, wherein the composition has a pH of from about 4 to about 5.
4. The pharmaceutical composition according to any of the preceding claims, wherein the polypeptide is in the form selected from the group consisting of pharmaceutically acceptable esters, salts, and mixtures thereof.
5. The pharmaceutical composition according to any of the preceding claims, comprising from about 0.1 mg to about 300 mg of the polypeptide.
6. The use of a pharmaceutical composition according to any of the preceding claims in the manufacture of a medicament for treating diabetes in a human or other mammal.
7. The use of a pharmaceutical composition according to any of the preceding claims in the manufacture of a medicament for regenerating islets of Langerhans, pancreatic beta cells, or establishing normal physiological glucose regulation in a mammal.
8. The use of a pharmaceutical composition according to any of the preceding claims, wherein the administration is at a frequency selected from the group consisting of daily, twice daily, three times daily, weekly, biweekly, monthly, continuous infusion and combinations thereof.
9. A kit for use according to any of the preceding claims, comprising:
 - a. the pharmaceutical composition of Claim 1; and
 - b. usage instruction.

WO 03/033808

PCT/US02/32904

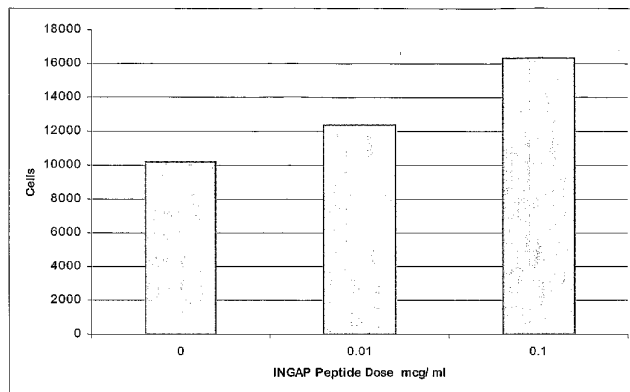


Figure 1 INGAP peptide treated ARIP cells (a rat pancreatic duct cell line) showing a dose dependant increase in cell number.

WO 03/033808

PCT/US02/32904

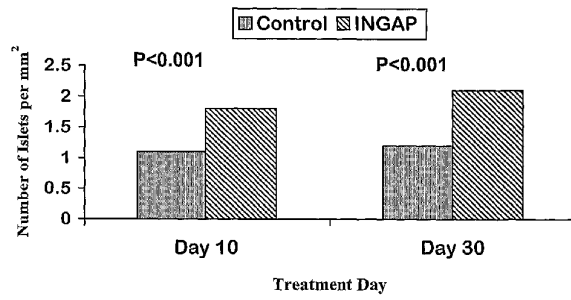


Figure 2. Increase in pancreatic endocrine cell mass with INGAP Peptide. Normal Syrian golden Hamsters were treated with saline (control) or INGAP Peptide IP for either 10 days or 30 days. The number of islets/mm² was determined with a computer-aided morphometric system employing Image-pro Plus software.

WO 03/033808

PCT/US02/32904

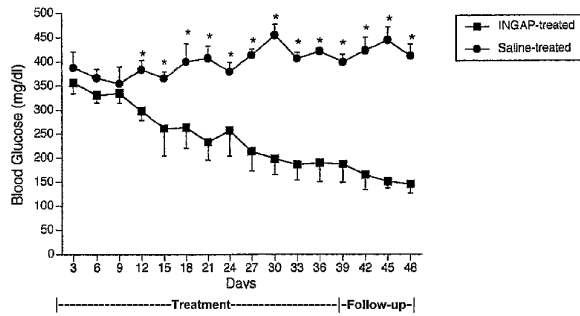


Figure 3. Time course of blood glucose following injection of INGAP Peptide 250 µg/kg twice daily or saline for 39 days to C57BL/6J mice rendered diabetic using a regimen of multiple injections of low-dose streptozotocin. Blood glucose levels were measured every three days. Animals were followed for an additional nine days after discontinuation of INGAP Peptide injections and demonstrated the persistence of the treatment effect. * $p < 0.025$ compared with saline-treated animals.

WO 03/033808

PCT/US02/32904

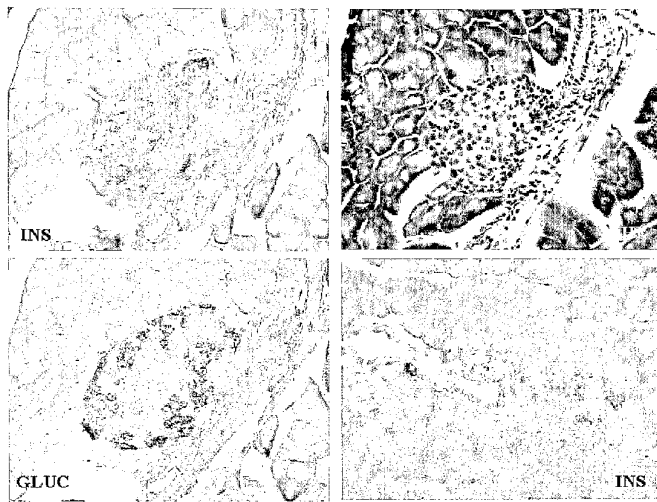


Figure 4. Immunocytochemical characteristics of the pancreas of streptozotocin-diabetic C57BL/6J mice treated with INGAP Peptide. The upper left panel shows an islet still associated with a segment of duct epithelium stained with anti-insulin antibody, which demonstrates a normal presence and distribution of insulin protein. The lower left panel shows the same islet stained with a mixture of anti-glucagon and anti-somatostatin antibodies also demonstrating a normal distribution of these islet cell proteins in the islet mantle region. The upper right panel shows a newly formed islet budding off a duct stained with H & E stain. The lower right panel shows an insulin-positive cell in the wall of the duct.

WO 03/033808

PCT/US02/32904

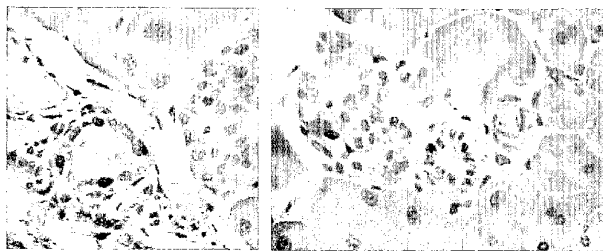


Figure 5. INGAP Peptide stimulates PDX-1 expression in pancreatic ducts of C57B/6J mice. Panel on the right is a second area of PDX-1 immunoreactivity in association with islet cell neogenesis. Darkly stained material is the appearance of PDX-1 of the cells in the duct wall.

WO 03/033808

PCT/US02/32904

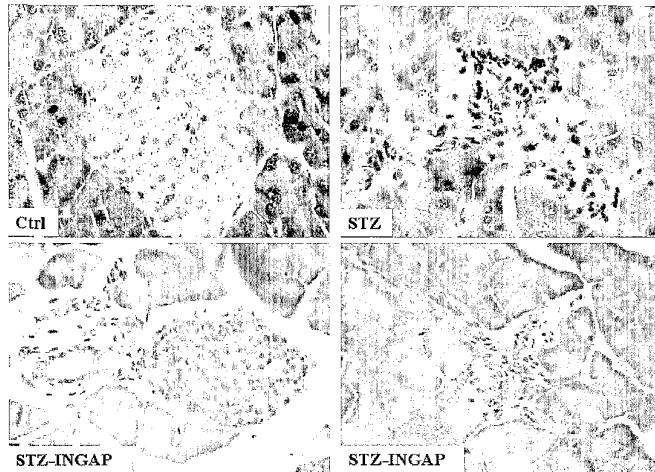


Figure 6 Histological characteristics of the pancreas of streptozotocin-treated C57BL/6J mice. The lower right panel (STZ-INGAP) shows the pancreas of an INGAP Peptide-treated animal with an area of islet cell neogenesis, observed as cells budding from an adjacent intralobular ductule. The lower left panel (STZ-INGAP) is a normal appearing islet in the pancreas of an animal treated with INGAP Peptide. The upper right panel (STZ) shows the pancreas of a saline-treated animal showing a necrotic islet with inflammatory cell infiltration characteristic of insulinitis. The upper left panel (Ctrl) shows the pancreas of a normal aged-matched control mouse showing the histological appearance of a normal islet for comparison. Note that INGAP restores islet histology towards normal.

WO 03/033808

PCT/US02/32904

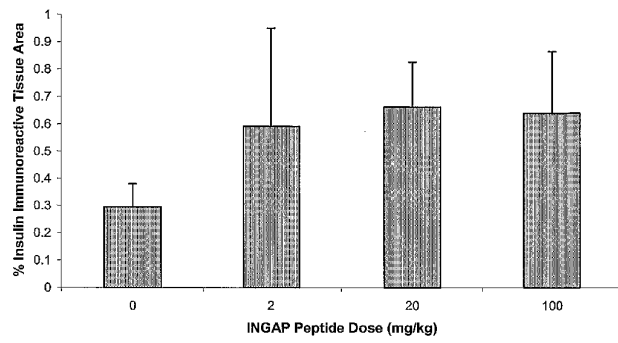


Figure 7 Immunopositive tissue area in normal mouse following treatment with INGAP Peptide for 31 days. Data are mean $\pm$ SEM. The percentage of cross-sectional area stained for insulin was determined with an Olympus microscope (150 X) and image analysis software (Image Pro Plus Version 4.0, Media Cybernetics).

WO 03/033808

PCT/US02/32904

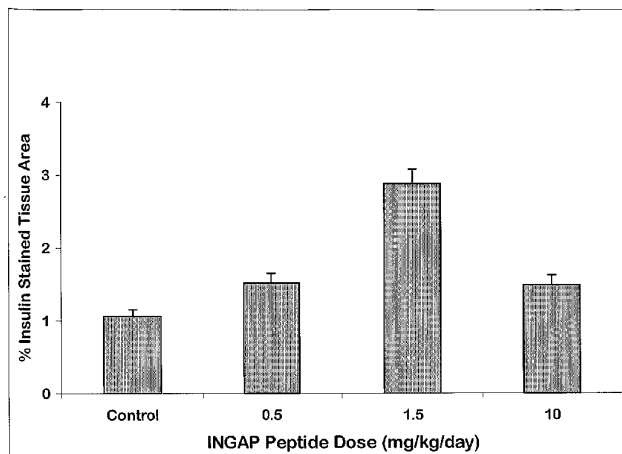


Figure 8. Effects of daily injection of INGAP Peptide to dogs for 34 days on the area of cells in the pancreas that become positive for insulin by immunohistochemical staining. Data are mean $\pm$ SEM. The percentage of cross-sectional area stained for insulin was determined with an Olympus microscope (150 X) and image analysis software (Image Pro Plus Version 4.0, Media Cybernetics).

WO 03/033808

PCT/US02/32904

SEQUENCE LISTING

<110> Vinik, Aaron I
 Rosenberg, Lawrence
 Pittenger, Gary
 Taylor-Fishwick, David
 Salem, Michael
 Mohrland, Scott

<120> Composition and Method for Treating Diabetes

<130> 9016#L\$

<140> Not Yet Assigned
 <141> 2002-09-24

<150> US 60/329,330
 <151> 2001-10-16

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Met Leu Pro Met Thr Leu Cys Arg Met Ser Trp Met Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Cys Leu Met Phe Leu Ser Trp Val Glu Gly Glu Glu Ser Gln Lys Lys
 20 25 30

Leu Pro Ser Ser Arg Ile Thr Cys Pro Gln Gly Ser Val Ala Tyr Gly
 35 40 45

Ser Tyr Cys Tyr Ser Leu Ile Leu Ile Pro Gln Thr Trp Ser Asn Ala
 50 55 60

Glu Leu Ser Cys Gln Met His Phe Ser Gly His Leu Ala Phe Leu Leu
 65 70 75 80

WO 03/033808

PCT/US02/32904

Ser Thr Gly Glu Ile Thr Phe Val Ser Ser Leu Val Lys Asn Ser Leu
 85 90 95

Thr Ala Tyr Gln Tyr Ile Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly
 100 105 110

Thr Leu Pro Asn Gly Ser Gly Trp Lys Trp Ser Ser Ser Asn Val Leu
 115 120 125

Thr Phe Tyr Asn Trp Glu Arg Asn Pro Ser Ile Ala Ala Asp Arg Gly
 130 135 140

Tyr Cys Ala Val Leu Ser Gln Lys Ser Gly Phe Gln Lys Trp Arg Asp
 145 150 155 160

Phe Asn Cys Glu Asn Glu Leu Pro Tyr Ile Cys Lys Phe Lys Val
 165 170 175

<210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

Trp Lys Trp Ser
 20

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 April 2003 (24.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/033808 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 38/17
- (21) International Application Number: PCT/US02/32904
- (22) International Filing Date: 15 October 2002 (15.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/529,530 16 October 2001 (16.10.2001) US
- (71) Applicant: GMP ENDOTHERAPEUTICS, INC. [US/US]; One East Broward Boulevard Suite 1701, Fort Lauderdale, FL 33301 (US).
- (72) Inventors: VINIK, Aaron, I.; 40 Radar Street, #603, Norfolk, VA 23510 (US). ROSENBERG, Lawrence; 16507 Fern Road, Montreal, Quebec H4V1H4 (CA). PITTENGER, Gary; 3701 Prince Andrew Lane, Virginia Beach, VA 23452 (US). TAYLOR-FISHWICK, David; 6117 Rolfe Avenue, Norfolk, VA 23508 (US). SALEM, Michael; 2100 North Ocean Boulevard, Apt. 904, Ft. Lauderdale, FL 33305 (US). MOHRLAND, Scott; 10833 Blackhawk Street, Plantation, FL 33324 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DL, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE (utility model), EG, ES, FI (utility model), IL, IG, IG, GH, GM, GR, GU, HT, ID, IE, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 18 September 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/033808 A3

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR TREATING DIABETES

(57) Abstract: The present invention comprises dosing regimens and formulations of islet cell neogenesis associated protein (IN-GAP) and INGAP Peptide. The formulation disclosed herein is shown have acceptable stability as a pharmaceutical composition. Further, the formulation is able to regenerate functional islets

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/32904
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAFAELOFF RONIT ET AL: "Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, vol. 99, no. 9, 1997, pages 2100-2109, XP002173530 ISSN: 0021-9738 page 2104, right-hand column, paragraph 3 -page 2105, left-hand column, paragraph 1 page 2106, right-hand column, paragraph 1 page 2107, left-hand column, paragraph 1 --- -/--	1-9
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 June 2003		Date of mailing of the international search report 25/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Charles, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 02/32904

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	TAM J ET AL: "Islet-Neogenesis-Associated Protein Enhances Neurite Outgrowth from DRG Neurons" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 291, 1 March 2002 (2002-03-01), pages 649-654, XP002226504 ISSN: 0006-291X page 649, right-hand column, paragraph 2 page 653, left-hand column, paragraph 1 page 653, right-hand column, paragraph 1 -----	1-6, 8, 9
X, P	US 2002/127624 A1 (TAYLOR-FISHWICK DAVID A ET AL) 12 September 2002 (2002-09-12) page 1, line 8 - line 9; claims 24, 31, 38 page 2, right-hand column, paragraph 1 page 3, left-hand column, paragraph 5 - paragraph 6 -----	1-5
A	WO 96 26215 A (UNIV MCGILL ;EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL (US)) 29 August 1996 (1996-08-29) cited in the application page 6, paragraph 5; claims 1, 41-43, 80, 92 page 14, paragraph 1 -----	1, 6, 7, 9

International Application No. PCT/US 02 2904

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-9 (partially)

Present claims 1-9 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a polypeptide having at least fifteen consecutive amino acids of a naturally occurring mammalian islet neogenesis associated protein (INGAP).

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compound mentioned in the description at pages 2 (lines 5-8), and 5 (lines 8-20). Reference is made to sequence # 3.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 02/32904**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-9 (partially)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 02/32904

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002127624 A1	12-09-2002	WO 02056028 A2	18-07-2002
WO 9626215 A	29-08-1996	US 5834590 A	10-11-1998
		AU 708499 B2	05-08-1999
		AU 4914996 A	11-09-1996
		CA 2213610 A1	29-08-1996
		EP 0815129 A1	07-01-1998
		JP 11500907 T	26-01-1999
		WO 9626215 A1	29-08-1996
		US 5840531 A	24-11-1998

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ローレンス ローゼンバーグ
カナダ エイチ４ブイ１イー４ ケベック モントリオール フェルン ロード アイ６５０７

(72)発明者 ゲーリー ピッテンガー
アメリカ合衆国 ２３４５２ バージニア州 バージニア ビーチ プリンス アンドリュー レ
ーン ３７０１

(72)発明者 デビッド テイラーフィッシュウィック
アメリカ合衆国 ２３５０８ バージニア州 ノーフォーク ロルフエ アベニュー ６１１７

(72)発明者 マイケル サーレム
アメリカ合衆国 ３３３０５ フロリダ州 エフティ． ローダーデール ノース オーシャン
ブルバード ２１００ アpartment ９０４

(72)発明者 スコット モーランド
アメリカ合衆国 ３３３２４ フロリダ州 プランテーション ブラックホーク ストリート １
０８３３

Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA21 BA23 CA18 CA32 DC50 NA14
ZC35