

(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2015-533821

(P2015-533821A)

(43) 公表日 平成27年11月26日(2015.11.26)

| (51) Int.Cl.                        | F I            | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|----------------|-------------|
| <b>C07K 14/47 (2006.01)</b>         | C07K 14/47 ZNA | 4B024       |
| <b>A61K 38/00 (2006.01)</b>         | A61K 37/02     | 4B064       |
| <b>A61K 9/127 (2006.01)</b>         | A61K 9/127     | 4B065       |
| <b>A61K 45/00 (2006.01)</b>         | A61K 45/00     | 4C076       |
| <b>A61K 39/395 (2006.01)</b>        | A61K 39/395 N  | 4C084       |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く |                |             |

(21) 出願番号 特願2015-534660 (P2015-534660)  
 (86) (22) 出願日 平成25年9月26日 (2013. 9. 26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年5月14日 (2015. 5. 14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/061947  
 (87) 国際公開番号 W02014/052611  
 (87) 国際公開日 平成26年4月3日 (2014. 4. 3)  
 (31) 優先権主張番号 13/662, 253  
 (32) 優先日 平成24年10月26日 (2012. 10. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 13/662, 209  
 (32) 優先日 平成24年10月26日 (2012. 10. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 13/662, 245  
 (32) 優先日 平成24年10月26日 (2012. 10. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515083804  
 クラレッサ レヴェタン  
 Claresa LEVETAN  
 米国, ペンシルバニア州 19010, ブ  
 リン マー, ヒッコリー レーン 10  
 3  
 103 Hickory Lane, Br  
 yn Mawr, PA 19010 US  
 A  
 (74) 代理人 100169904  
 弁理士 村井 康司  
 (74) 代理人 100117422  
 弁理士 堀川 かおり

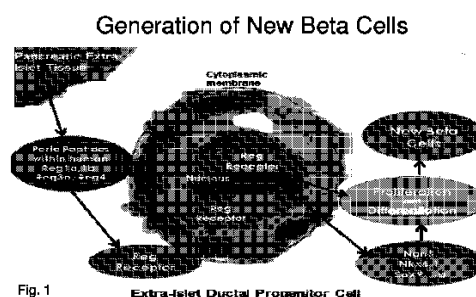
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新たな膵臓ベータ細胞の生成

## (57) 【要約】

本発明は、新たなおよび既存の1型および2型糖尿病、糖尿病前症、成人潜在性自己免疫糖尿病、ならびにインスリン欠乏症、ベータ細胞欠乏症、インスリン抵抗性、および糖代謝傷害の疾患の処置のための新規な療法に関する。特に、本発明は、ヒト膵臓島外組織の表面上のヒトReg受容体を通して作用する、ベータ細胞生成のためのシグナル伝達ペプチドとして、ヒトReg1a、Reg1b、Reg3a、およびReg4内の共通のペプチドを同定する。本発明は、1型糖尿病、2型糖尿病、糖尿病前症、およびベータ細胞欠乏症の他の状態を含む前記状態を有する患者に直接投与されてもよいペプチド模倣薬および刺激抗体が新たなベータ細胞の生成のために開発された、Reg受容体の特定の結合領域を同定し、1型糖尿病および成人潜在性自己免疫糖尿病において使用するために生成された新たなベータ細胞を保護するための特定の的方法論を提供する。本発明はまた、本明細書において記載される本発明を利用するベータ細胞のエキスピボにおける生成および送達をも提供する。

## Generation of New Beta Cells



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

Regenerating islet - derived (Reg) タンパク質のアミノ酸配列の部分配列であるアミノ酸配列を含む単離ペプチドであって、Reg 受容体結合活性を有し、配列番号 11 の部分配列でも、配列番号 12 の部分配列でもないアミノ酸配列からなる単離ペプチド。

**【請求項 2】**

Regenerating islet - derived (Reg) タンパク質のアミノ酸配列の部分配列であるアミノ酸配列が、ヒト、チンパンジー、雌ウシ、ヒツジ、またはマウス Reg タンパク質のアミノ酸配列の部分配列である、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

10

**【請求項 3】**

Regenerating islet - derived (Reg) タンパク質のアミノ酸配列の部分配列であるアミノ酸配列が、ヒト Reg タンパク質のアミノ酸配列の部分配列である、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

**【請求項 4】**

ヒト Reg タンパク質のアミノ酸配列の部分配列であるアミノ酸配列が、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、または配列番号 10 の部分配列である、請求項 3 に記載の単離ペプチド。

**【請求項 5】**

7 ~ 9 アミノ酸長である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の単離ペプチド。

20

**【請求項 6】**

Regenerating islet - derived (Reg) タンパク質のアミノ酸配列の部分配列であるアミノ酸配列が、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 70 % 同一である、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

**【請求項 7】**

Regenerating islet - derived (Reg) タンパク質のアミノ酸配列の部分配列であるアミノ酸配列が、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 75 % 同一である、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

30

**【請求項 8】**

Regenerating islet - derived (Reg) タンパク質のアミノ酸配列の部分配列であるアミノ酸配列が、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 80 % 同一である、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

**【請求項 9】**

Regenerating islet - derived (Reg) タンパク質のアミノ酸配列の部分配列であるアミノ酸配列が、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 85 % 同一である、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

40

**【請求項 10】**

Regenerating islet - derived (Reg) タンパク質のアミノ酸配列の部分配列であるアミノ酸配列が、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 である、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

**【請求項 11】**

Regenerating islet - derived (Reg) タンパク質のアミノ酸配列の部分配列であるアミノ酸配列が、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 の部分配列である、請求項 1 に記載の単離ペプチド。

**【請求項 12】**

50

配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 70% 同一なアミノ酸配列を含み、Reg 受容体結合活性を有する、単離ペプチド。

【請求項 13】

配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 75% 同一なアミノ酸配列を含み、Reg 受容体結合活性を有する、単離ペプチド。

【請求項 14】

配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 80% 同一なアミノ酸配列を含み、Reg 受容体結合活性を有する、単離ペプチド。

【請求項 15】

配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 85% 同一なアミノ酸配列を含み、Reg 受容体結合活性を有する、単離ペプチド。

【請求項 16】

配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 の部分配列であるアミノ酸配列を含み、Reg 受容体結合活性を有する、単離ペプチド。

【請求項 17】

少なくとも 2 つのペプチドを含み、それぞれのペプチドが、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 70% 同一なアミノ酸配列を含む、単離融合ポリペプチド。

【請求項 18】

前記ペプチドが、ペプチド模倣薬である、請求項 1 または 12 に記載の単離ペプチド。

【請求項 19】

前記ペプチドが、安定性を増加させる、溶解性を増加させる、プロテアーゼ抵抗性を増加させる、免疫原性を低下させる、Tmax を増加させる、または生物学的利用率を増加させるために修飾された、請求項 1 または 12 に記載の単離ペプチド。

【請求項 20】

前記ペプチドが、c-末端アセチル基および n-末端アミド基により遮断される、請求項 19 に記載の単離ペプチド。

【請求項 21】

前記ペプチドが、n-末端に追加されたシステイン残基を含む、請求項 19 に記載の単離ペプチド。

【請求項 22】

前記ペプチドが、環化によって修飾される、請求項 19 に記載の単離ペプチド。

【請求項 23】

前記ペプチドが、ペグ化によって修飾される、請求項 19 の単離ペプチド。

【請求項 24】

請求項 19 に記載の単離ペプチドを含む医薬製剤。

【請求項 25】

前記製剤が、経口、静脈内、または皮下送達のために最適化される、請求項 24 に記載の医薬製剤。

【請求項 26】

単位用量形態である請求項 24 に記載の医薬製剤。

【請求項 27】

1 つまたは複数の他の医薬品有効成分 (API) をさらに含む、請求項 24 に記載の医薬製剤。

【請求項 28】

前記 API が、可溶性リボソーム調製物中の作用物質である、請求項 27 に記載の医薬製剤。

【請求項 29】

前記ペプチドが皮下に、筋肉内に、静脈内に、動脈内に、または経口的に投与されるのを前記リボソーム調製物が可能にする、請求項 28 に記載の医薬製剤。

10

20

30

40

50

- 【請求項 30】  
前記製剤が、全身投与のために最適化される、請求項 28 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 31】  
前記製剤が、標的投与のための標的作用物質を含む、請求項 28 に記載の医薬製剤。
- 【請求項 32】  
請求項 1 または 12 に記載のペプチドの治療有効用量を含むキット。
- 【請求項 33】  
請求項 1 または 12 に記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離ポリヌクレオチド。 10
- 【請求項 34】  
請求項 33 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- 【請求項 35】  
請求項 33 に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。
- 【請求項 36】  
前記宿主細胞が、幹細胞である、請求項 35 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 37】  
ヒト Reg 受容体（配列番号 6）のペプチド配列に特異的に結合する、単離抗体。
- 【請求項 38】  
前記抗体が、配列番号 9 のアミノ酸配列からなるペプチド配列に特異的に結合する、請求項 37 に記載の抗体。 20
- 【請求項 39】  
前記抗体が、配列番号 9 のアミノ酸配列内に含有されるペプチド配列に特異的に結合する、請求項 38 に記載の抗体。
- 【請求項 40】  
前記抗体が、ベータ細胞産生を刺激する、請求項 37 に記載の抗体。
- 【請求項 41】  
前記抗体が、ポリクローナルである、請求項 37 に記載の抗体。
- 【請求項 42】  
前記抗体が、モノクローナルである、請求項 37 に記載の抗体。
- 【請求項 43】 30  
前記抗体が、ヒトである、請求項 37 に記載の抗体。
- 【請求項 44】  
前記抗体が、ヒト化である、請求項 37 に記載の抗体。
- 【請求項 45】  
前記抗体が、ベータ細胞産生を刺激する、請求項 38 に記載の抗体。
- 【請求項 46】  
前記抗体が、ポリクローナルである、請求項 2 に記載の抗体。
- 【請求項 47】  
前記抗体が、モノクローナルである、請求項 38 に記載の抗体。
- 【請求項 48】 40  
前記抗体が、ヒトである、請求項 38 に記載の抗体。
- 【請求項 49】  
前記抗体が、ヒト化である、請求項 38 に記載の抗体。
- 【請求項 50】  
前記抗体が、ベータ細胞産生を刺激する、請求項 39 に記載の抗体。
- 【請求項 51】  
前記抗体が、ポリクローナルである、請求項 39 に記載の抗体。
- 【請求項 52】  
前記抗体が、モノクローナルである、請求項 39 に記載の抗体。
- 【請求項 53】 50

前記抗体が、ヒトである、請求項 39 に記載の抗体。

【請求項 54】

前記抗体が、ヒト化である、請求項 39 に記載の抗体。

【請求項 55】

Reg 受容体に対する抗体の産生のための抗原をスクリーニングするための方法であって、

a. 推定上の Reg 受容体の N - 末端部分 ( 配列番号 13 ) 内に含有されるアミノ酸配列を含むペプチドを含むスクリーニング抗原およびアジュバントをウサギに注射するステップ、

b. 前記ウサギから血清サンプルを得るステップ、ならびに

c. 抗原に対する応答を測定するために ELISA 力価アッセイを通して前記サンプル中の抗体を測定するステップを含む、方法。

【請求項 56】

前記ペプチドが、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

前記ペプチドが、配列番号 9 のアミノ酸配列内に含有されるアミノ酸配列を含む、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 58】

請求項 37 に記載の抗体を含むキット。

【請求項 59】

請求項 38 に記載の抗体を含むキット。

【請求項 60】

請求項 39 に記載の抗体を含むキット。

【請求項 61】

新たに発症した 1 型および 2 型糖尿病、すでに存在している 1 型および 2 型糖尿病、成人潜在性自己免疫糖尿病 ( LADA )、グルタミン酸デカルボキシラーゼ - 65 自己免疫、糖尿病前症、高血糖症、グルコース不耐性、ベータ細胞機能障害または欠乏症、インスリン抵抗性、肥満、多嚢胞性卵巣症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、高脂血症、ならびに高トリグリセリド血症から選択されるグルコースホメオスタシス傷害に関連するまたはその危険因子となる状態を処置するための方法であって、

Reg 受容体結合活性を有する作用物質の治療有効量を対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 62】

前記作用物質が、ペプチドである、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記作用物質が、少なくとも 2 つのペプチドを含む融合ポリペプチドである、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 64】

前記作用物質が、刺激性抗体である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 65】

前記作用物質が、小分子である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 66】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 70 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 67】

前記融合タンパク質のそれぞれのペプチドが、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 70 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 68】

前記状態が、自己免疫に関連し、免疫修飾物質が、Reg 受容体結合活性を有する作用

10

20

30

40

50

物質の治療有効量の投与の前におよび／またはそれと並行して投与される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記免疫修飾物質が、新しく形成されたベータ細胞の保護のための繰り返し投薬量で投与される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

R e g 受容体結合活性を有する前記作用物質が、寛容剤の免疫最下点の日に投与される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記免疫修飾物質が、リンパ球を標的にする一般的な免疫抑制剤または抗体である、請求項 6 8 に記載の方法。

10

【請求項 7 2】

前記免疫修飾物質が、シクロスポリン、h O K T 3 1 ( A l a - A l a ) および C h A g 1 y C D 3 を含む抗 C D - 3 抗体、シロリムス ( ラバマイシン )、タクロリムス ( F K 5 0 6 )、エタネルセプト、アレファセプト、ベラタセプト、熱ショックタンパク質 6 0 ( D i a p e p 2 7 7 )、結核ワクチン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ 6 5 ( G A D 6 5 ) ワクチン、カルメット - ゲラン杆菌もしくはカルメット - ゲランウシ型結核菌 / B C G ワクチンとして知られている B C G 結核ワクチン、単独のまたはダクリズマブと併用するミコフェノール酸モフェチル、抗 C D 2 0 作用物質、リツキシマブ、キャンパス - 1 H ( 抗 C D 5 2 抗体 )、リソフィリン、抗胸腺細胞グロブリン ( A T G )、プロロイキンまたはプロロイキンおよびラバミューンの併用、ビタミン D ( ビタミン D 2、D 3、1 . 2 5 ジヒドロキシ D、および他のビタミン D 調製物 )、I B C - V S O ワクチン、エクスビボ増殖ヒト自己由来 C D 4 + C D 1 2 7 1 o / - C D 2 5 + ポリクローナル調節性 T 細胞、インターフェロン - アルファ、C D 4 + C D 2 5 + 抗原特異的調節性 T 細胞を使用するワクチン、インターロイキン - 1 受容体アンタゴニスト ( アナキンラ )、またはアルファ 1 抗トリプシンである、請求項 6 8 に記載の方法。

20

【請求項 7 3】

グルコースコントロールの期間が、R e g 受容体結合活性を有する作用物質の治療有効量の投与の前に最適化される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記グルコースコントロールが、1 0 0 ~ 2 0 0 m g / d l のグルコースレベルで最適化される、請求項 7 3 に記載の方法。

30

【請求項 7 5】

前記グルコースレベルが 7 0 m g / d l 未満に落ちるのを妨げるために、前記グルコースコントロールが最適化される、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記グルコースコントロールの期間が、少なくとも 4 週間である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 7】

患者のインスリン用量を、低血糖症のエピソードを防ぎ、かつ島新生のための最適な範囲にグルコースレベルを維持するためのグルコースレベルに基づいて減少させる、請求項 6 1 に記載の方法。

40

【請求項 7 8】

R e g 受容体結合活性を有する前記作用物質が、経口、静脈内、動脈内、または皮下送達を通して投与される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 9】

R e g 受容体結合活性を有する前記作用物質が、膵臓または肝臓に直接投与される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 8 0】

R e g 受容体結合活性を有する前記作用物質が、他の糖尿病性作用物質と併用して投与

50

される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記他の糖尿病性作用物質が、インスリン、リラグルチド、エクセナチド、シタグリプチン、サクサグリプチン、リナグリプチン、プラムリンチド、アカルボース、オーリスタット、コレセベラム、プロモクリプチン、オーリスタット、ビグアナイド、メトホルミン、ダパグリフロジン、カナグリフロジン、スルホニル尿素、メグリチニド、G L P - 1 受容体アナログ、D P P - 4 阻害剤、チアゾリジンジオン、S G L T 2 阻害剤、抗炎症剤、またはビタミン D の形態をしている、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記他の糖尿病性作用物質を、毎日のグルコース値に基づいて、次第に減らすまたは低下させる、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記他の糖尿病性作用物質が、インスリンであり、1 日当たり約 0 . 5 ~ 2 . 0 % 低下させる、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記対象が、糖尿病治療剤により治療されていない、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記作用物質が、正常なグルコース代謝のための最少数のベータ細胞を維持するための間隔で投与される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 1 4 の部分配列であるアミノ酸配列を含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前駆細胞からの新たなベータ細胞の生成のための方法であって、  
a . エクスビゴにおいて前駆細胞を培養するステップ、および  
b . R e g 受容体結合活性を有する作用物質と前記前駆細胞を接触させるステップを含み、  
前記作用物質の量が、前記前駆細胞からベータ細胞を形成するのに効果的である方法。

【請求項 8 8】

前記作用物質が、ペプチドである、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記作用物質が、少なくとも 2 つのペプチドを含む融合ポリペプチドである、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記作用物質が、刺激性抗体である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記作用物質が、小分子である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 1 4 に少なくとも 7 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記融合タンパク質のそれぞれのペプチドが、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 1 4 に少なくとも 7 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記前駆細胞が、管、腺房、および前駆体胚性組織を含むヒト島外組織に由来する、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記前駆細胞が、胚性細胞、成人体性幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、多能性幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯幹細胞、ヒト羊膜由来間葉細胞、哺乳動物幹細胞、または外胚葉幹細胞

10

20

30

40

50

胞である、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 96】

新たに発症した 1 型および 2 型糖尿病、すでに存在している 1 型および 2 型糖尿病、成人潜在性自己免疫糖尿病 (LADA)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ - 65 自己免疫、糖尿病前症、高血糖症、グルコース不耐性、ベータ細胞機能障害または欠乏症、インスリン抵抗性、肥満、多嚢胞性卵巣症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、高脂血症、ならびに高トリグリセリド血症から選択されるグルコースホメオスタシス傷害に関連するまたはその危険因子となる状態を処置するための方法であって、

- a. エクスビポにおいて前駆細胞を培養するステップ、
- b. Reg 受容体結合活性を有する作用物質と前記前駆細胞を接触させるステップであって、前記作用物質の量が、前記前駆細胞からベータ細胞を形成するのに効果的であるステップ、
- c. 前記患者に前記ベータ細胞を投与するステップを含む方法。

10

【請求項 97】

前記作用物質が、ペプチドである、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

前記作用物質が、少なくとも 2 つのペプチドを含む融合ポリペプチドである、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 99】

前記作用物質が、刺激性抗体である、請求項 96 に記載の方法。

20

【請求項 100】

前記作用物質が、小分子である、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 101】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 70% 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 102】

前記融合タンパク質のそれぞれのペプチドが、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 14 に少なくとも 70% 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 103】

前記前駆細胞が、管、腺房、および前駆体胚性組織を含むヒト島外組織に由来する、請求項 96 に記載の方法。

30

【請求項 104】

前記前駆細胞が、胚性細胞、成人体性幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、多能性幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯幹細胞、ヒト羊膜由来間葉細胞、哺乳動物幹細胞、または外胚葉幹細胞である、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 105】

前記ベータ細胞が、経口、静脈内、皮下、または動脈内投与ルートを通して対象に投与される、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 106】

前記ベータ細胞が、臍静脈、門脈、または肝動脈を通して送達される、請求項 96 に記載の方法。

40

【請求項 107】

前記ベータ細胞が、脾臓または肝臓に直接送達される、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 108】

前記状態が、自己免疫に関連し、免疫修飾物質が、ベータ細胞の投与の前におよび / またはそれと並行して投与される、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 109】

前記免疫修飾物質が、リンパ球を標的にする一般的な免疫抑制剤または抗体である、請求項 108 に記載の方法。

50



## 【請求項 110】

前記免疫修飾物質が、シクロスポリン、h O K T 3 1 ( A l a - A l a ) および C h A g l y C D 3 を含む抗 C D - 3 抗体、シロリムス ( ラパマイシン )、タクロリムス ( F K 5 0 6 )、エタネルセプト、アレファセプト、ベラタセプト、熱ショックタンパク質 6 0 ( D i a p e p 2 7 7 )、結核ワクチン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ 6 5 ( G A D 6 5 ) ワクチン、カルメット - ゲラン桿菌もしくはカルメット - ゲランウシ型結核菌 / B C G ワクチンとして知られている B C G 結核ワクチン、単独のまたはダクリズマブと併用するミコフェノール酸モフェチル、抗 C D 2 0 作用物質、リツキシマブ、キャンパス - 1 H ( 抗 C D 5 2 抗体 )、リソフィリン、抗胸腺細胞グロブリン ( A T G )、プロロイキンまたはプロロイキンおよびラパミューンの併用、ビタミン D ( ビタミン D 2、D 3、1 . 2 5 ジヒドロキシ D、および他のビタミン D 調製物 )、I B C - V S O ワクチン、エクスビボ増殖ヒト自己由来 C D 4 + C D 1 2 7 l o / - C D 2 5 + ポリクローナル調節性 T 細胞、インターフェロン - アルファ、C D 4 + C D 2 5 + 抗原特異的調節性 T 細胞を使用するワクチン、インターロイキン - 1 受容体アンタゴニスト ( アナキンラ )、またはアルファ 1 抗トリプシンである、請求項 1 0 8 に記載の方法。

10

## 【請求項 111】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 1 4 の部分配列であるアミノ酸配列を含む、請求項 8 8 に記載の方法。

## 【請求項 112】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8、または配列番号 1 4 の部分配列であるアミノ酸配列を含む、請求項 9 7 に記載の方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本出願は、2012年9月27日に提出された米国仮特許出願第 6 1 / 7 0 6 , 2 2 5 号明細書ならびにすべて2012年10月26日に提出された米国非仮特許出願第 1 3 / 6 6 2 , 2 0 9 号明細書、米国非仮特許出願第 1 3 / 6 6 2 , 2 3 2 号明細書、米国非仮特許出願第 1 3 / 6 6 2 , 2 4 5 号明細書、および米国非仮特許出願第 1 3 / 6 6 2 , 2 5 3 号明細書に対する優先権の利益を主張し、これらの開示は、この参照によって組み込まれる。

30

## 【0002】

本発明は、新たなならびに既存の 1 型および 2 型糖尿病、糖尿病前症、ならびにインスリン欠乏症、ベータ細胞欠乏症、インスリン抵抗性、および糖代謝傷害の疾患の処置のための、新たな膵臓ベータ細胞の生成のための、ヒト R e g 1 a、R e g 1 b、R e g 3 a、および R e g 4 遺伝子タンパク質の生理活性領域に由来する新規な療法に関する。

## 【0003】

## 配列表の参照

「配列表」と題する配列表は、この内容がこの参照によって組み込まれ、本明細書と共に提出される。このテキストファイルは、2012年10月26日に生成された。

40

## 【背景技術】

## 【0004】

糖尿病は、人類が直面する最も重篤な健康問題のうちの 1 つであり、世界保健機構は、世界中のおよそ 3 億 4 6 0 0 万人が、糖尿病と既に診断されており、これは糖尿病をグローバルな課題にしていると報告している。糖尿病は、膵臓のベータ細胞によるインスリン産生が不十分な場合に現れる慢性疾患である。1 型患者のベータ細胞損失に至る自己免疫成分を共通して有する 1 型患者の間の 9 0 % 以上のベータ質量の低下と比較して、2 型糖尿病患者の間では、診断の時までにベータ細胞の質量が 5 0 ~ 8 0 % 低下している。

## 【0005】

50

本発明は、ヒトReg 1 a、ヒトReg 1 b、ヒトReg 3 a、およびヒトReg 4 タンパク質内で非常に保存されており、100%同一であるペプチド配列ならびに4つの他の哺乳動物種内で同一なRegペプチド配列を同定し、確認する。本発明者は、膵島発達における14アミノ酸ヒトReg 3 aペプチドの役割について以前に記載した。本発明は、以前に記載された、先行技術のヒト14アミノ酸ペプチドReg 3 aタンパク質および15アミノ酸ハムスターReg 3 ガンマタンパク質内に含有されず、ベータ細胞再生をもたらす、ヒトReg 1 a、Reg 1 b、Reg 3 a、およびReg 4 内に含有されるペプチド配列を同定する。本発明内に記載されるRegペプチドは、膵臓島外管組織上のReg受容体に直接結合する。Reg受容体と相互作用するが、Reg受容体に直接結合しないことが示されている14アミノ酸ペプチドの以前の研究とは対照的である (Levetan CS et al, Endocr Pract. 2008; 14(9): 1075 - 1083)。

10

#### 【0006】

本発明はまた、詳細には、Islet Neogenesis Associated Protein / INGAPとして知られている15アミノ酸ハムスターReg 3 ガンマ配列またはHuman Proislet Peptide / HIPとして知られている14アミノ酸ヒトReg 3 aペプチドの先行技術に含まれない、ヒトReg受容体内の結合領域およびReg受容体に直接結合する、Reg遺伝子タンパク質内の生理活性ペプチドを同定する。本発明は、新たなヒトベータ細胞の生成のための、Reg受容体の特異的な結合領域から生成されたこれらのペプチド、誘導体、ペプチド模倣薬、および刺激性抗体の実用性を実証する。

20

#### 【0007】

REG遺伝子は、げっ歯動物におけるベータ細胞再生に関連する膵外分泌部によって分泌されるタンパク質をコードする。Terazono K., et al., J Biol Chem (1988), 263: 2111 - 2114。REG 1 a、REG 1 b、REG 3 a、およびREG 4 は、C-レクチンファミリーに属し、2p12上でランダムにクラスター形成する。それらは、構造的な特性およびいくつかの機能的な特性を共有し、本発明において記載される配列相同性を有するRegファミリーのメンバーであるタンパク質をコードする。それらの産物は、ベータ細胞再生および増殖に関するC型レクチンスーパーファミリーの分泌タンパク質である。

30

#### 【0008】

特に1型糖尿病のために、本発明は、本発明において記載されるRegペプチドの開始前に免疫寛容剤を投与することによる、疾病の逆転のための新規なアプローチを記載する。現在までに、100を超える様々な免疫剤が、1型糖尿病げっ歯動物モデルおよび新たに発症した1型糖尿病を有するヒト対象に投与された。多くはげっ歯動物における糖尿病の逆転において成功したが、どれも、人における糖尿病の逆転に成功しておらず、インスリン非依存性に至らなかった。免疫遮断の点から有望性を実証するいくつかの作用物質があるが、ベータ細胞に対する免疫攻撃の遮断にもかかわらず、ベータ再生は、患者をインスリンフリーにするには遅すぎる。本発明は、糖尿病の逆転の成功のための再生プロセスを亢進するために、ベータ再生のためのRegペプチドの投与前に免疫寛容剤の投与を併用する。

40

#### 【0009】

本発明は、ベータ細胞生成の使用について以前に記載されていない、ヒトReg 1 a、ヒトReg 1 b、ヒトReg 3 a、およびヒトReg 4 タンパク質内にあるペプチド配列を同定する。本発明は、ヒトReg 1 a、ヒトReg 1 b、ヒトReg 3 a、およびReg 4 遺伝子タンパク質内の相同ペプチドがヒトReg受容体に直接結合することを特に実証し、これは、膵管組織からの新たなベータ細胞の生成の亢進をもたらす。15アミノ酸ハムスター配列 (Islet Neogenesis Associated Protein / INGAP) および14アミノ酸ヒトReg 3 aペプチド (Human Proislet Peptide) の両方は、Reg受容体を通して作用して、新たなベータ

50

細胞を生成するが、これらのペプチドのどちらも、直接ヒト R e g 受容体に直接結合せず、これは本発明において確認される。免疫原性である R e g 受容体内の生理活性ドメインもまた、同定され、この結合部位に対する刺激性抗体が生成された。

【 0 0 1 0 】

それがげっ歯動物における推定上の R e g 受容体であることが認識されてきたが、本発明は、ヒト 1 4 アミノ酸 R e g 3 a 内に含有されず、かつヒト R e g 1 a、R e g 1 b、R e g 3 a、および R e g 4 タンパク質内に含有され、R e g 受容体に直接結合して、新たなベータ細胞の形成に至るペプチドを初めて実証する。

【 0 0 1 1 】

本発明者による発見は、R e g 受容体が、管、腺房細胞、およびこれらの細胞内に含有される前駆細胞を含む島外分泌組織からのベータ細胞増殖および生成において重要な調節性の役割を果たすことを実証する。さらに、本発明は、ヒト R e g 1 a、ヒト R e g 1 b、ヒト R e g 3 a、およびヒト R e g 4 内の結合領域および R e g 受容体上の結合ドメインを同定し、これらは、新たなベータ細胞を必要とする糖尿病および他の疾患の処置のための標的となる。

10

【 0 0 1 2 】

本発明は、先行技術において記載されていないこれらのペプチドが、膵管組織表面上の R e g 受容体に結合する特有の R e g ペプチドであり、かつ R e g 受容体に結合するペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬の直接的な使用を介してのまたは新たなベータ細胞を生成する R e g 受容体内の特有の結合部位から生成された刺激抗体を介しての新たなベータ細胞の形成について中心的であることをさらに実証する。

20

【 0 0 1 3 】

本発明は、中心的な受容体となる R e g 受容体ならびに管、腺房細胞、およびこれらの細胞内に含有される前駆細胞を含む島外分泌組織の細胞質から核への R e g 受容体の移動をもたらして、ベータ細胞増殖、亢進、および代謝回転を起こす、R e g 結合の部位となる R e g 受容体内の特異的な部位を発見した。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 4 】

本発明の実施形態は、新規な作用物質および以前に記載されていない膵臓ベータ細胞再生作用物質についての方法を提供する。作用物質は、R e g 1 a、R e g 1 b、R e g 3 a、およびヒト R e g 4 タンパク質内の相同ヒトペプチド配列ならびに 9 1 9 アミノ酸タンパク質ヒト R e g 受容体内の特有の 2 0 アミノ酸結合領域から生成される刺激性抗体を含む。本発明は、記載されるヒトペプチドの製剤、誘導体、最適化された形態を含み、また、1 型および 2 型糖尿病ならびにインスリン欠乏症、ベータ細胞欠乏症、インスリン抵抗性、および異常なグルコース代謝の他の状態の処置における使用のために設計されるペプチド模倣薬ならびにペプチド模倣薬として果たす刺激性抗体をも含む。

30

【 0 0 1 5 】

本発明は、膵臓内の前駆細胞からの新たなベータ細胞の生成のための本発明において明示され、かつ器官特異的なターゲティングありおよびなしの経口、静脈内、および皮下送達を介して患者に提供される作用物質の直接的な送達のための方法を含み、膵臓への直接的な送達を含んでいてもよく、また、胚性幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯幹細胞、または他の幹細胞由来の新たなベータ細胞への本明細書における本発明を使用するエキスピボ形質転換をも含み、器官特異的なターゲティングありおよびなしの経口、静脈内、皮下送達を含むが、これらに限定されない送達のルートにより、新たなならびに既存の 1 型および 2 型糖尿病、糖尿病前症、ならびにインスリン欠乏症、ベータ細胞欠乏症、インスリン抵抗性、および糖代謝傷害の疾患を有する患者にその後投与される、成人の膵臓内に存在する内因性幹細胞の常在性の集団を含んでいてもよく、膵臓または肝臓への直接的な投与を含んでいてもよい。

40

【 0 0 1 6 】

50

本発明は、膵臓ベータ細胞生成のための方法を含み、インビボおよびエクスビボベータ細胞生成の両方ならびに新たに発症したおよびすでに存在している1型および2型糖尿病、成人潜在性自己免疫糖尿病(Latent Autoimmune Diabetes of Adulthood)(LADA)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ-65抗体を含む陽性自己免疫抗体マーカーを有する人々を含むが、これらに限定されない1型糖尿病の危険性がある人々、糖尿病前症ならびに高血糖症、グルコース不耐性およびベータ細胞機能障害または欠乏症、インスリン抵抗性、肥満、糖尿病の発達前の肥満、糖尿病前症に至る子供における肥満、小児期および青年期における1型および2型糖尿病の両方を含む関連する状態の疾患を有する人々を処置するための方法を含み、多嚢胞性卵巣症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、高脂血症および高トリグリセリド血症、ならびに有効量のインスリンの欠乏に係るまたはそれを欠く他の状態などのような状態を含むが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

#### 【0017】

第1の実施形態において、本発明は、「Perleペプチド」の実施形態と呼ばれる、ヒトReg1aタンパク質内の特異的再生生理活性ペプチド配列の発見を提供し、166アミノ酸ヒトReg1aタンパク質(配列番号2)およびヒトReg1b(配列番号3)内に見つけられる、ヒトReg1aおよびReg1b内の以下の生理活性配列、NVWIGLHDP(配列番号1)の発見を含み、配列番号1はまた、7つの他の哺乳動物において見つけられる配列に対して100%の相同性を有する(図17)。ヒトReg1aタンパク質(配列番号2)、Reg1a(配列番号3)内のおよびヒトReg3aタンパク質(配列番号5)内の8アミノ酸ペプチドVWIGLHDP(配列番号4)配列は、ヒト919アミノ酸Reg受容体(配列番号6)に直接結合することが本発明において実証される。配列番号4はまた、マウスではなくチンパンジー、ラットを含む12の哺乳動物に対して100%の相同性を有することも実証された(図18)。本発明はまた、ヒトReg1a、Reg1b、Reg3a、およびReg4内の相同なペプチド配列、WIGLHDP(配列番号7);ならびにすべてヒトReg3a(配列番号5)内に含有されるWIGLHDP(配列番号8)およびVWIGLHDP(配列番号14)を同定する。配列番号8は、チンパンジー、ラット、マウス、ヒツジ、および雌ウシを含む、12の他の哺乳動物に対して100%の相同性を有する(図19)。配列番号7は、チンパンジー、マウス、およびラットを含む14の哺乳動物に対して100%の相同性を有する(図20)。

#### 【0018】

第2の実施形態において、この発見は、919アミノ酸Reg受容体内の20アミノ酸特異的結合部位(配列番号9)を含み、Reg受容体に対する刺激性抗体が、この20アミノ酸から生成された。

#### 【0019】

第3の実施形態において、この発見はまた、Perleペプチドの変形を指すPerleペプチド模倣薬を含む「最適化されたPerleペプチド」をも含み、ペプチドが、安定性、溶解性を増加させるために修飾されており、未変性ペプチドと比較してプロテアーゼ抵抗性、免疫原性低下、Tmax、および生物学的利用率が増加しているならびに/または投与におけるより優れた容易性を提供する製剤を含む。最適化された製剤は、ペプチド配列を、遊離端を通常認識するプロテアーゼによる血清におけるプロテアーゼ切断を受けにくくし、それによって、ペプチドのTmaxおよび生物学的利用率を有効に増加させる先進の修飾を含み、1)c-末端アセチル基およびn-末端アミド基による遮断、2)n-末端にシステイン残基を追加することによって修飾し、溶液中で二量体を形成することができる化合物をもたらすその誘導体、3)生物学的活性を改善して、生物学的利用率および投薬効能を増加させる従来の主鎖環化による修飾を含むが、これらに限定されない。そのような修飾は、配列を、遊離端を通常認識するプロテアーゼによる血清におけるプロテアーゼ切断を受けにくくし、それによって、ペプチドのTmaxおよび生物学的利用率を有効に増加させる。このように修飾されたペプチドは、投与された場合に、効能の増

加を実証し、それによって、投薬量の減少が必要とされる。

【0020】

本発明の目的のために、安定性は、P e r l e ペプチド、最適化された P e r l e ペプチド、および P e r l e ペプチド模倣薬を標的にし、かつ分解する血清中のプロテアーゼによる分解に対するペプチドの抵抗性を指す。また、本発明の目的のために、生物学的利用率は、n - 末端アミド基および c - 末端アセチル基の追加、ペグ化、環化、ならびにその他の方法によるペプチドの遮断を含む P e r l e ペプチドおよび最適化された P e r l e ペプチドを分解するプロテアーゼおよび他の全身性の経路による分解を回避するための P e r l e ペプチドの能力に基づく、標的細胞、経路、および / または全身のメカニズムによるインビボにおける治療上の使用のために利用可能なペプチドの量を指す。

10

【0021】

第4の実施形態において、新たな膵臓ベータ細胞の生成が、P e r l e ペプチドの投与から起こり、製剤、誘導体、最適化された形態を含み、また、P e r l e ペプチドのペプチド模倣薬、最適化された P e r l e ペプチドをも含み、ヒト R e g 受容体および R e g 受容体内の特異的結合領域に結合する作用物質が、膵臓および肝臓への直接的なおよび間接的な送達による経口、静脈内、皮下を含むが、これらに限定されない送達の様式と共に、本発明において提示される。

【0022】

第5の実施形態において、本発明は、本発明から形成された新たなベータ細胞の自己免疫破壊を妨げるための免疫寛容剤と併用した、P e r l e ペプチド、最適化された P e r l e ペプチド、P e r l e ペプチド模倣薬、および P e r l e ペプチド受容体に対する刺激性抗体の使用を介しての、1) 新たに発症したおよびすでに存在している1型、成人潜在性自己免疫糖尿病 (L A D A)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ - 65 抗体陽性である人々を含む自己免疫マーカーを有する1型糖尿病の危険性がある人々を含む1型糖尿病および自己免疫糖尿病の処置における使用のための、新たなベータ細胞の生成のための新たな療法および特定の方法を提供する。

20

【0023】

現在までに、多数の免疫寛容剤が、新たに発症した1型糖尿病を有する患者において使用されてきたが、免疫攻撃が遮断された場合でさえ、新たなベータ細胞を生成する能力が非常に限られているので、どれも患者をインスリンフリーにすることができなかった。1型糖尿病の診断の時に、90%以上のベータ細胞の損失が既にあり、残りのベータ細胞に対する適切な免疫遮断にもかかわらず、外因性のインスリン注射が必要とされる。一旦、ベータ細胞が失われると、機能不全が、グルコースホメオスタシスに寄与する島内の残りの細胞型において続いて起こり、外因性のインスリン注射のみで糖尿病を治療して正常な範囲にするのを不可能にする。

30

【0024】

第5の実施形態は、1型糖尿病を有する患者の間の免疫寛容のために人に利用される様々な作用物質の間で非常に変動する特定の免疫剤の免疫最下点 (n a d i r) の日に始める、免疫寛容剤と並行した、P e r l e ペプチド、最適化された P e r l e ペプチド、P e r l e ペプチド模倣薬、および P e r l e ペプチド受容体に対する刺激性抗体の投与のための特定の方法論およびタイミングを含む。さらに、本発明は、新たなベータ細胞が生成されるとともに、患者が正常なグルコースレベルに接近するにつれて、ベータ細胞再生を妨げる低血糖症を妨げるための多数のフィードバックメカニズムがあるので、外因性のインスリン投薬量をモニターし、新たなベータ細胞が形成されるにつれて次第に減らすための特定の方法を提供する。

40

【0025】

この実施形態において、本発明によって新たなベータ細胞に誘発され、動脈内で、静脈内、皮下に、および効能を最適化するための膵臓、肝臓、または他の適切な標的への送達を含む送達により投与されてもよい、胚性細胞、成人体性幹細胞、ヒト成人骨髄由来幹細胞、臍帯幹細胞、間葉系幹細胞、ヒト羊膜由来間葉細胞、多能性細胞、哺乳動物幹細胞、

50

哺乳動物幹細胞、および外胚葉幹細胞を含む多能性幹細胞からの新たな膵臓ベータ細胞の形質転換によって、エキスピボで、P e r l e 製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および刺激 R e g 受容体抗体を含む最適化された形態を使用してエキスピボにおいて形成される、P e r l e ペプチドならびに / または製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態の投与のための方法論による、ベータ細胞のエキスピボ生成の生成の亢進のための革新的な療法。

#### 【 0 0 2 6 】

新たに発症したまたは既存の 1 型糖尿病を有する患者および成人潜在性自己免疫糖尿病を有する患者のために、P e r l e ペプチドならびに / もしくは製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態またはエキスピボ方法論によって生成された新たなベータ細胞を有する、P e r l e ペプチドならびに / もしくは製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態からのベータ細胞のエキスピボ生成から形成されたベータ細胞は、1 つまたは複数の免疫寛容剤が与えられた後に、新たに発症したまたは既存の糖尿病または成人潜在性自己免疫糖尿病を有する前記患者に与えられ、P e r l e ペプチドならびに / または製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態によって生成される新たなベータ細胞は、前記患者に送達され、ベータ細胞は、詳細には、シクロスポリン、免疫応答を標的にし、1 型糖尿病におけるベータ細胞死を引き起こす T - リンパ球を特異的に遮断する、h O K T 3 1 ( A l a - A l a ) および C h A g l y C D 3 を含む抗 C D - 3 抗体 ; シロリムス ( ラパマイシン ) ; タクロリムス ( F K 5 0 6 ) ; エタネルセプト、アレファセプト、ベラタセプト、熱ショックタンパク質 6 0 ( D i a p e p 2 7 7 ) ; 結核ワクチン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ 6 5 ( G A D 6 5 ) ワクチン ; カルメット - ゲラン杆菌またはカルメット - ゲランウシ型結核菌 / B C G ワクチンとして知られている B C G 結核ワクチン、単独のまたはダクリズマブと併用するミコフェノール酸モフェチル ; 抗 C D 2 0 作用物質、リツキシマブ ; キャンパス - 1 H ( 抗 C D 5 2 抗体 ) 、リソフィリン ; 抗胸腺細胞グロブリン ( A T G ) 、プロロイキンならびにプロロイキンおよびラパミューンの併用、ビタミン D ( ビタミン D 2 、 D 3 、 1 . 2 5 ジヒドロキシ D 、 および他のビタミン D 調製物 ) 、 I B C - V S O ワクチン、エキスピボ増殖ヒト自己由来 C D 4 + C D 1 2 7 l o / - C D 2 5 + ポリクローナル調節性 T 細胞 ; インターフェロン - アルファ ; C D 4 + C D 2 5 + 抗原特異的調節性 T 細胞、インターロイキン - 1 受容体アンタゴニスト ( アナキンラ ) 、アルファ 1 - 抗トリプシン、および他の免疫保護剤を使用するワクチンを含んでいてもよいが、これらに限定されない、どの作用物質が選択されるかに依存して個々の免疫療法またはその併用によって変動する、結果として生じる免疫最下点の日を開始される。新たなベータ細胞は、動脈内、静脈内、皮下、および効能を最適化するための膵臓、肝臓、または他の適切な標的への送達を含む送達を介して前記患者に送達されてもよい。

#### 【 0 0 2 7 】

第 6 の実施形態において、本発明は、ベータ細胞の生成の亢進のための、製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態を含む P e r l e ペプチドの使用を提供し、経口、静脈内、皮下を介して患者に直接与えられ、膵臓または肝臓への標的療法を含んでいてもよく、また、経口、静脈内、皮下、動脈内、および効能を最適化するための膵臓、肝臓、または他の適切な標的への送達を含む送達を含む様式による新たなベータ細胞の送達による、新たに発症したおよびすでに存在している 2 型糖尿病、糖尿病前症ならびにその危険性がある人々高血糖症、グルコース不耐性、およびベータ細胞機能障害または欠乏症、インスリン抵抗性、メタボリックシンドロームの疾患ならびに肥満、糖尿病の発達前の肥満、糖尿病前症に至る子供における肥満、小児期糖尿病を含む関連する状態、多嚢胞性卵巣症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、高脂血症、および高トリグリセリド血症を含むが、これらに限定されない両方のおよび他の状態、ならびに有効量のインスリンの欠乏に係るまたはそれを欠く他の状態の処置のための、本発明によってベータ細胞に誘発される胚性細胞、成人体性幹細胞、ヒト成人骨髄由

10

20

30

40

50

来幹細胞、臍帯幹細胞、間葉系幹細胞、ヒト羊膜由来間葉細胞、多能性細胞、哺乳動物幹細胞、哺乳動物幹細胞、および外胚葉幹細胞を含む多能性幹細胞から膵臓ベータ細胞へのエキスビボ形質転換によって形成された、患者へのベータ細胞の直接的な送達を含んでもよい。

#### 【0028】

本発明の第7の実施形態において、新たに発症したおよびすでに存在している2型糖尿病、糖尿病前症、グルコース不耐性、高血糖症、インスリン抵抗性およびグルコース機能障害の症候群、高血糖症、グルコース不耐性およびベータ細胞機能障害または欠乏症、インスリン抵抗性の疾患ならびに肥満、糖尿病の発達前の肥満、糖尿病前症に至る子供における肥満、小児期糖尿病（1型および2型の両方）を含む関連する状態、ならびに多嚢胞性卵巣症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、高脂血症、および高トリグリセリド血症を含むが、これらに限定されない他の状態ならびに有効量のインスリンの欠乏に係るまたはそれを欠く他の状態の、単独でまたはすべてのタイプのインスリン、スルホニル尿素、メトホルミン、メグリチニド、GLP-1受容体アナログ、DPP-4阻害剤、チアゾリジンジオン、SGLT2阻害剤、抗炎症剤、プラムリンチド、ビタミンD、および/もしくはライフスタイル調節、ならびに本発明によって形成された新たなベータ細胞の破壊を妨げ、かつ制限するためにグルコースを改善するために利用される他の作用物質を含んでもよい、1つもしくは複数の糖尿病治療薬と一緒に投与されるPerleペプチドの製剤、誘導体、最適化された形態、およびペプチド模倣薬を含むPerleペプチドの同時投与による、特定の方法ならびに処置を含む。

10

20

#### 【0029】

本発明の第8の実施形態は、Perleペプチドの製剤、誘導体、最適化された形態、およびペプチド模倣薬を含むPerleペプチドが効能を最適化するために投与されるにつれて、患者へのインスリンおよび/または糖尿病薬を次第に減らすための特定の方法および処置を含む。これは、新たなベータ細胞の形成を最適化するために、Perleペプチドおよび誘導体による処置の前および処置の間に血糖の環境を最適化するための特定の方法論を提供することを含む。

#### 【0030】

本発明の第9の実施形態は、Perleペプチドを利用する糖尿病前症、新たに発症したおよび先在する2型糖尿病のための特定の方法および処置を含み、糖尿病治療剤未処置の患者に投与される、新たな膵臓ベータ細胞の形成を亢進するためのPerleペプチドの製剤、誘導体、最適化された形態、およびペプチド模倣薬を含む。

30

#### 【0031】

第10の実施形態において、本発明は、単独のまたは1つもしくは複数の他の医薬品有効成分（active pharmaceutical ingredient）（API）と併用するPerleペプチドの医薬製剤および単位用量形態を提供する。一実施形態において、APIが、Perleペプチドを、選択される製剤に依存して、皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、およびさらに経口的を含む、様々なルートによって投与するのを可能にする可溶性リボソーム調製物中の作用物質である。一実施形態において、製剤が、一般的な全身投与のためのものであるが、他の実施形態において、製剤が、肝臓および/または膵臓へのターゲティングを含む、特定の場所、受容体、細胞、組織、器官、または器官系への標的投与のための標的作用物質を含む。

40

#### 【0032】

第11の実施形態において、1型または2型のいずれかの糖尿病または糖尿病前症を有していてもよく、そのような処置を必要とする対象において、特に膵臓機能傷害に関連する病態を処置するための方法が、提供される。方法は、（1）血糖コントロールを強化する、（2）40mg/ml以上の25-ヒドロキシビタミンDを維持するために経口ビタミンDを投与する；（3）免疫抑制剤の投与を含む、新たな島細胞の形成を保護するための1つまたは複数の免疫療法を投与する；（4）インスリンまたは他の糖尿病治療薬と併用して、Perleペプチド製剤、誘導体、最適化された形態、およびペプチド模倣

50

薬を投与する、(5)新たなベータ細胞集団が回復するにつれて、他の糖尿病療法を低下させるまたは次第に減らす、(6)選択された免疫療法に依存して、日常的に、Perleペプチド製剤、誘導体、最適化された形態、およびペプチド模倣薬によって形成されたベータ細胞の保護のために免疫療法の繰り返しの投薬量を投与する、ならびに(7)正常なグルコース代謝のための最少数のベータ細胞を維持するための間隔で、Perleペプチド製剤、誘導体、最適化された形態、およびペプチド模倣薬を投与する、の1つまたは複数のステップを含む。

【0033】

本発明の実施形態はまた、1型もしくは2型糖尿病または異常なグルコースレベルおよびインスリンレベル、グルコース代謝もしくはインスリン抵抗性における急性の混乱がある他の状態を有する患者を処置するためのキットであって、治療有効用量のPerleペプチド、最適化されたPerleペプチド、またはPerleペプチドペプチド模倣薬および他のPerle製剤を含むキットをも提供する。さらなる実施形態は、サンプル中のPerleペプチド、最適化されたPerleペプチド、およびPerleペプチド模倣薬のレベルを測定するためのキットであって、Perleペプチド、最適化されたPerleペプチド、およびPerleペプチド模倣薬特異的抗体ならびに任意選択で、Perleペプチド、最適化されたPerleペプチド、およびPerleペプチド模倣薬ならびに任意選択で標識手段を有するキットを提供する。

10

【0034】

配列の説明

20

配列番号1は、9アミノ酸長である本発明のペプチドの実施形態である。配列番号1は、ヒトRegenerating islet-derived 1alpha(Reg1a)の部分配列である。

【0035】

配列番号2は、ヒトリソスタシン-1-アルファ前駆物質(公的な受入番号NP\_\_002900)としても知られているヒトRegenerating islet-derived 1alpha(Reg1a)である。

【0036】

配列番号3は、リソスタシン-1-ベータ前駆物質(公的な受入番号NP\_\_006498)としても知られているヒトRegenerating islet-derived 1beta(Reg1b)である。

30

【0037】

配列番号4は、8アミノ酸長である本発明のペプチドの実施形態である。配列番号4は、ヒトReg1a、ヒトReg1b、およびヒトReg3aの部分配列である。

【0038】

配列番号5は、ヒトregenerating islet-derived protein 3-alpha precursor(Reg3a)(公的な受入番号NP\_\_002571)である。

【0039】

配列番号6は、エキソストシン(exostotin)様3(公的な受入番号NP\_\_001431)としても知られているヒトReg受容体である。

40

【0040】

配列番号7は、7アミノ酸長である本発明のペプチドの実施形態である。配列番号7は、ヒトReg1a、ヒトReg1b、ヒトReg3a、およびヒトReg4の部分配列である。

【0041】

配列番号8は、8アミノ酸長である本発明のペプチドの実施形態である。配列番号8は、ヒトReg3aの部分配列である。

【0042】

配列番号9は、本発明のペプチドに対するヒトReg受容体内の結合部位の実施形態で

50



ある。配列番号 9 は、ヒト Reg 受容体の部分配列である。

【0043】

配列番号 10 は、ヒト regenerating islet - derived protein 4 isoform 1 precursor (Reg 4) (公的な受入番号 NP\_114433) である。

【0044】

配列番号 11 は、14 アミノ Reg 3a ペプチド配列 (Human Proislet Peptide (HIP)) (米国特許第 7,393,919 号明細書の配列番号 3) である。

【0045】

配列番号 12 は、ハムスター Reg 3 ガンマ ペプチド配列内の 15 アミノ酸ペプチドである (Islet Neogenesis Associated Protein (INGAP)) (米国特許第 5,834,590 号明細書の配列番号 2 のアミノ酸残基 103 ~ 117)。

【0046】

配列番号 13 は、ヒト Reg 受容体の N - 末端部分配列である。

【0047】

配列番号 14 は、ヒト Reg 3a 内の 9 アミノ酸ペプチドである。

【図面の簡単な説明】

【0048】

この特許の書類は、カラーで制作された少なくとも 1 つの写真または図面を含有する。本発明の性質および利点のより完全な理解のために、添付の図面に関してなされる以下の詳細な説明を参照されたい。

【0049】

【図 1】図 1 は、新たなベータ細胞の生成におけるヒト Reg 1a、Reg 1b、Reg 3a、および Reg 4 Perle ペプチドの図式的な作用メカニズムを示す図である。

【図 2】図 2 は、管、腺房細胞、および前駆細胞を含有する島外分泌組織内に見つられる、前駆細胞から出芽している、ベータ細胞を含有するげっ歯動物の島の写真を示す図である。

【図 3】図 3 は、赤色の円で囲まれる結合アーム内に含有される Perle ペプチドでの Swiss - Prot フォールディングアルゴリズムによるヒト Reg 1a、ヒト Reg 3a、およびハムスター Reg 3 ガンマの 3 次元構造を示す図である。

【図 4】図 4 は、ヒト Reg 1a、Reg 1a、Reg 3a、および Reg 4 ならびにハムスター Reg 3 ガンマの間のペプチド相同性を示す図である。共通の配列を赤色で強調する。

【図 5】図 5 は、ベータ生成ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、雌ウシ、マウス、およびヒツジにおいて見つけれられる Reg 配列と 100% の相同性を有する 8 アミノ酸ヒト Reg 配列 (配列番号 8) を示す図である。

【図 6】図 6 は、赤色で強調される、本発明において提示される 20 アミノ酸結合ドメイン (配列番号 9) を有する Reg 受容体の 919 アミノ酸配列を示す図である。

【図 7】図 7 は、本発明において使用するための Reg 受容体の精製および検出を示す図である。

【図 8】図 8 は、細胞表面上の Reg 受容体 (図 8a) と Reg の存在下における細胞の内部への Reg 受容体の内部移行 (図 8b) の標識を示す図である。

【図 9】図 9 は、Reg 受容体への Perle ペプチドの直接的な結合を示す図である。14 アミノ酸ヒト Reg 3a ペプチド (HIP) も、スクランブルしたペプチドコントロールも、Reg 受容体への直接的な結合を示さなかった。8 アミノ酸 Perle ペプチドは、Reg 受容体への最も大きな結合を示した。

【図 10】図 10 は、8 アミノ酸ペプチドによる、細胞質の核からの Reg 受容体の核移動の確認を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 1 1】図 1 1 は、R e g 受容体内の 2 0 アミノ酸結合部位に対する刺激性抗体を生成するための研究の結果を示す図である。

【図 1 2】図 1 2 は、R e g 受容体内の結合ドメインに対する刺激性抗体の開発のためのプロトコルを示す図である。

【図 1 3】図 1 3 は、抗体研究のための力価コントロールおよび基準についての記述を示す図である。

【図 1 4】図 1 4 は、P e r l e ペプチド、製剤、誘導体、ならびにペプチドのペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激抗体を含む最適化された形態を利用する、新たに発症したまたは既存の 1 型糖尿病を逆転させるための方法論を示す図である。

【図 1 5】図 1 5 は、P e r l e ペプチド、製剤、および誘導体、ペプチドのペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激抗体を含む最適化された形態を含むベータアゴニスト療法を利用する、2 型糖尿病を逆転させるための方法論を示す図である。

【図 1 6】図 1 6 は、管、腺房細胞、および前駆細胞、ヒト胚性幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯幹細胞、または他の幹細胞を含むヒト島外組織を形質転換するために、P e r l e ペプチド、製剤、誘導体、ペプチドのペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激抗体を含む最適化された形態を使用する、ベータ細胞のエキスビボ生成を示し、臍静脈、門脈系統 ( p o r t a l v e n o u s s y s t e m i c )、肝動脈、皮下送達を介して、糖尿病およびインスリン欠乏症の他の状態を有する患者にその後送達される新たなベータ細胞に形質転換される、成人の膵臓内に存在する内因性の幹細胞の常在性の集団を含んでもよいことを示す図である。

【図 1 7】図 1 7 は、ベータ生成ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、ラット、ゴールデンハムスター、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、ローランドゴリラ、白い房状の耳をしたマーモセット ( w h i t e - t u f t e d - e a r e d m a r m o s e t ) を含む他の哺乳動物において見つけれられる R e g 配列と 1 0 0 % の相同性を有する 9 アミノ酸ヒト R e g 配列 ( 配列番号 1 ) を示す図である。

【図 1 8】図 1 8 は、ベータ生成ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、ラット、ゴールデンハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、雌ウシ、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、ローランドゴリラ、白い房状の耳をしたマーモセットを含む他の哺乳動物において見つけれられる R e g の配列と 1 0 0 % の相同性を有する 8 アミノ酸ヒト R e g 配列 ( 配列番号 4 ) を示す図である。

【図 1 9】図 1 9 は、ベータ再生ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、ラット、マウス、ゴールデンハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、雌ウシ、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、ローランドゴリラ、ヨーロッパの家畜のフェレットを含む他の哺乳動物において見つけれられる R e g 配列と 1 0 0 % の相同性を有する 8 アミノ酸ヒト R e g 配列 ( 配列番号 8 ) を示す図である。

【図 2 0】図 2 0 は、ベータ再生ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、ラット、マウス、ゴールデンハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、雌ウシ、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、ローランドゴリラ、白い房状の耳をしたマーモセット、ヨーロッパの家畜のフェレットを含む他の哺乳動物において見つけれられる R e g 配列と 1 0 0 % の相同性を有する 7 アミノ酸ヒト R e g 配列 ( 配列番号 7 ) を示す図である。

【図 2 1】図 2 1 は、ベータ再生ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、ラット、マウス、ゴールデンハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、雌ウシ、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、ローランドゴリラを含む他の哺乳動物において見つけれられる R e g 配列と 1 0 0 % の相同性を有する 9 アミノ酸ヒト R e g 配列 ( 配列番号 1 4 ) を示す図である。

【図 2 2】図 2 2 は、チンパンジー、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、イヌ、雌ウシ、オポッサム、ガラゴ、テナガザル、オランウータン、マカク、ゴリラ、マーモセット、およびウマを含む他の哺乳動物において見つけれられる R e g 受容体配列と 1 0 0 % の相

10

20

30

40

50

同性を有する R e g 受容体内で同定された 2 0 アミノ酸ヒト配列を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0050】

定義

以下の定義は、読者を助けるために提供される。他に定義されない限り、本明細書において使用される、当技術分野の用語、表記法、および他の科学または医学用語または術語はすべて、化学および医学の当技術分野における当業者らによって一般に理解される意味を有することが意図される。いくつかの場合において、一般に理解されている意味を有する用語は、明瞭さのためにおよび / または参考のために本明細書において定義され、本明細書におけるそのような定義の包含は、必ずしも、当技術分野において一般に理解される用語の定義に対する実質的な差異を示すように解釈されるわけではない。

10

【0051】

本明細書において使用されるように、状態または患者を「処置する」は、臨床上的結果を含む有益なまたは所望の結果を得るためのステップを行うことを指す。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床上的結果は、糖尿病の 1 つまたは複数の症状の軽減または回復、疾患の範囲の減少、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の回復、寛解、または安定化、および下記に記載される他の有益な結果を含むが、これらに限定されない。糖尿病の症状は、低いまたは不適正なレベルのインスリンまたはインスリン活性、頻繁な排尿、過度の口渇、極度の空腹、普通でない体重減少、疲労の増加、過敏性、霧視、生殖器のかゆみ、変なうずきおよび痛み、乾燥した口、乾燥肌または敏感肌、インポテンス、膣酵母感染、切り傷およびすり傷の治癒不良、過剰なまたは普通でない感染、高血糖症、血糖コントロールの損失、食後血中グルコースにおける増減、血液グルカゴンにおける増減、血液トリグリセリドにおける増減を含む。糖尿病は、当業者によく知られている方法によって診断されてもよい。たとえば、一般に、糖尿病患者は、126 mg / d L 以上のグルコースの血漿血中グルコース結果を有する。前糖尿病は、これもまた、本発明の組成物および方法によって処置されてもよいが、100 ~ 125 mg / d L のグルコースの血中グルコース結果を有する患者において一般に診断される。他の症状もまた、糖尿病、関係する疾患および状態、ならびに膵臓機能の減少によって冒される疾患および状態を診断するために使用されてもよい。

20

【0052】

本明細書において使用されるように、症状の「低下」（およびこの語句の文法上の等価物）は、症状の重症度もしくは頻度を減少させることまたは症状の排除を意味する。

30

【0053】

本明細書において使用されるように、「グルコースホメオスタシス傷害」は、健康および機能を安定化するためにフィードバックコントロールのシステムによってグルコースを調節するための対象における能力の減少である。グルコースホメオスタシス傷害に関連するまたはその危険因子となる状態は、新たに発症した 1 型および 2 型糖尿病、すでに存在している 1 型および 2 型糖尿病、成人潜在性自己免疫糖尿病（LADA）、グルタミナシデカルボキシラーゼ - 65 自己免疫、糖尿病前症、メタボリックシンドローム、高血糖症、グルコース不耐性、ベータ細胞機能障害または欠乏症、インスリン抵抗性、肥満、多嚢胞性卵巣症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、高脂血症、ならびに高トリグリセリド血症を含む。

40

【0054】

本明細書において使用されるように、対象に薬剤を「投与する」または対象への薬剤「の投与」（およびこの語句の文法上の等価物）は、自己投与を含む直接的な投与および薬剤を処方する行為を含む間接的な投与の両方を含む。たとえば、本明細書において使用されるように、薬剤を自己投与するように患者に命じるおよび / または薬剤の処方を患者に提供する医師は、患者に薬剤を投与している。

【0055】

本明細書において使用されるように、「対象」または「患者」は、哺乳動物、典型的に

50

ヒトであるが、任意選択で、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、およびネコを含むが、これらに限定されない、獣医学に重要な哺乳類の動物である。

【0056】

本明細書において使用されるように、薬剤または作用物質の「治療有効量」は、疾患または状態を有する対象に投与された場合に、意図される治療効果、たとえば、対象における疾患または状態の1つまたは複数の症状発現の軽減、回復、寛解、または排除を有するであろう薬剤または作用物質の量である。完全な治療効果は、必ずしも、1回の用量の投与によって起こるわけではなく、一連の用量の投与の後にのみ起こってもよい。したがって、治療有効量は、1つまたは複数の投与で投与されてもよい。

【0057】

本明細書において使用されるように、薬剤の「治療有効量」はまた、対象に投与された場合に、意図される予防的な効果、疾患もしくは症状の発症（もしくは再発）を妨げるもしくは遅延させることまたは疾患もしくは症状の発症（もしくは再発）の可能性を低下させることを有するであろう薬剤の量であってもよい。完全な予防的な治療効果は、必ずしも、1回用量の投与によって起こるわけではなく、一連の用量の投与の後にのみ起こってもよい。したがって、治療有効量は、1つまたは複数の投与で投与されてもよい。

【0058】

「Reg」は、Regenerating islet-derivedである(Regenerating islet-derived proteinのように)。

【0059】

「Perleペプチド」は、Regenerating islet-derived protein内に含有される特定の再生生理活性ペプチド配列である。

【0060】

本発明を実行するための様式

1型および2型糖尿病は、インスリン分泌の減少から結果として生じる疾患と長い間考えられてきた。過去1世紀にわたって実行された研究は、インスリンを生成する新たなベータ細胞の生成が、この疾患を逆転させる鍵となることをより明らかに発見した。2型糖尿病の発症時に、新たに診断された1型糖尿病患者において見つけられる、より急性の90%の損失と比較して、ベータ細胞質量の50%~80%の低下がある。ベータ細胞質量は、誕生から成人期まで数倍増え得るが、これは、1型および2型糖尿病の両方において見られる新たなベータ細胞の生成よりも大きな損失を補うのに十分ではない。

【0061】

過去数十年間にわたって、再生遺伝子(RegまたはREG)ファミリーは、島新生のプロセスにおいて可能性として考えられる鍵となる開始因子として、ヒトを含む多くの種の間で明らかになった。Reg遺伝子は、島新生に関連しており、膵臓に初めてベータ細胞が集合しようとしている胚形成の間に膵臓においてアップレギュレートされる。

【0062】

胎児の発育の後に、Reg遺伝子は、普通、検出できないが、膵石、膵炎、膵管結紮および被覆(wrapping)、部分的な膵切除、ならびに妊娠を含む急性膵外傷に応じてアップレギュレートされる。Reg遺伝子タンパク質は、膵臓によってほぼ独占的に発現されるC型レクチンタンパク質のファミリーである。

【0063】

15アミノ酸ハムスターReg 3ガンマ遺伝子タンパク質(INGAP)および14アミノ酸Reg 3aペプチド(HIP)は、両方とも、島外分泌前駆体からの新たなベータ細胞の形成ならびにNGN3、PDX-1、NKx6.1、Ins、Sox9、および他を含む新たなベータ細胞に関連する成長促進因子のアップレギュレートを刺激することが示された。

【0064】

本発明は、Reg受容体に直接結合し、下流の活性を刺激して、細胞膜から核までReg受容体の移動をもたらし、新たなベータ細胞の形成を刺激する、15アミノ酸ハムスタ

10

20

30

40

50

ー R e g 3 ガンマ遺伝子タンパク質 ( I N G A P ) 内にも、ヒト 1 4 アミノ酸 R e g 3 a ペプチド、H u m a n P r o i s l e t P e p t i d e ( H I P ) 内にも含有されない鍵となるヒト R e g ペプチド配列を同定する。そのうえ、本発明は、ペプチド模倣薬として果たす刺激性抗体が生成された 9 1 9 アミノ酸 R e g 受容体内の特異的な結合領域を同定する。

【 0 0 6 5 】

図 1 は、ヒト R e g 1 a、R e g 1 b、R e g 3 a、および R e g 4 ペプチドが、膵臓外分泌組織上のヒト R e g 受容体に結合し、相互作用し、細胞表面上のその位置からの R e g 受容体の移動を刺激し、細胞膜から細胞質を通して核へ R e g 受容体の移動を亢進して、下流の活性化が新たな膵臓ベータ細胞の生成に至る方法を実証する、本発明の発見を示す図式画である。

10

【 0 0 6 6 】

図 2 は、管、腺房細胞、および前駆細胞を含有する周囲の島外管組織内の前駆細胞からの出芽から形成されるげっ歯動物島の写真である。膵臓管細胞から生じる新たな島細胞について最初に知られている記載は、1 8 9 3 年のフランスの組織学者、E d o u a r d L a g u e s s e に由来する。

【 0 0 6 7 】

図 3 は、それらの一次アミノ酸配列に基づき、S w i s s - P r o t フォールディングアルゴリズムによる、ヒト R e g 1 a、R e g 3 a、およびハムスター R e g 3 ガンマペプチドの 3 次元構造の間の類似性および差異を示す図である。図 3 a は、ヒト R e g 1 a についての 3 次元構造を示す。図 3 b は、R e g 3 a についての 3 次元構造を示す。図 3 c は、ハムスター R e g 3 ガンマについての 3 次元構造を示す。R e g 受容体に結合する P e r l e ペプチドを含有するタンパク質の領域を、赤色で囲み、P e r l e ペプチドは、1 4 アミノ酸の以前に記載された H I P ペプチドおよび 1 5 アミノ酸ハムスターペプチド I N G A P 内に含有されない。

20

【 0 0 6 8 】

図 4 は、R e g 1 a についての 1 6 6 アミノ酸配列 ( 配列番号 2 )、R e g 1 b についての 1 6 6 アミノ酸配列 ( 配列番号 3 )、R e g 3 についての 1 7 5 アミノ酸配列 ( 配列番号 5 )、R e g 4 についての 1 5 8 アミノ酸配列 ( 配列番号 1 0 )、およびハムスター R e g 3 ガンマタンパク質のアライメントである。1 4 アミノ R e g 3 a ペプチド配列 ( H I P ) ( 配列番号 1 1 ) およびハムスター R e g 3 ガンマペプチド配列 I N G A P 内の 1 5 アミノ酸ペプチド ( 配列番号 1 2 ) は、R e g 受容体と相互作用して、新たなベータ細胞の下流の生成をもたらすことが先行技術において示されたが、これらの配列は、R e g 受容体に直接結合することが実証されておらず、これは、本発明の発見において確認される。本発明内に提示される 8 および 7 アミノ酸配列は、R e g 受容体に結合し、1 4 アミノ酸 R e g 3 a ペプチド内にも、H I P 内にも、ハムスター R e g 3 ガンマペプチド、I N G A P 内にも含有されない。

30

【 0 0 6 9 】

図 5 は、R e g 受容体に結合するタンパク質の結合アーム内に位置するヒト R e g 1 a、R e g 1 b、R e g 3 a、R e g 4、およびハムスター R e g 3 ガンマペプチド内の 1 0 0 % 相同な配列 ( 配列番号 8 ) の同定を示す。このまさにその配列はまた、ヒト、チンパンジー、雌ウシ、ヒツジ、およびマウスにおいて見つけられる。この配列 ( 配列番号 8 ) および配列内のアミノ酸は、1 4 アミノ酸ヒト R e g 3 a H I P ペプチド内にも、1 5 アミノ酸ハムスター R e g 3 ガンマペプチド、I N G A P 内にも含有されない。

40

【 0 0 7 0 】

図 6 は、9 1 9 アミノ酸 R e g 受容体 ( 配列番号 6 ) および本発明の発見において同定され、P e r l e ペプチドに対する結合ドメインであり、かつ受容体のこの領域に対する刺激性抗体が生成された赤色をした 2 0 アミノ酸ドメイン ( 配列番号 9 ) を示す。

【 0 0 7 1 】

図 7 は、R e g 受容体発現プラスミド D N A によりトランスフェクトした 2 9 3 T 細胞

50

を利用する R e g 受容体発現および精製を実証するために行われた研究からの結果を実証する。細胞は 7 2 時間後に収集した。R e g 受容体を F L A G エピトープによりタグ付けし、F L A G 樹脂は、R e g 受容体を精製するために利用した。図 7 において示されるように、R e g 受容体は高度に精製された。R e g 受容体は、抗 F l a g M 2 アフィニティゲルによって精製した。標的タンパク質は、4 ~ 1 2 % S D S - P A G E およびウエスタンブロットによって確認した。図 7 a は、高純度の R e g 受容体を示すためのドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動 ( S D S - P A G E ) の使用を実証する。図 7 b および 7 c は、精製タンパク質が、R e g 受容体に対する抗体 ( C D 1 0 4 ) を使用して、R e g 受容体であることを示すウエスタンブロット結果である。R e g 受容体は、図 7 において高度に精製されることが示される。

10

#### 【 0 0 7 2 】

次いで、R e g 受容体への P e r l e ペプチドの直接的な結合を実証するために、精製した R e g 受容体を、炭酸水素塩コーティングバッファー、p H 9 . 6 を使用することによって 9 6 ウェルプレート上にコーティングした；ウェル当たり濃度 3 u g / m l 、 1 0 0 u l で一晚、4 。プレートを、一晚、コーティングし、コーティングしたプレートを、0 . 5 x T B S T により 3 回洗浄し、3 % B S A により遮断し、1 時間、室温で回転させた。遮断の後に、プレートを、0 . 5 x T B S T により 3 回洗浄した。次いで、ペプチドを、T B S T バッファーにより希釈し、二通りでウェルに追加し、次いで、1 時間、室温で結合させた。3 回洗浄した後に、1 0 0 n g / m l s t r e p - H R P を、1 0 0 u l / ウェルでプレートに追加し、1 時間、室温で回転させた。A B S T 試薬を、室温に 2 0

20

温め、使用直前に混合した。次いで、1 0 0 u l を、それぞれのウェルに追加し、反応の 2 5 分後に読み取り、吸光度を、S p e c t r a m a x M 5 プレート読み取り装置によって 4 0 5 n m で評価した。精製した R e g 受容体を、プレート上にコーティングした。次いで、プレートを、B S A 溶液により遮断した。続いて、P e r l e ペプチドを、ウェルに追加し、H R P - ストレプトアビジンおよびその基質を、ウェルに追加して、受容体および P e r l e ペプチドの間の相互作用を明らかにした。

#### 【 0 0 7 3 】

図 8 において示されるように、7 アミノ酸 P e r l e ペプチド、8 アミノ酸 P e r l e ペプチド、および 9 アミノ酸 P e r l e ペプチドはすべて、R e g 受容体に直接結合する。8 アミノ酸ペプチドは、R e g 受容体への結合において最も強力であるように思われた。スクランブルしたコントロールペプチドは、R e g 受容体に結合しなかった。1 4 アミノ酸ヒト R e g 3 a ペプチド ( H I P ) は、R e g 受容体との相互作用を通して新たなベータ細胞を生成する能力を実証したが、R e g 受容体に直接結合することは示されていない。1 4 アミノ酸ヒト R e g 3 a ペプチド ( H I P ) は、スクランブルしたペプチドと同じレベルの結合を有することがこの研究において示された ( 図 8 )。7、8、および 9 アミノ酸 P e r l e ペプチド配列は、1 4 アミノヒト R e g 3 a ペプチド ( H I P ) 配列内にも、1 5 アミノ酸ハムスター 3 ガンマペプチド ( I N G A P ) 内にも含有されない。

30

#### 【 0 0 7 4 】

図 9 は、ヒト膵臓外分泌管細胞の細胞表面上の R e g 受容体の免疫蛍光染色を示す。標準的な培地においてヒト膵臓管細胞中の R e g 受容体の C y 3 免疫蛍光染色を利用すると、R e g 受容体が免疫蛍光染色され、これは、細胞境界ではっきり定められ、細胞の細胞膜上の R e g 受容体の表面発現を示す ( 図 9 a )。図 9 b は、細胞が R e g に曝露される場合の、R e g 受容体染色における差異を実証する。

40

#### 【 0 0 7 5 】

図 1 0 は、前駆体を含有する管細胞を包むヒト島外分泌組織の細胞膜からの R e g 受容体の移動を評価するためにウエスタンブロット分析を利用する、確認のための研究を実証する。ウエスタンブロット分析は、細胞膜上の R e g 受容体の存在および P e r l e ペプチドの存在下における細胞膜から細胞質を通して核までの R e g 受容体の移動を同定した。細胞質抽出物は、1 0 m M H E P E S ( p H 8 . 0 )、1 m M E D T A、1 . 5 m M M g C l <sub>2</sub>、1 0 m M K C l、0 . 5 m M D T T、2 0 0 m M スクロース、お

50

よび 0.5% Nonidet P-40 中で得た。核抽出物は、20 mM HEPES (pH 7.9)、0.75 mM  $MgCl_2$ 、210 mM NaCl、50 mM KCl、1 mM EDTA、10% グリセロール、および 0.5 mM DTT 中で得た。両方の抽出バッファは、0.5 mM PMSF、 $1 \mu g/ml$  ロイペプチン、 $1 \mu g/ml$  アプロチニン、2.5 mM  $Na_4P_2O_7$ 、1 mM -グリセロリン酸、および 1 mM  $Na_3VO_4$  を含有した。Reg 受容体抽出物は、SDS-ポリアクリルアミドゲル上でサイズ分画し、ニトロセルロースに転写した。Tris 緩衝食塩水 (pH 7.4) 中 3% 乳中で遮断した後に、プロットを、4 で一晚、ウサギ抗ヒト Reg 受容体抗体および適切なホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体と連続してインキュベートした。二次シグナルは、化学発光基質により現像し、オートラジオグラフィーによって分析した。

10

#### 【0076】

画分および品質コントロールは、2つの抗体を有する画分を利用し、GAPDH は、細胞質ゾル分子であり、ラミン B は、核分子である。GAPDH およびラミン B の両方は、核および細胞質ゾル画分について優れたコントロールとして果たすことが本発明において実証された (図 10)。評価は、Perl e ペプチドおよび 14 アミノ酸 HIP ペプチドとの Reg 受容体の影響および相互作用を決定するために行った。

#### 【0077】

本発明は、図 10 において、8 アミノ酸 Perl e ペプチドが、短いおよび長い曝露時間の両方において細胞質から核への Reg 受容体の移動に対して最も大きな影響をもたらしたことを実証する。8 アミノ酸 Perl e ペプチドの影響は、14 アミノ酸 HIP ペプチドを含む試験した他のペプチドよりも大きかった。

20

#### 【0078】

図 11 ~ 13 は、Reg 受容体上の可能性として考えられる結合部位を刺激することによって、ベータ細胞形成の進行を亢進するための、Reg 受容体に対する刺激性抗体を開発するために行った研究からのものであった。阻害性抗体の産生のために、多くの配列を、外骨腫ファミリー (Exostoses family) の他のメンバーに含有されず、したがって、Reg 結合ドメインであると仮定される、Reg 受容体内の Reg ペプチドに対する結合ドメインであると考えられるアミノ酸領域である、Reg 受容体の N-末端部分 (アミノ酸 1 ~ 332) (配列番号 13) 内で評価した。

30

#### 【0079】

一貫して、酵素イムノアッセイにおいて、配列番号 13 内のペプチド配列から力価を決定する研究は、20 アミノ酸 Reg 受容体配列 (配列番号 9) (アミノ酸 117 ~ 136) に対して産生される非常に高度なポリクローナル抗体をもたらした。酵素イムノアッセイの結果を図 12 において概説する。図 13 は、Reg 受容体内のペプチド領域に対するポリクローナル抗体の開発のために使用した標準的なプロトコルを示す。

#### 【0080】

データセットは、0 日目および 21 日目の追加免疫 (boost) の後に採血から採取した。動物に配列番号 9 のペプチドを注射し、キーホールリンペットヘモシニアン (KLH) にコンジュゲートした。KLH ではなくもっぱらペプチドに対する応答を同定することができるよう、スクリーニング抗原は、KLH にコンジュゲートしない。50% 力価は、シグナルがピークおよびベースラインの間の中間にある希釈値であり、希釈値 (力価) が高いほど、抗原に対する応答は大きくなる。ポジティブコントロールは、ウサギにおいてオバルブミン抗体から生成された内部コントロールである。1:750, 000 の希釈で、吸光度は、0.45 ~ 0.9 の範囲内にあった。配列番号 9 に対する応答の場合には、高度な応答があった (図 11)。0 日目および 21 日目の追加免疫の 31 日後に採取した試験のための採血について、図 13 において示されるポリクローナル力価参照範囲によれば、CD 153 は、平均的な応答である 36, 000 の 50% 力価を示し、CD 154 は、高度な応答である 125, 000 の 50% 力価を示した。研究は、抗体が、Reg 受容体との Reg ペプチド相互作用に対して刺激性であり、前駆細胞を含むヒト島外

40

50

外分泌組織においてベータ細胞を生成することを実証する、R e g ペプチドの存在下および非存在下において生成される抗体の効能を評価するために進行中である。

#### 【0081】

図14は、本発明を示し、免疫寛容剤と併用して、P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはR e g 受容体に対する刺激性抗体P e r l e ペプチドを含む、ベータ細胞再生を刺激する作用物質を前記患者に投与するステップを含む方法によって、患者において新たに診断されたまたは先在する1型真性糖尿病を処置するための方法の例を提供する。ベータ細胞再生を刺激する作用物質は、P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはR e g 受容体に対する刺激性抗体を含むが、これらに限定されない。免疫寛容剤は、ビタミンDまたはコレカルシフェロールおよび1, 25ジヒドロキシビタミンDを含むが、これらに限定されないその誘導体と併用するシクロスポリン、熱ショックタンパク質60、D i a p e p 277、B C G ワクチンとしても知られており、かつ結核に対するワクチンとして一般に知られているカルメット-ゲラン桿菌またはカルメット-ゲランウシ型結核菌、ミコフェノール酸モフェチル、ダクリズマブ、リツキシマブ(抗C D 20)、h O K T 3 ガンマ1 (A l a - A l a) およびモノクローナル抗体T R X 4 (C h A g l y C D 3)を含む抗C D 3抗体、T細胞の同時刺激を阻害する選択的同時刺激修飾物質であるC T L A 4 - I g (アバタセプト)、キャンパス-1H、抗C D 5 2抗体、またはT細胞に対するヒト化モノクローナル抗体、ポリクローナル抗Tリンパ球グロブリン(A T G)、D i a P e p 277、組換えヒトグルタミン酸デカルボキシラーゼタンパク質の65kDaアイソフォームに基づくG A D抗体ワクチン(r h G A D 65)、ならびにジアゾキシド、アルファ-1抗トリプシンを含むが、これらに限定されない。

10

20

#### 【0082】

本発明は、新たに診断された1型患者、既存の1型糖尿病を有する患者、および成人潜在性自己免疫糖尿病を有する患者におけるベータ細胞の生成のための、P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはR e g 受容体に対する刺激性抗体の投与のための特定の方法論を提供する。方法は、それぞれの上記の免疫剤により様々な時間に起こる免疫最下点の日に、P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはR e g 受容体に対する刺激性抗体の開始を提供する。それぞれの作用物質に応じて変動する、この特定のタイミングに基づいて、P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはR e g 受容体に対する刺激性抗体によって生成された新たなベータ細胞を、より保護することができる。

30

#### 【0083】

図15は、P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはR e g 受容体に対する刺激性抗体などのようなベータ細胞アゴニストを利用して2型糖尿病を逆転させ、糖尿病前症の糖尿病への進行を妨げるための方法論を示す。本発明において同定されたP e r l e ペプチド、製剤、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびR e g 受容体上の結合領域に対する刺激抗体は、2型糖尿病および糖尿病前症を有する患者についての第一線の療法になるとと思われるまたはインスリンを含む既存の糖尿病薬レジメンに追加されるとと思われる。グルコースレベルに基づいて、インスリンを含む他の糖尿病薬は、次第に減らすことができる。

40

#### 【0084】

糖尿病および糖尿病前症を有する多くの患者は、現在、既存のベータ細胞機能およびグルコース代謝を改善し得る作用物質の併用を含んでもよい1つまたは複数の作用物質を受けている。P e r l e ペプチド、製剤、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびR e g 受容体上の結合領域に対する刺激抗体は、新たに発症したおよび既存の2型糖尿病ならびに糖尿病前症のための第一線の療法として使用されるであろう。P e r l e ペプチド、製剤、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびR e g 受容体上の結合領域に対する刺激抗体は、他の糖尿病治療薬に追加されてもよく、すべてのタイプのインスリン、グルカゴン様ペプチド-1 (G L P - 1) 受容体アナログ、リラグルチドおよ

50



びエクセナチド、ジペプチジルペプチダーゼ - 4 阻害剤 (DPP - 4 阻害剤) および (シタグリブチン、サクサグリブチン、リナグリブチン) を含む、アミリン、アナログ、プラムリンチド、アカルボース、オーリスタット、コレセベラム、プロモクリブチン、オーリスタット、ピグアナイド、メトホルミンとの併用療法、ならびにチアゾリジンジオン、スルホニル尿素、および DPP - 4 阻害剤ならびに新たな作用物質 SGLT2 阻害剤 (ダバグリフロジンおよびカナグリフロジン) との併用を含む。新たなベータ細胞を 2 型糖尿病を有する患者に提供する能力は、他の医薬品を次第に減らすことを可能にしてもよく、また、糖尿病前症の 2 型糖尿病への進行を妨げてよい。

#### 【0085】

図 16 は、管、腺房、および前駆体胚性組織を含むヒト島外組織、ヒト幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、膵膵幹細胞、または他の幹細胞を含んでいてもよく、また、Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびペプチド模倣薬として果たす Perle 受容体の特定の結合領域に対して生成された抗体の追加によってベータ細胞に形質転換するのが促進される成人膵臓内に存在する内因性幹細胞の常在性の集団を含んでいてもよい前駆細胞からの新たなベータ細胞のエキスピボ生成のために利用された場合の、Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびペプチド模倣薬として果たす Perle 受容体の特定の結合領域に対して生成された抗体によって生成された新たなベータ細胞の形成および送達のための方法を含む。新たなベータ細胞は、Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびペプチド模倣薬として果たす Perle 受容体の特定の結合領域に対して生成された抗体から、新たなベータ細胞への本明細書における本発明を使用するエキスピボ形質転換で生成される。新たなベータ細胞は、糖尿病前症、1 型および 2 型糖尿病、ならびにベータ細胞欠乏症の他の状態を有する患者に、器官特異的なターゲティングありおよびなしの、膵静脈、門脈系統、肝大動脈、皮下送達を介しての送達を含む経口、静脈内を含み、膵臓または肝臓への直接的な投与を含んでいてもよい送達のルートによりその後送達される (図 16)。

#### 【0086】

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびペプチド模倣薬として果たす Perle 受容体の特定の結合領域に対して生成された抗体は、次いで、管、腺房、および前駆体組織、胚性幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、膵膵幹細胞、または他の幹細胞を含み、新たなベータ細胞を形成するために成人の膵臓内に存在する内因性幹細胞の常在性の集団を含んでいてもよいヒト島外組織にエキスピボで投与される。新たなベータ細胞は、Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、および Perle 受容体の特定の結合領域に対して生成された抗体の、成人の膵臓内に存在する内因性幹細胞の常在性の集団を含み、新たなベータ細胞の形成を亢進してもよい、ヒト胚性幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、膵膵幹細胞、または他の幹細胞のエキスピボ培養物への送達によって生成される。次いで、これらのベータ細胞は、糖尿病前症、1 型および 2 型糖尿病、ならびにベータ細胞欠乏症の他の状態を有する患者に、器官特異的なターゲティングありおよびなしの、膵静脈、門脈系統、肝大動脈、皮下送達を介しての送達を含む経口、静脈内を含み、膵臓または肝臓への直接的な投与を含んでいてもよい送達のルートによりその後送達される。

#### 【0087】

本発明は、膵臓ベータ細胞生成のための方法を含み、インビボおよびエキスピボベータ細胞生成の両方ならびに新たに発症したおよびすでに存在している 1 型および 2 型糖尿病、成人潜在性自己免疫糖尿病 (LADA)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ - 65 抗体である陽性自己免疫抗体マーカーを有する人々、糖尿病前症ならびに高血糖症、グルコース不耐性およびベータ細胞機能障害または欠乏症、インスリン抵抗性の疾患、肥満、糖尿病の発達前の肥満、糖尿病前症に至る子供における肥満、小児期および青年期における 1 型および 2 型糖尿病の両方を含む関連する状態の疾患を有する人々を含むが、これらに限

定されない、1型糖尿病の危険性がある人々を処置するための方法を含み、多嚢胞性卵巣症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、高脂血症および高トリグリセリド血症、ならびに有効量のインスリンの欠乏に係るまたはそれを欠く他の状態などのような状態を含むが、これらに限定されない。

#### 【0088】

図17は、ベータ再生ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、ラット、マウス、ゴールデンハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、雌ウシ、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、ローランドゴリラ、白い房状の耳をしたマーモセット、ヨーロッパの家畜のフェレットを含む他の哺乳動物において見つけれられる配列と100%の相同性を有するPerleペプチド9アミノ酸ヒトRegの配列（配列番号1）の同定を示す。本発明は、GenBank、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) アルゴリズム、ならびにEuropean Bioinformatics Institute (EBI)、Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)、およびProtein Information Resource (PIR) のグループからなるUniProt Consortiumによって生成されたUniProtKBを評価した。この配列（配列番号1）および配列内のアミノ酸は、14アミノ酸ヒトReg 3a HIPペプチド内にも、15アミノ酸ハムスターReg 3ガンマペプチド、INGAP内にも含有されない。

10

20

#### 【0089】

図18は、ベータ再生ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、ラット、マウス、ゴールデンハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、雌ウシ、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、ローランドゴリラ、および白い房状の耳をしたマーモセットを含む他の哺乳動物において見つけれられる配列と100%の相同性を有するPerleペプチド8アミノ酸ヒトRegの配列（配列番号4）の同定を示す。本発明は、GenBank、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) アルゴリズム、ならびにEuropean Bioinformatics Institute (EBI)、Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)、およびProtein Information Resource (PIR) のグループからなるUniProt Consortiumによって生成されたUniProtKBを評価した。この配列（配列番号4）および配列内のアミノ酸は、14アミノ酸ヒトReg 3a HIPペプチド内にも、15アミノ酸ハムスターReg 3ガンマペプチド、INGAP内にも含有されない。

30

#### 【0090】

図19は、ベータ再生ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、ラット、マウス、ゴールデンハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、雌ウシ、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、ローランドゴリラ、およびヨーロッパの家畜のフェレットを含む他の哺乳動物において見つけれられる配列と100%の相同性を有するPerleペプチド8アミノ酸ヒトRegの配列（配列番号8）の同定を示す。本発明は、GenBank、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) アルゴリズム、ならびにEuropean Bioinformatics Institute (EBI)、Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)、およびProtein Information Resource (PIR) のグループからなるUniProt Consortiumによって生成されたUniProtKBを評価した。この配列（配列番号8）および配列内のアミノ酸は、14アミノ酸ヒトReg 3a HIPペプチド内にも、15アミノ酸ハムスターReg 3ガンマペプチド、INGAP内にも含有されない。

40

#### 【0091】

図20は、ベータ再生ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、ラット、マウス、ゴールデンハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、雌ウ

50

シ、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、ローランドゴリラ、白い房状の耳をしたマーモセット、ヨーロッパの家畜のフェレットを含む他の哺乳動物において見つけれられる配列と100%の相同性を有するPerleペプチド7アミノ酸ヒトRegの配列(配列番号7)の同定を示す。本発明は、GenBank、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)アルゴリズム、ならびにEuropean Bioinformatics Institute (EBI)、Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)、およびProtein Information Resource (PIR)のグループからなるUniProt Consortiumによって生成されたUniProtKBを評価した。この配列(配列番号7)および配列内のアミノ酸は、14アミノ酸ヒトReg3a HIPペプチド内にも、15アミノ酸ハムスターReg3ガンマペプチド、INGAP内にも含有されない。

10

#### 【0092】

図21は、ベータ再生ペプチドとして先行技術において記載されていない、チンパンジー、ラット、マウス、ゴールデンハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、雌ウシ、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、およびローランドゴリラを含む他の哺乳動物において見つけれられる配列と100%の相同性を有する9アミノ酸ヒトPerleペプチド(配列番号14)の同定を示す。

#### 【0093】

本発明は、GenBank、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)アルゴリズム、ならびにEuropean Bioinformatics Institute (EBI)、Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)、およびProtein Information Resource (PIR)のグループからなるUniProt Consortiumによって生成されたUniProtKBを評価した。この配列(配列番号14)および配列内のアミノ酸は、14アミノ酸ヒトReg3a HIPペプチド内にも、15アミノ酸ハムスターReg3ガンマペプチド、INGAP内にも含有されない。

20

#### 【0094】

図22は、チンパンジー、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、イヌ、雌ウシ、オボッサム、ガラゴ、ホオジロテナガザル、スマトラ島オランウータン、マカク、ローランドゴリラ、白い房状の耳をしたマーモセット、およびウマにおいて見つけれられるReg受容体配列と100%の相同性を有するヒトReg受容体内で同定された20アミノ酸ヒト配列(配列番号9)を示す。

30

#### 【0095】

Perleペプチド誘導体またはアナログ

特に、Perleペプチド誘導体は、機能的に等価な分子または改善された分子を提供する置換、挿入、または欠失によるPerleペプチド配列の改変を介して生成することができる。ヌクレオチドコード配列の縮重のために、Perleペプチドまたはそのアナログもしくはその誘導体と同じまたは実質的に類似するアミノ酸配列をコードする他のDNA配列は、本発明の実施において使用されてもよい。これらは、配列内の機能的に等価なアミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって改変され、したがって、サイレントな変化をもたらされるPerleペプチドのすべてまたは一部分を含む核酸配列を含むが、これらに限定されない。同様に、本発明のPerleペプチド誘導体は、一次アミノ酸配列として、機能的に等価なアミノ酸残基が配列内の残基と置換され、サイレントな変化をもたらされる改変された配列を含むPerleペプチドのアミノ酸配列のすべてまたは一部分を含むものを含むが、これらに限定されない。たとえば、配列内の1つ以上のアミノ酸残基は、機能的な等価物として作用し、サイレントな改変をもたらす、同様の極性の他のアミノ酸によって置換することができる。配列内のアミノ酸の置換は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択されてもよい。たとえば、無極性(疎水性)アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラ

40

50

ニン、トリプトファン、およびメチオニンを含む。極性中性アミノ酸は、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンを含む。正に荷電している（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リシン、およびヒスチジンを含む。負に荷電している（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。本発明の P e r l e ペプチド誘導体はまた、一次アミノ酸配列として、アミノ酸残基が類似する化学的特性を有する残基と置換される改変された配列を含む P e r l e ペプチドのアミノ酸配列のすべてまたは一部分を含有する。特定の実施形態において、1、2、3、4、または5アミノ酸が、置換される。

【0096】

P e r l e ペプチドの誘導体またはアナログは、P e r l e ペプチドもしくはその断片に実質的に相同であるまたはそのコード核酸が P e r l e ペプチド核酸配列にハイブリダイズすることができるタンパク質を含むが、これらに限定されない。

【0097】

特定の実施形態において、キメラタンパク質または融合タンパク質が、本発明の方法において使用されてもよい。本明細書において使用されるように、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非 P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体に適切に作用するように連結された P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体を含む。そのような融合タンパク質内で、P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体は、ある P e r l e ペプチドのすべてまたは一部分に一致し得る。一実施形態において、P e r l e ペプチド融合タンパク質が、P e r l e ペプチドの少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質内で、P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体および非 P e r l e ペプチドポリペプチドは、「適切に作用するように連結されている」、すなわち、それらは、互いにインフレームで融合されている。非 P e r l e ペプチドポリペプチドは、P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の N - 末端または C - 末端に融合することができる。たとえば、融合タンパク質は、その N - 末端に異種シグナル配列を含有する P e r l e ペプチドタンパク質であってもよい。ある宿主細胞（たとえば哺乳動物宿主細胞）において、P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の発現および/または分泌は、異種シグナル配列の使用を通して増加させることができる。他の実施例において、融合タンパク質が、P e r l e ペプチド配列が免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合されている P e r l e ペプチド - 免疫グロブリン融合タンパク質である。P e r l e ペプチド - 免疫グロブリン融合タンパク質は、医薬組成物に組み込み、本発明に従って免疫応答を阻害するために対象に投与することができる。

【0098】

本発明の方法において使用するための P e r l e ペプチド、そのアナログもしくは誘導体または P e r l e ペプチドキメラタンパク質もしくは融合タンパク質は、生物学的利用率を改善するならばに/または効能、溶解性、および安定性を増加させる目的で化学的に修飾されてもよい。たとえば、タンパク質は、アルブミン、トランスフェリン、またはポリエチレングリコール（P E G）に共有結合または非共有結合されてもよい。

【0099】

本発明の方法において使用するための P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体または P e r l e ペプチドキメラタンパク質もしくは融合タンパク質は、本発明の教示に従って標準的な組換え D N A 技術によって産生することができる。たとえば、異なるポリペプチド配列をコードする D N A 断片は、従来の技術に従って、たとえば、ライゲーションのために平滑末端または付着末端を用いること、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じた粘着末端の充填、望ましくない連結を回避するためのアルカリ性ホスファターゼ処置、および酵素ライゲーションによって、インフレームで互いにライゲーションされてもよい。さらに、融合遺伝子は、自動 D N A 合成装置を含む従来の技術によって合成することができる。その代わりに、遺伝子断片の P C R 増幅は、続いてアニールし、再増幅して、キメラ遺伝子配列を生成することができる連続する2つの遺伝子断

片の間に相補的なオーバーハングをもたらすアンカープライマーを使用して実行することができる[たとえばAusubel, et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, (1992)を参照されたい]。さらに、融合成分(たとえばGSTポリペプチド)を既にコードしている多くの発現ベクターが市販で入手可能である。Perleペプチドコード核酸は、融合成分をPerleペプチドにインフレームで連結するために、そのような発現ベクターの中にクローニングすることができる。融合タンパク質は、組換えPerleペプチドの精製および検出を助けるまたは対象における免疫応答をマスクするためにHisタグまたはエピトープタグ(たとえばV5)に融合されたPerleペプチドタンパク質とすることができる。Perleペプチドならびにそのアナログおよび誘導体の比較的短いアミノ酸配列は、同様に、これらの価値のあるペプチドの合成による産生を容易に実行可能にし、ペプチド合成のための様々な自動の機器は、市販で入手可能であり、自動化を必要としないペプチド合成のための合成方法は、長く知られており、本発明のPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体を調製するために本明細書における教示に従って使用することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0100】

いくつかの実施形態において、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体またはPerleペプチドキメラもしくは融合タンパク質は、それが、当技術分野において知られている任意の方法を使用して、インビボにおいて長い半減期を有するように修飾することができる。たとえば、ヒトIgGのFc断片または高分子量ポリエチレングリコール(PEG)などのような不活性ポリマー分子は、タンパク質のN-もしくはC-末端へのPEGの部位特異的なコンジュゲーションを通してまたはリシン残基上に存在するイプシロンアミノ基を介して、多機能性リンカーありまたはなしで、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体に付加することができる。生物学的活性の最小限の損失をもたらす直鎖または分岐ポリマー誘導体化が、使用されるであろう。コンジュゲーションの程度は、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体へのPEG分子の適切なコンジュゲーションを確かめるためにSDS-PAGEおよび質量分析法によって厳密にモニターすることができる。反応していないPEGは、サイズ排除によってまたはイオン交換クロマトグラフィーによってPerleペプチド-PEGコンジュゲートから分離することができる。PEG誘導体化コンジュゲートは、当業者らに知られている方法を使用してインビボ効能について試験することができる。

#### 【0101】

誘導体およびアナログは、完全長または完全長以外のものであってもよい。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログは、様々な実施形態において、当技術分野において知られているコンピューター相同性プログラムによってアライメントが行われるアライメントされた配列と比較した場合に、同一のサイズの核酸もしくはアミノ酸配列にわたって少なくとも約70%、80%、もしくは95%の同一性によって(80~95%の好ましい同一性で)、本発明の核酸もしくはタンパク質に実質的に相同であるまたはコード核酸がストリンジェント、中程度にストリンジェント、低ストリンジェント条件下でタンパク質をコードする配列の相補体(complement)にハイブリダイズすることができる領域を含む分子を含むが、これらに限定されない。たとえばAusubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1993および下記を参照されたい。

#### 【0102】

Perleペプチドおよびそのアナログまたは誘導体に対する抗体

様々な実施形態において、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体に対して特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の量を測定するためにイムノアッセイにおいて使用することができるまたはPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体のイムノアフィ

ニティー精製において使用することができる。Hopp & Woodsの親水性分析 (Hopp & Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78: 3824-3828 (1981)) を参照されたいは、タンパク質の親水性領域を同定するおよびPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の可能性として考えられるエピトープを同定するために使用することができる。

【0103】

Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体に免疫特異的に結合する抗体は、抗体の合成のための当技術分野において知られている任意の方法によって、特に化学合成によってまたは好ましくは組換え発現技術によって、産生することができる(たとえば、その全体が本明細書において組み込まれる米国特許出願公開第2005/0084449号明細書を参照されたい)。

10

【0104】

Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体に対して免疫特異的なポリクローナル抗体は、当技術分野においてよく知られている様々な手順によって産生することができる。たとえば、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体は、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体に対して特異的なポリクローナル抗体を含有する血清の産生を誘発するために、ウサギ、マウス、およびラットを含むが、これらに限定されない様々な宿主動物に投与することができる。様々なアジュバントは、宿主種に依存して、免疫応答を増加させるために使用されてもよく、フロインド(完全および不完全)、水酸化アルミニウムなどのようなミネラルゲル、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノールなどのような表面活性物質、ならびにBCG(カルメット-ゲランウシ型結核菌)およびコリネバクテリウム パルバム(*Corynebacterium parvum*)などのような可能性として有用なヒトアジュバントを含むが、これらに限定されない。そのようなアジュバントもまた、当技術分野においてよく知られている。

20

【0105】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え体、およびファージディスプレイ技術の使用またはその併用を含む、当技術分野において知られている種々様々の技術を使用して調製することができる。たとえば、モノクローナル抗体は、当技術分野において知られており、たとえばHarlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); およびHammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)において教示されるものを含む、ハイブリドーマ技術を使用して産生することができる。本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術を通して産生される抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」は、抗体が産生される方法ではなく、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む単一のクローンに由来する抗体を指す。

30

【0106】

ハイブリドーマ技術を使用して特異的な抗体を産生し、かつスクリーニングするための方法は、当技術分野においてルーチン的であり、よく知られている。手短かに言えば、マウスは、非マウス抗原により免疫化することができ、一旦、免疫応答が検出されたら、たとえば、抗原に対して特異的な抗体が、マウス血清において検出されたら、マウス脾臓が、収集され、脾細胞が、単離される。次いで、脾細胞は、任意の適した骨髓腫細胞、たとえば、ATCCから入手可能な細胞系SP2由来の細胞に、よく知られている技術によって融合される。ハイブリドーマは、限界希釈(*limited dilution*)によって選択され、クローニングされる。次いで、ハイブリドーマクローンは、本発明のポリペプチドに結合することができる抗体を分泌する細胞について、当技術分野において知られている方法によってアッセイされる。一般に高レベルの抗体を含有する腹水は、陽性

40

50

ハイブリドーマクローンによりマウスを免疫化することによって生成することができる。

【0107】

本発明は、モノクローナル抗体ならびに本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養するステップであって、好ましくは、ハイブリドーマが、骨髄腫細胞との、非マウス抗原により免疫化されたマウスから単離された脾細胞の融合によって生成されるステップ、および次いで、抗原に結合することができる抗体を分泌するハイブリドーマクローンに対する融合から結果として生じるハイブリドーマをスクリーニングするステップを含む方法によって産生された抗体を生成するための方法を提供する。

【0108】

特異的な特定のエピトープを認識する抗体断片は、当業者らに知られている任意の技術によって生成されてもよい。たとえば、本発明のFabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片は、パイン(Fab断片を産生するため)またはペプシン(F(ab')<sub>2</sub>断片を産生するため)などのような酵素を使用する免疫グロブリン分子のタンパク質切断によって産生されてもよい。F(ab')<sub>2</sub>断片は、可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のCH1ドメインを含有する。さらに、本発明の抗体はまた、当技術分野において知られている様々なファージディスプレイ方法を使用して生成することもできる。

【0109】

ファージディスプレイ方法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を持つファージ粒子の表面にディスプレイされる。特に、VHおよびVLドメインをコードするDNA配列は、動物cDNAライブラリー(たとえば病気に冒された組織のヒトまたはマウスcDNAライブラリー)から増幅される。VHおよびVLドメインをコードするDNAは、PCRによってscFvリンカーにより互いに再結合され、ファージミドベクターの中にクローニングされる。ベクターは、大腸菌(E. coli)中に電気穿孔し、大腸菌(E. coli)をヘルパーファージに感染させる。これらの方法において使用されるファージは、典型的に、fdおよびM13を含む線状ファージであり、VHおよびVLドメインは、普通、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIに組換えで融合される。特定の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、たとえば、標識された抗原または固体表面もしくはビーズに結合したもしくは捕捉された抗原を使用して、抗原により選択するまたは同定することができる。本発明の抗体を生成するために使用することができるファージディスプレイ方法の例は、Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182: 41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184: 177-186; Kettlborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24: 952-958; Persic et al., 1997, Gene 187: 9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57: 191-280; 国際公開第PCT/GB91/O1134号パンフレット; 国際公開第90/02809号パンフレット; 国際公開第91/10737号パンフレット; 国際公開第92/01047号パンフレット; 国際公開第92/18619号パンフレット; 国際公開第93/11236号パンフレット; 国際公開第95/15982号パンフレット; 国際公開第95/20401号パンフレット; および国際公開第97/13844号パンフレット; ならびに米国特許第5,698,426号明細書; 米国特許第5,223,409号明細書; 米国特許第5,403,484号明細書; 米国特許第5,580,717号明細書; 米国特許第5,427,908号明細書; 米国特許第5,750,753号明細書; 米国特許第5,821,047号明細書; 米国特許第5,571,698号明細書; 米国特許第5,427,908号明細書; 米国特許第5,516,637号明細書; 米国特許第5,780,225号明細書; 米国特許第5,658,727号明細書; 米国特許第5,733,743号明細書; および米国特許第5,969,108号明細書において開示されるものを含む。

【0110】

上記の参考文献において記載されるように、ファージ選択の後に、ファージ由来の抗体

10

20

30

40

50

コード領域は、単離し、抗体全体または任意の他の所望の抗原結合断片を生成するために使用し、たとえば下記に記載されるように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む任意の所望の宿主において発現させることができる。組換えでFab、Fab'、およびF(ab')<sub>2</sub>断片を産生するための技術もまた、国際公開第92/22324号パンフレット；Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12(6): 864-869；Sawai et al., 1995, AJRI 34: 26-34；およびBetter et al., 1988, Science 240: 1041-1043において開示されるものなどのような当技術分野において知られている方法を使用して用いることができる。

#### 【0111】

抗体全体を生成するために、VHまたはVLヌクレオチド配列を含むPCRプライマー、制限部位、および制限部位を保護するためのフランキング配列は、scFvクローンにおいてVHまたはVL配列を増幅するために使用することができる。当業者らに知られているクローニング技術を利用して、PCR増幅VHドメインは、VH定常領域、たとえばヒトガンマ4定常領域を発現するベクターの中にクローニングすることができ、PCR増幅VLドメインは、VL定常領域、たとえばヒトカッパまたはラムダ定常領域を発現するベクターの中にクローニングすることができる。好ましくは、VHまたはVLドメインを発現するためのベクターは、EF-1プロモーター、分泌シグナル、可変ドメイン、定常ドメイン、およびネオマイシンなどのような選択マーカーについてのクローニング部位を含む。VHおよびVLドメインはまた、必要な定常領域を発現する1つのベクターの中にクローニングされてもよい。次いで、重鎖変換ベクターおよび軽鎖変換ベクターは、当業者らに知られている技術を使用して、完全長抗体、IgGを発現する安定したまたは一時的な細胞系を生成するために、細胞系の中に同時形質移入される。

#### 【0112】

ヒトにおける抗体のインビボにおける使用およびインビトロ検出アッセイを含むいくつかの使用のために、ヒト化抗体またはキメラ抗体を使用することはより好ましくてもよい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用して、上記に記載されるファージディスプレイ方法を含む当技術分野において知られている様々な方法によって生成することができる。米国特許第4,444,887号明細書および米国特許第4,716,111号明細書；ならびに国際公開第98/46645号パンフレット、国際公開第98/50433号パンフレット、国際公開第98/24893号パンフレット、国際公開第98/16654号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレット、国際公開第96/33735号パンフレット、および国際公開第91/10741号パンフレットもまた、参照されたい。

#### 【0113】

キメラ抗体は、抗体の様々な部分が様々な免疫グロブリン分子に由来する分子である。キメラ抗体を産生するための方法は、当技術分野において知られている。たとえばMorison, 1985, Science 229: 1202；Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214；Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125: 191-202；ならびに米国特許第5,807,715号明細書；米国特許第4,816,567号明細書；米国特許第4,816,397号明細書；および米国特許第6,311,415号明細書を参照されたい。

#### 【0114】

ヒト化抗体は、所定の抗原に結合することができ、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域および非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するCDRを含む抗体またはその変異体もしくはその断片である。ヒト化抗体は、すべてのまたは実質的にすべてのCDR領域が非ヒト免疫グロブリン（つまりドナー抗体）のものに一致し、すべてのまたは実質的にすべてのフレームワーク領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、実質的にすべての、少なくとも1つの、典型的に



2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fv)を含む。好ましくは、ヒト化抗体はまた、典型的にヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも1つの部分を含む。通常、抗体は、軽鎖および重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含むであろう。抗体はまた、CH1、ヒンジ、重鎖のCH2、CH3、およびCH4領域を含んでいてもよい。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、およびIgEを含む任意のクラスの免疫グロブリンならびにIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含む任意のアイソタイプから選択することができる。普通、定常ドメインは、補体固定定常ドメインであり、ヒト化抗体が細胞毒活性を示すことが所望される場合、クラスは典型的にIgG1である。そのような細胞毒活性が望ましくない場合、定常ドメインは、IgG2クラスであってもよい。ヒト化抗体は、2つ以上のクラスまたはアイソトープ由来の配列を含んでいてもよく、所望のエフェクター機能を最適化するために特定の定常ドメインを選択することは、当業者の技能の範囲内にある。ヒト化抗体のフレームワーク領域およびCDR領域は、親の配列に正確に一致する必要はない、たとえば、ドナーCDRまたはコンセンサスフレームワークは、その部位のCDR残基またはフレームワーク残基がコンセンサスにもインポート抗体にも一致しないように、少なくとも1つの残基の置換、挿入、または欠失によって突然変異誘発されてもよい。しかしながら、そのような突然変異は、広範囲とならないであろう。普通、少なくとも75%、より多くの場合90%、最も好ましくは95%以上のヒト化抗体残基は、親のフレームワーク領域(FR)およびCDR配列に一致するであろう。ヒト化抗体は、CDR移植(欧州特許第239,400号明細書;国際公開第91/09967号パンフレット;ならびに米国特許第5,225,539号明細書;米国特許第5,530,101号明細書;および米国特許第5,585,089号明細書)、ベニヤリング(veneer ing)またはリサーフェシング(resurfacing)(欧州特許第592,106号明細書および欧州特許第519,596号明細書;Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(415):489-498;Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814;およびRoguska et al., 1994, PNAS 91:969-973)、鎖シャッフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号明細書)、ならびにたとえば米国特許第6,407,213号明細書;米国特許第5,766,886号明細書;国際公開第93/17105号パンフレット;Tan et al., J. Immunol. 169:1119-25(2002);Caldas et al., Protein Eng. 13(5):353-60(2000);Morea et al., Methods 20(3):267-79(2000);Baca et al., J. Biol. Chem. 272(16):10678-84(1997);Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904(1996);Couto et al., Cancer Res. 55(23 Supp):5973s-5977s(1995);Couto et al., Cancer Res. 55(8):1717-22(1995);Sandhu J S, Gene 150(2):409-10(1994);およびPedersen et al., J. Mol. Biol. 235(3):959-73(1994)において開示される技術を含むが、これらに限定されない、当技術分野において知られている様々な技術を使用して産生することができる。多くの場合、フレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を改変する、好ましくは改善するために、CDRドナー抗体由来の対応する残基と置換されるであろう。これらのフレームワーク置換は、当技術分野においてよく知られている方法によって、たとえば、抗原結合にとって重要なフレームワーク残基を同定するためのCDR残基およびフレームワーク残基の相互作用のモデリングならびに特定の位置の普通でないフレームワーク残基を同定するための配列比較によって、同定される(たとえばQueen et al., 米国特許第5,585,089号明細書;およびRiechmann et al., 1988, Nature 332:323を参照されたい)。

10

20

30

40

50

## 【0115】

Perle ペプチドおよびそのアナログまたは誘導体を調製するための方法

当技術分野において知られている任意の技術は、Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体を精製するのに使用することができ、沈殿による分離、吸着による分離（たとえばカラムクロマトグラフィー、膜吸着剤、放射状フローカラム（radial flow column）、バッチ吸着、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、無機吸着剤、疎水性吸着剤、固定金属アフィニティークロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）、または溶液中での分離（たとえばゲルろ過、電気泳動、液相分割、洗剤分割、有機溶媒抽出、および限外ろ過）を含むが、これらに限定されない。たとえば *Scopes, PROTEIN PURIFICATION, PRINCIPLES AND PRACTICE, 3rd ed., Springer (1994)* を参照されたい。精製の間に、Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の生物学的活性は、1つまたは複数のインビトロまたはインビボアッセイによってモニターされてもよい。Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の純度は、これに限定されないがゲル電気泳動などのような、当技術分野において知られている任意の方法によってアッセイすることができる。*Scopes*、前掲を参照されたい。いくつかの実施形態では、本発明の組成物中に用いられるPerle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体は、総タンパク質mgの80~100パーセントまたは総タンパク質mgの少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも98%の範囲とすることができる。一実施形態において、本発明の組成物中に用いられるPerle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体が、総タンパク質量の少なくとも99%である。他の実施形態において、Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体が、たとえばドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動によってアッセイされるように、見かけ上均質になるまで精製される。

10

20

## 【0116】

当技術分野において知られている方法は、Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体を組換えで産生するために利用することができる。Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体をコードする核酸配列は、宿主細胞における増殖および発現のために発現ベクターの中に挿入することができる。

30

## 【0117】

本明細書において使用される発現構築物は、その適切な宿主細胞におけるPerle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の発現を可能にする1つまたは複数の調節領域に作動可能に関連した、Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体をコードする核酸配列を指す。「作動可能に関連した」は、調節領域および発現されることになっているPerle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体が、転写、最終的に翻訳を可能にするような方法でつながれ、位置しているという関連性を指す。

40

## 【0118】

Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の転写に必要な調節領域は、発現ベクターによって提供することができる。翻訳開始コドン（ATG）もまた、その関連する開始コドンを欠く、Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の遺伝子配列が、発現されることになっている場合、提供されてもよい。適合性の宿主構築物系において、RNAポリメラーゼなどのような細胞転写因子は、宿主生物におけるPerle ペプチド配列の転写を達成するために、発現構築物上の調節領域に結合するであろう。遺伝子発現のために必要とされる調節領域の厳密な性質は、宿主細胞によって変動してもよい。一般に、RNAポリメラーゼに結合し、作動可能に関連する核酸配列の転写を促進することができるプロモーターが、必要とされる。そのような調節領域は、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列、およびその他同種のものなどのような、転写および翻訳の開始に関連する5'非コード配列を含んでいてもよい。コード配列に対して3'にある非コード領域は、ターミネーターおよびポリアデニル化部位などのような転写終結調節配列を含有してもよい。

50

## 【0119】

プロモーターなどのような調節機能を有するDNA配列をPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体遺伝子配列に付加するまたはPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体遺伝子配列をベクターのクローニング部位の中に挿入するために、適切な適合性の制限部位を提供するリンカーまたはアダプターが、当技術分野においてよく知られている技術によってcDNAの末端部にライゲーションされてもよい(たとえばWu et al., 1987, Methods in Enzymol, 152:343-349を参照されたい)。制限酵素による切断の後に、ライゲーションの前に一本鎖DNA末端を消化するまたは充填することによって平滑末端を作るための修飾を続けることができる。その代わりに、所望の制限酵素部位は、所望の制限酵素部位を含有するプライマーによるPCRを使用するDNAの増幅によってDNAの断片の中に導入することができる。

10

## 【0120】

調節領域に作動可能に関連したPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体配列を含む発現構築物は、さらなるクローニングを伴うことなく、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の発現および生成のための適切な宿主細胞の中に直接導入することができる。たとえば米国特許第5,580,859号明細書を参照されたい。発現構築物はまた、たとえば相同組換えを介しての宿主細胞のゲノムの中へのPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体配列の統合を容易にするDNA配列を含有することができる。この場合、宿主細胞においてPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体を増殖させ、発現するために適切な宿主細胞に適した複製開始点を含む発現ベクターを用いることは必要ではない。

20

## 【0121】

様々な発現ベクターが、使用されてもよく、プラスミド、コスミド、ファージ、ファージミド、または修飾ウイルスを含むが、これらに限定されない。そのような宿主-発現系は、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体遺伝子のコード配列が産生され、続いて精製されてもよいビヒクルを示すだけでなく、適切なヌクレオチドコード配列により形質転換されたまたはトランスフェクトされた場合に、インサイツにおいてPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体を発現する細胞をも示す。これらは、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体コード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌(たとえば大腸菌(E. coli)および枯草菌(B. subtilis))などのような微生物; Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体コード配列を含有する組換え発現ベクターにより形質転換された酵母(たとえばサッカロミセス、ピキア); Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(たとえばバキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系; Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(たとえばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)により感染させたもしくは組換えプラスミド発現ベクター(たとえばTiプラスミド)により形質転換した植物細胞系; または哺乳動物細胞のゲノム(たとえばメタロチオネインプロモーター)もしくは哺乳動物ウイルス(たとえばアデノウイルス後期プロモーター; ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)に由来するプロモーターを含有する組換え発現構築物を内部に持つ哺乳動物細胞系(たとえばCOS、CHO、BHK、293、NS0、および3T3細胞)を含むが、これらに限定されない。好ましくは、大腸菌(Escherichia coli)などのような細菌細胞および真核細胞は、組換えPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の発現のために使用される。たとえば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)などのような哺乳動物細胞は、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体配列の有効な発現のために、サイトメガロウイルスの主要中間初期遺伝子(major intermediate early gene)由来のプロモーターエレメントを持つベクターと共に使用するこ

30

40

50

とができる (Foeccking et al., 1986, Gene 45:101; および Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2)。

#### 【0122】

細菌系において、多くの発現ベクターは、発現されている Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体について意図される使用に依存して、好都合に選択されてもよい。たとえば、Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の医薬組成物の生成のために、大量の Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体が産生されることになっている場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を指示するベクターが望ましくてもよい。ベクターは、大腸菌 (E. coli) 発現ベクター pC 10  
R2.1 TOPO (Invitrogen); pIN ベクター (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509)、およびその他同種のものを含むが、これらに限定されない。pFLAG (Sigma)、pMAL (NEB)、および pET (Novagen) のような一連のベクターもまた、FLAG ペプチド、malE -、または CBD - タンパク 20  
質との融合タンパク質として外来タンパク質を発現するために使用されてもよい。これらの組換えタンパク質は、正確なフォールディングおよび成熟のために細胞膜周辺腔の中に向けられてもよい。融合部分は、発現されたタンパク質のアフィニティー精製のために使用することができる。エンテロキナーゼのような特異的なプロテアーゼについての切断部 20  
位の存在は、Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体を切断することを可能にする。pGEX ベクターもまた、グルタチオン S - トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として外来タンパク質を発現するために使用されてもよい。一般に、そのような融合タンパク質は、可溶性であり、マトリックスグルタチオンアガロースビーズへの吸着および結合、その後続く遊離グルタチオンの存在下における溶出によって、溶解した細胞から容易に精製することができる。pGEX ベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物を GST 成分から放出させることができるように、トロンピンまたは第 X 30  
a 因子のプロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

#### 【0123】

昆虫系において、外来遺伝子を発現する多くのベクターを使用することができる、たとえば、アウトグラフィ カリフォルニア (Autographa californica) 核多角体病ウイルス (AcNPV) は、外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用することができる。ウイルスは、ヨトウガ (Spodoptera frugiperda) 細胞のような細胞において成長する。Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体コード配列は、ウイルスの非本質的な領域 (たとえばポリヘドリン遺伝子) の中に個々にクローニングされ、AcNPV プロモーター (たとえばポリヘドリンプロモーター) のコントロール下に配置されてもよい。 30

#### 【0124】

哺乳動物宿主細胞において、多くのウイルスベースの発現系が、利用されてもよい。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、興味のある Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体コード配列は、アデノウイルス転写 / 翻訳コントロール複合体、たとえば後期プロモーターおよび三連リーダー配列 (tripartite leader sequence) にライゲーションされてもよい。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロにおけるまたはインビボにおける組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入されてもよい。ウイルスゲノムの非本質的な領域 (たとえば領域 E1 または E3) における挿入は、生存可能であるが、侵襲性ではなく、感染した宿主において Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体を発現することができる組換えウイルスをもたらすであろう (たとえば Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 を参照されたい)。特異的な開始 40  
シグナルもまた、挿入された Perle ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体コー 50

ド配列の効率的な翻訳のために必要とされてもよい。これらのシグナルは、A T G 開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに、全挿入物の翻訳を確実にするために、開始コドンは、所望のコード配列のリーディングフレームとインフェーズ ( i n - p h a s e ) でなければならない。これらの外因性の翻訳コントロールシグナルおよび開始コドンは、天然および合成の、様々な起源のものとすることができる。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントまたは転写ターミネーター、およびその他同種ものの包含によって増強されてもよい (たとえば B i t t n e r e t a l . , 1987, Methods in Enzymol. 153: 51 - 544 を参照されたい)。

#### 【0125】

そのうえ、挿入された配列の発現を調整するまたは所望される特定の様式において遺伝子産物を修飾し、プロセッシングする宿主細胞株が、選ばれてもよい。タンパク質産物のそのような修飾 (たとえばグリコシル化) およびプロセッシング (たとえば切断) は、タンパク質の機能にとって重要となり得る。様々な宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特有な特定のメカニズムを有する。適切な細胞株または宿主系は、発現される外来タンパク質の適正な修飾およびプロセッシングを確実にするように選ぶことができる。この目的のために、一次転写産物の適切なプロセッシングならびに遺伝子産物の翻訳後修飾、たとえば遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を持つ真核生物の宿主細胞が、使用されてもよい。そのような哺乳動物宿主細胞は、P C 1 2、C H O、V E R Y、B H K、H e L a、C O S、M D C K、293、313、W 138、B T 483、H s 578 T、H T B 2、B T 2 O および T 47 D、N S 0 (いかなる免疫グロブリン鎖をも内因的に産生しないマウス骨髄腫細胞系)、C R L 7 O 3 O、ならびに H s S 78 B s t 細胞を含むが、これらに限定されない。翻訳後修飾が、P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の所望の活性にとって非本質的であることが分かった場合、細菌または酵母系における発現を使用することができる。

#### 【0126】

適切に処理された P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の長期高収率産生のために、細胞における安定した発現が好ましい。P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体を安定して発現する細胞系は、選択可能マーカーを含有するベクターを使用することによって遺伝子操作されてもよい。限定ではなく例として、発現構築物の導入の後に、遺伝子操作された細胞は、1 ~ 2 日間、濃縮培地において成長させてもよく、次いで、選択培地に切り替えられる。発現構築物における選択可能マーカーは、選択に対する抵抗性を付与し、用いられるベクター構築物および宿主細胞に依存して、細胞がそれらの染色体の中に安定して発現構築物を統合し、培養中に成長し、増えて細胞系になるのを可能にしてもよい。P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体が継続的に発現されている間に、そのような細胞は長期間、培養することができる。

#### 【0127】

抗生物質抵抗性 (ジェネティシンまたは G - 418 に対する抵抗性を付与する N e o (W u a n d W u , 1991, Biotherapy 3: 87 - 95; T o l s t o s h e v , 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573 - 596; M u l l i g a n , 1993, Science 260: 926 - 932; および M o r g a n a n d A n d e r s o n , 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191 - 217; M a y , 1993, T I B T E C H 11 (5): 155 - 215); Z e o c i n に対する抵抗性のための Z e o; およびブラストサイジンに対する抵抗性のための B s d のようなマーカー); 代謝拮抗物質抵抗性 (メトトレキサートに対する抵抗性を付与する D h f r、W i g l e r e t a l . , 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; and O' H a r e e t a l . , 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); ミコフェノール酸に対する抵抗性を付与する g p t; (M u l l i g a n & B e r g , 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); およびヒグロマイシンに対する抵抗性を付与する h y g r o (S a n t e r r e e t a l .

、1984、Gene 30:147)のようなマーカーを含むが、これらに限定されない多くの選択系が、使用されてもよい。そのうえ、tk-、hgprt-、またはaprt-細胞を含むが、これらに限定されない突然変異細胞系は、チミジンキナーゼ、ヒポキサンチン、グアニン-、またはアデニンホスホリボシル-トランスフェラーゼについての対応する遺伝子を持つベクターと組み合わせて使用することができる。組換えDNA技術の技術分野において一般に知られている方法は、所望の組換えクローンを選択するために慣例的に適用されてもよく、そのような方法は、たとえばAusubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegl er, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds.), of Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); および Colberre-Garap in et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1において記載される。

10

20

30

40

50

#### 【0128】

組換え細胞は、温度、インキュベーション時間、光学濃度、および培地組成についての標準的な条件下で培養されてもよい。しかしながら、組換え細胞の増殖についての条件は、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体についての発現と異なってもよい。修飾された培養条件および培地もまた、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の産生を増強するために使用されてもよい。当技術分野において知られている任意の技術は、Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体を産生するための最適条件を確立するために適用されてもよい。

#### 【0129】

天然源から組換え技術または精製によってPerleペプチドまたはその断片を産生する代替手段は、ペプチド合成である。たとえばPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体全体またはPerleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の一部分に対応するタンパク質は、ペプチドシン合成装置の使用によって合成することができる。従来のペプチド合成または当技術分野においてよく知られている他の合成プロトコールが、使用されてもよい。

#### 【0130】

Perleペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体またはその一部分のアミノ酸配列を有するタンパク質は、Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85:2149によって記載されるものに類似する手順を使用する固相ペプチド合成によって合成されてもよい。合成の間に、保護された側鎖を有するN-保護アミノ酸は、そのC-末端によって、不溶性ポリマー支持体、つまりポリスチレンビーズに連結された、成長しているポリペプチド鎖に段階的に追加される。タンパク質は、ジシクロヘキシルカルボジイミドなどのような試薬とN-保護アミノ酸を反応させることによって活性化されたN-保護アミノ酸のカルボキシル基にN-脱保護アミノ酸のアミノ基を連結することによって合成される。活性化されたカルボキシルへの遊離アミノ基の付加は、ペプチド結合形成に至る。最も一般に使用されるN-保護基は、酸に不安定であるBocおよび塩基に不安定であるFmocを含む。適切な化学的性質、樹脂、保護基、保護されたアミノ酸、および試薬についての詳細は、当技術分野においてよく知られている。したがって、本明細書において詳細に議論されない(Atherton et al., 1989, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, and Bodanszky, 1993, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2nd Ed., Springer-Verlagを参照されたい)。

## 【 0 1 3 1 】

結果として生じる P e r l e ペプチドまたはそのアナログもしくは誘導体の精製は、ゲル浸透を使用する調製用の H P L C、分割、および / またはイオン交換クロマトグラフィーなどのような従来の手順を使用して達成される。適切なマトリックスおよびバッファの選択は、当技術分野においてよく知られており、したがって、本明細書において詳細に記載されない。

## 【 0 1 3 2 】

本発明の試薬および方法の前述の詳細な説明と共に、以下の実施例は、本発明の様々な態様を例証するために提供される。

## 【 実施例 】

## 【 0 1 3 3 】

本発明は、ヒト R e g 1 a、R e g 1 b、R e g 3 a、および R e g 4 タンパク質の結合アーム内に見つけられる「P e r l e ペプチド」として知られている相同なペプチド配列を同定し、ベータ再生作用物質としてのそれらの役割を評価する。P e r l e ペプチドのどれも、以前に記載されたヒト 1 4 アミノ酸 R e g 3 a H I P ペプチド内にも、ハムスター 1 5 アミノ酸 R e g 3 ガンマペプチド、I N G A P 内にも含有されない。9 1 9 アミノ酸 R e g 受容体内の 2 0 アミノ結合領域が発見され、これから刺激抗体が、R e g ペプチド模倣薬として果たすように生成された。

## 【 0 1 3 4 】

新たに発症したおよび既存の 1 型および 2 型糖尿病の逆転のためのならびに P e r l e ペプチドを利用する、糖尿病前症、インスリン抵抗性、インスリン欠乏症、ベータ細胞欠乏症、または異常なグルコース代謝を有する人々の決定的な処置のための特定の方法論ならびに以下について評価するために設計された研究が含まれる：

1 . P e r l e ペプチドは、ヒト 1 4 アミノ酸 R e g 3 a ペプチド、H I P と比較した場合、R e g 受容体と相互作用し得るまたは直接結合し得るのかどうか。

2 . R e g 受容体上の結合領域を同定することができ、R e g のペプチド模倣薬として果たすことができる、この領域に対する刺激性抗体を生成することができるかどうか；ならびに

3 . P e r l e ペプチドは、下流のシグナル伝達および細胞膜から核への R e g 受容体の輸送を刺激するかどうか

4 . 以前に記載されていない方法論による新たなベータ細胞の生成の亢進および維持のために、製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態を含む P e r l e ペプチドを利用して、新たに発症したおよび既存の 1 型糖尿病および成人潜在性自己免疫糖尿病を逆転させるための方法。これらの方法は、1 つまたは複数の免疫調節剤が糖尿病を有する患者に与えられる免疫最下点の日に特に開始される、ベータ細胞の生成の亢進のための、製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態を含む P e r l e ペプチドまたは他のベータ細胞刺激剤の使用を含む。免疫最下点の日は、免疫調節剤によって変動する。また、新たなベータ細胞が生成されるにつれてインスリンを次第に減らす方法と共に、ベータ細胞の生成の亢進のための製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態を含む P e r l e ペプチドの開始の前に 1 型糖尿病を有する患者において血糖の環境を最適化するための特定の方法が、提供される。

5 . 新たに発症したおよび既存の 2 型糖尿病、糖尿病前症、インスリン抵抗性、インスリン欠乏症、ベータ細胞欠乏症、および / または異常なグルコース代謝の状態を逆転させるための方法。これらの方法は、ベータ細胞の生成の亢進のための、製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態を含む P e r l e ペプチドの使用を含み、新たなベータ細胞が生成されるにつれてインスリンを含む経口および皮下糖尿病治療薬を次第に減らす方法と共に、ベータ細胞の生成の亢進のための製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態を含む P e r l e ペプチドの開始の前に新たなおよび既存の 2 型糖尿病を有する患者に

10

20

30

40

50

において血糖の環境を最適化するための特定の方法が、提供される。

6. 膵臓または肝臓への直接的な投与を含んでいてもよい器官特異的なターゲティングありおよびなしの臍静脈、門脈系統、肝動脈、皮下送達を介して、糖尿病およびインスリン欠乏症の他の状態を有する患者にその後送達される管、腺房細胞、および前駆細胞、ヒト胚性幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、膵臓幹細胞、または他の幹細胞を含み、成人の膵臓内に存在する内因性幹細胞の常在性の集団を含んでいてもよいヒト島外組織のエキスポ形質転換によって、ベータ細胞の生成の亢進のための、製剤、誘導体、ペプチド模倣薬および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含む最適化された形態を含む P e r l e ペプチドを使用して、新たに発症したおよび既存の 1 型および 2 型糖尿病、糖尿病前症、インスリン抵抗性、インスリン欠乏症、ベータ細胞欠乏症、および / または異常なグルコース代謝の状態を逆転させるための方法。

10

#### 【0135】

##### 実施例 1

##### R e g 受容体への P e r l e ペプチドの結合の決定

R e g ペプチドは、新たなベータ細胞の発達において律速となることが先行技術において示された。ヒト R e g 1 a、R e g 1 b、R e g 3 a、および R e g 4 タンパク質内のアミノ酸の構造および 3 次元アライメント、フォールディング、ならびに特性に基づいて、右の突出部 (図 3 において囲まれる) 中に存在する共通のペプチド配列が同定された。本発明は、以前に記載された 14 アミノ酸ヒト R e g 3 a ペプチド (H I P) および 15 アミノ酸ハムスターペプチド (I N G A P) 内に含有されない相同なペプチド配列を同定する。次いで、P e r l e ペプチドが R e g 受容体に直接または間接的に結合し得るかどうかを決定するために調査を行った。

20

#### 【0136】

以前に、14 アミノ酸ヒト R e g 3 a ペプチド (H I P) および 15 アミノ酸ハムスターペプチド (I N G A P) の両方は、管、腺房細胞、および前駆細胞を含有するヒト島外外分泌組織の形質転換を通して新たなベータを生成することが示された。そのうえ、新たなベータ細胞が島外外分泌組織に由来することに対して、生成された新たなベータ細胞が出芽のプロセスによって既存のベータ細胞に由来するかどうかを決定する際の成功間違いなしの基準と考えられる B r D U 標識は、14 アミノ酸ヒト R e g 3 a ペプチド (H I P) および 15 アミノ酸ハムスターペプチド (I N G A P) の両方が新たなベータ細胞をもたらしただけではなく、新たなベータ細胞が島外外分泌組織に由来することも実証した。H I P および I N G A P の両方の作用メカニズムは、ヒト島外管組織において見つけれられる R e g 受容体とのそれらの相互作用を介してのものである。

30

#### 【0137】

R e g 受容体に直接結合する新たな、より短いペプチドのこの発見は、新たに発症したまたは既存の 1 型または 2 型糖尿病を有する患者ならびに糖尿病前症、インスリン抵抗性、インスリンおよび / もしくはベータ細胞欠乏症、または異常なグルコース代謝を有する人々のための新たな療法を提供し、これは、より強力で、効率的で、対費用効果の高いものとなり得る。P e r l e ペプチドも、R e g 受容体に直接結合するそれらの能力も以前に記載されていない。

40

#### 【0138】

図 7 は、R e g 受容体発現プラスミド DNA によりトランスフェクトした 293 T 細胞を利用する R e g 受容体発現および精製を実証するために行われた研究からの結果を実証する。細胞は 72 時間後に収集した。R e g 受容体を F L A G エピトープによりタグ付けし、F L A G 樹脂は、R e g 受容体を精製するために利用した。図 7 において示されるように、R e g 受容体は高度に精製された。R e g 受容体は、抗 F l a g M2 アフィニティゲルによって精製した。標的タンパク質は、4 ~ 12 % S D S - P A G E およびウエスタンブロットによって確認した。図 7 a は、高純度の R e g 受容体を示すためのドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動 (S D S - P A G E) の使用を実証する。図 7 b および 7 c は、精製タンパク質が、R e g 受容体に対する抗体 (C D

50



104) を使用して、Reg 受容体であることを示すウエスタンブロット結果である。Reg 受容体は、図7において高度に精製されることが示される。

#### 【0139】

次いで、Reg 受容体へのPerl eペプチドの直接的な結合を実証するために、精製したReg 受容体を、炭酸水素塩コーティングバッファー、pH 9.6を使用することによって96ウェルプレート上にコーティングした；ウェル当たり濃度3ug/ml、100ulで一晩、4℃。プレートを、一晩、コーティングし、コーティングしたプレートを、0.5xTBS Tにより3回洗浄し、3%BSAにより遮断し、1時間、室温で回転させた。遮断の後に、プレートを、0.5xTBS Tにより3回洗浄した。次いで、ペプチドを、TBS Tバッファーにより希釈し、二通りでウェルに追加し、次いで、1時間、室温で結合させた。3回洗浄した後に、100ng/ml strep-HRPを、100ul/ウェルでプレートに追加し、1時間、室温で回転させた。ABST 試薬を、室温に温め、使用直前に混合した。次いで、100ulを、それぞれのウェルに追加し、反応の25分後に読み取り、吸光度を、Spectramax M5プレート読み取り装置によって405nmで評価した。精製したReg 受容体を、プレート上にコーティングした。次いで、プレートを、BSA溶液により遮断した。続いて、Perl eペプチドを、ウェルに追加し、HRP-ストレプトアビジンおよびその基質を、ウェルに追加して、受容体およびPerl eペプチドの間の相互作用を明らかにした。

10

#### 【0140】

図8において示されるように、7アミノ酸Perl eペプチド、8アミノ酸Perl eペプチド、および9アミノ酸Perl eペプチドはすべて、Reg 受容体に直接結合する。8アミノ酸ペプチドは、Reg 受容体への結合において最も強力であるように思われた。スクランブルしたコントロールペプチドは、Reg 受容体に結合しなかった。14アミノ酸ヒトReg 3aペプチド(HIP)は、Reg 受容体との相互作用を通して新たなベータ細胞を生成する能力を実証したが、Reg 受容体に直接結合することは示されていない。14アミノ酸ヒトReg 3aペプチド(HIP)は、スクランブルしたペプチドと同じレベルの結合を有することがこの研究において示された(図8)。7、8、および9アミノ酸Perl eペプチド配列は、14アミノヒトReg 3aペプチド(HIP)配列内にも、15アミノ酸ハムスター3ガンマペプチド(INGAP)内にも含有されない。

20

#### 【0141】

この研究は、Perl eペプチドがReg 受容体に直接結合するならびに新たに発症したまたは既存の1型または2型糖尿病を有する患者ならびにインスリン抵抗性、インスリンおよび/もしくはベータ細胞欠乏症、または異常なグルコース代謝を有する患者のための療法のための有力候補となる能力を実証する。

30

#### 【0142】

##### 実施例2

Reg 受容体内の結合領域の同定およびReg 受容体結合部位に対する刺激性抗体の生成  
以前の研究は、Reg タンパク質およびペプチドが919アミノ酸細胞表面タンパク質を通して作用することを同定した。研究は、Perl eペプチドに対する結合部位を同定し、Reg 受容体上の結合部位を刺激することによってベータ細胞の形成の進行を亢進するための刺激性化合物を開発するために行った。刺激性抗体の産生のために、配列を、外骨腫ファミリーの他のメンバーに含有されず、したがって、Reg 結合ドメインであると仮定される、Reg 受容体のアミノ酸領域である、推定上のReg 受容体のN-末端部分(アミノ酸1~332)(配列番号13)内で評価した。

40

#### 【0143】

一貫して、酵素イムノアッセイにおいて、配列番号13内のペプチド配列から力価を測定する研究は、20アミノ酸ペプチドの20アミノ酸Reg 受容体配列(配列番号9)(アミノ酸117~136)に対して産生される非常に高度なポリクローナル抗体をもたらした。酵素イムノアッセイの結果を図11において概説する。図12は、Reg 受容体内のペプチド領域に対するポリクローナル抗体の開発のために使用した標準的なプロトコール

50

ルを示す。

#### 【0144】

データセットは、0日目および21日目の追加免疫の後に採血から採取した。動物に配列番号9のペプチドを注射し、キーホールリンペットヘモシニアン(KLH)にコンジュゲートした。KLHではなくもっぱらペプチドに対する応答を同定することができるように、スクリーニング抗原は、KLHにコンジュゲートしない。50%力価は、シグナルがピークおよびベースラインの間の中間にある希釈値であり、希釈値が高いほど、抗原に対する応答は大きくなる。ポジティブコントロールは、ウサギにおいてオバルブミン抗体から生成された内部コントロールである。1:750, 000の希釈で、吸光度は、0.45~0.9の範囲内にあった。配列番号9に対する応答の場合には、高度な応答があった(図11)。0日目および21日目の追加免疫の31日後に採取した試験のための採血について、図13において示されるポリクローナル力価参照範囲によれば、CD153は、平均的な応答である36, 000の50%力価を示し、CD154は、高度な応答である125, 000の50%力価を示した。研究は、産生された抗体が、Perleペプチドに対して刺激性であり、Reg受容体と相互作用して、前駆細胞を含むヒト島外分泌組織においてベータ細胞を生成することを実証する、Perleペプチドの存在下および非存在下において生成される抗体の効能を評価するために進行中である。

10

#### 【0145】

Reg受容体内の20アミノ酸ペプチド領域に対して生成された刺激性抗体の開発に基づいて(図11)、本発明は、糖尿病ならびにインスリンおよび/またはベータ細胞不足または損失の状態の処置のための新たなベータ細胞の生成のためのならびにReg受容体上のPerleペプチドのドメイン結合部位を利用するペプチド模倣薬の開発のための刺激性抗体を利用する可能性について明らかにする。

20

#### 【0146】

##### 実施例3

##### Reg受容体移動に対するPerleペプチドの影響

ウエスタンブロット分析は、細胞膜から、細胞質を通して、核へのReg受容体移動に対するPerleペプチドの影響を評価し、確認するためにおよびPerleペプチドがヒト島外管組織に追加された場合に測定可能な増強があったかどうかを決定するために、利用した。細胞質ゾル画分および核画分のウエスタンブロット分析を図11に示す。8アミノ酸Perleペプチドは、細胞膜から核へのReg受容体移動をもたらす最も大きな能力を実証した(図11)。

30

#### 【0147】

ヒト島外管細胞を、10%ウシ胎児血清を含有するダルベッコ修飾イーグル培地中にT75フラスコにおいて播種した。細胞を24時間、37℃、5%CO<sub>2</sub>でインキュベートし、次いで、167nMの最終濃度でPerleペプチドにより処置した。この処置を4日間、一日に一度行った。5日目に、細胞を破壊して、細胞溶解物を得た。これらの細胞抽出物において、総タンパク質量レベルを決定し、総タンパク質量のうちの50マイクログラムをウエスタンブロット分析を実行するために使用した。50マイクログラムのタンパク質を含有するサンプルを、ローディングバッファー中に希釈し、ゲルのそれぞれのウェルにロードした。還元条件下でのゲル実行のために、バッファーはまた、5%の還元剤ベータ-メルカプトエタノールを含有した。

40

#### 【0148】

分析を実行し、細胞質抽出物は、10mM HEPES(pH8.0)、1mM EDTA、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、10mM KCl、0.5mM DTT、200mMスクロース、および0.5% Nonidet P-40中で得た。核抽出物は、20mM HEPES(pH7.9)、0.75mM MgCl<sub>2</sub>、210mM NaCl、50mM KCl、1mM EDTA、10%グリセロール、および0.5mMのジチオスレイトール中で得た。両方の抽出バッファーは、0.5mM PMSF、1μg/mlロイペプチン、1μg/mlアプロチニン、2.5mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、1mM -グリセ

50

ロリン酸、および 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  を含有した。タンパク質抽出物は、SDS - ポリアクリルアミドゲル上でサイズ分画し、ニトロセルロースに転写した。Tris 緩衝食塩水 (pH 7.4) 中 3 % 乳中で遮断した後に、プロットを、4 で一晩、ウサギ抗ヒト Reg 受容体抗体および適切なホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体と連続してインキュベートした。二次シグナルは、化学発光基質により現像し、オートラジオグラフィーによって分析した。画分および品質コントロールは、2 つの抗体を有する画分を利用し、GAPDH は、細胞質ゾル分子であり、ラミン B は、核分子である。GAPDH およびラミン B の両方は、核および細胞質ゾル画分について優れたコントロールとして果たすことが本発明において実証された (図 10)。図 10 は、Perle ペプチドの存在下および非存在下において複数の時点での Reg 受容体の核レベルのウエスタンプロット分析を実証する。

【0149】

#### 実施例 4

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体を利用する、成人潜在性自己免疫糖尿病を含む新たなおよび既存の 1 型糖尿病を処置するための方法

1 型または後期 2 型糖尿病を有する患者が疾患を管理する主要な方法は、皮下注射を介してまたは皮下ポンプ注入を使用することによってインスリンを投与することによるものである。明らかなライフスタイル上の不都合と同様に、インスリン療法は、身体の正常なグルコースコントロールメカニズムと調和せず、そのため、グルコース増減を十分に管理しない。

【0150】

最善にコントロールされた 1 型糖尿病患者でさえ、正常なグルコース代謝のような代謝を全く有しておらず、正常なヘモグロビン A1C レベルも、糖尿病を有するほとんどの患者にとって手の届くところがない。多くの新たなインスリン調製物、センサー、ポンプ、新たな経口および注射用の医薬品にもかかわらず、正常なグルコースレベルおよびヘモグロビン A1C レベルの実現は、ほとんどの糖尿病患者にとって手の届かないところにあるままである。非糖尿病ヒト由来のセンサーデータは、すべての測定したグルコースレベルの 80 % が 60 ~ 100 mg / dL 内にあり、食事の後の平均ピークグルコースレベルは < 120 mg / dL であることを実証する。Christiansen JS, et al., <http://www.diabetes-symposium.org/index.php?menu=view&id=322>。

【0151】

Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) および United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) からの線形回帰曲線は、5.5 % 以上の A1C レベルが、さらに多くの合併症に関連することを示す。DCCT Research Group, Diabetes, 1996; 45 (10): 1289 - 1298. Stratton IM et al., BMJ, 2000; 321 (7258): 405 - 412。このデータは、非糖尿病の個人の間の EPIC - Norfolk 治験からの A1C レベルによって支持され、これは、5.5 % 以上の A1C レベルが、血管関連性の病的状態および死についての著しく増加した危険性に関連することを発見した。Khaw KT et al., BMJ, 2001; 322 (7277): 15 - 18。

【0152】

グルコースホメオスタシスは、医薬品の集中的なレジメンが利用される場合でさえ糖尿病患者の間で正常血糖を回復させることができないことによって例証されるように、適切な数のベータ細胞を必要とする。DCCT 研究者らは、主要な処置アウトカム目標として、低血糖症に対する危険性の増加を伴わない、治験期間にわたる平均 A1C を 6.05 % に設定した。センサー搭載 (sensor-augmented) ポンプは、最近、12 か月にわたって 8.3 % から 7.5 % に A1C レベルを改善し、さらに 6 か月の処置の

10

20

30

40

50

後に 7.4% にさらに低下したことが示された。これらの功績は、DCC Tにおいて見られた関連する体重増加または低血糖症を伴わずになされた。センサーおよびポンプにおける技術的な進歩にもかかわらず、センサー搭載ポンプ療法は、数十年前にDCC Tにおいて見られたもののほどA1Cレベルを改善しなかった。Bergens tal RM, N Engl J Med. 2010; 363(4): 311-320. Bergens tal RM, Diabetes Care. 2011; 34(11): 2403-2405。1型糖尿病のために現在利用可能な多くの新たな種類のインスリン療法にもかかわらず、現在の療法および技術により1型糖尿病を有する患者において5.5%の正常なヘモグロビンA1Cを実現することはなお不可能である。数十年間研究され、膵島細胞移植が出現しても、その成功は米国において再現されていない。移植の4年後、島細胞移植を受けた10%未満の患者が、インスリン非依存性のままである。

10

#### 【0153】

したがって、すべての新たな療法および技術にもかかわらず、糖尿病は、新たな失明、切断、および透析または移植を必要とする腎不全の主な原因のままである。自分の膵臓前駆細胞由来の新たなベータ細胞を提供し、保護することは、この疾患状態を逆転させるチャンス患者に提供する。

#### 【0154】

1型糖尿病を逆転させるために、本発明は、2ステップのプロセスが必要になるであろうということを仮定する。第1に、免疫寛容剤、その後、Perleペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体を含むベータ細胞アゴニストを利用することが必要とされるであろう。図14は、Perleペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体を含むベータ細胞アゴニストを利用することによって、新たなおよび既存の1型糖尿病および成人潜在性自己免疫糖尿病を逆転させるための方法の概要を示す。1型糖尿病において、ベータ細胞再生作用物質の前の免疫寛容剤の送達は、Perleペプチドから形成された新たなベータを保存する能力を改善することが本発明において仮定される。

20

#### 【0155】

さらに、本発明は、新たなおよび既存の1型糖尿病および成人潜在性自己免疫糖尿病の処置のためのPerleペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体を含むベータ細胞アゴニストの使用のための方法およびタイミングを詳細に記載する。本発明は、Perleペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体を含むベータ細胞アゴニストによって生成された新たなベータ細胞に対する免疫攻撃を最適に妨げるための、免疫修飾物質の開始の後の免疫最下点の時の、1型および成人潜在性自己免疫糖尿病の患者における、Perleペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体を含むベータアゴニストの開始および使用のための、以前に記載されていない方法を含む。免疫最下点の時間は、新たに発症した1型糖尿病において利用されるそれぞれの免疫修飾作用物質により変動する。

30

#### 【0156】

さらに、免疫最下点の時にPerleペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体を含むベータ細胞アゴニストを開始することは、ベータ細胞が外来性のものであるとして認識される可能性が最も低く、したがって、自己免疫性の攻撃に対する抗原となる可能性が低い期間の間に新たなベータ細胞が形成されるので、健忘性の(amnes tic)応答の強化をもたらす。図15は、新たに発症したおよび既存の1型糖尿病患者においてならびに成人潜在性自己免疫糖尿病を有する患者の間で1型糖尿病を逆転させるための2ステップアプローチを例証する。

40

#### 【0157】

新たなベータ細胞が、免疫剤およびPerleペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体から1型患者の間で形成

50

されるにつれて、狭い範囲内でグルコース環境を維持することがベータ細胞再生にとって重大であるので、外因性のインスリンは、低下させなければならない。ベータ細胞の形成は、低血糖症の状態において起こらないであろう。ベータ細胞の形成はまた、極度の高血糖症でも最適には起こらないであろう。

#### 【0158】

高血糖症および低血糖症の両方を妨げるその多くの特有のフィードバックループにより正常に機能する膵臓の正確さは、パフォーマンスアーティストであるDavid Blaineから、食べる前の、44日間の絶食直後に採取された公開データによって例証され、Blaineのグルコースレベルは、 $5.2 \text{ mmol/L}$ で、正常な範囲にあり、インスリンレベルは $3.6 \text{ mU/L}$ であり、これは、コントロール対象( $4.0 \sim 20 \text{ mU/L}$ )の範囲以下であった。低インスリンレベルは、断食している個人において低血糖症を妨げるためにインスリンを保護的にダウンレギュレートするホメオスタシスグルコースメカニズムを示すものである。Korbonits M, et al., Eur J Endocrinol. 2007; 157(2): 157-166。

10

#### 【0159】

1ダースを超える免疫寛容剤がNODマウスにおいて血糖コントロールを回復させたが、これらの作用物質が新たに発症した1型糖尿病の間でヒト試験において利用された場合、ヒト1型患者をインスリンフリーにした免疫寛容剤は、シクロスポリン、テプリズマブ、オテリキシズマブ、GADワクチン、熱ショックタンパク質、Diapep27、BCGワクチンを含めて現在までない。マウスにおいて、自然な速度のベータ細胞再生は、免疫寛容を増大させるのに十分である。ヒトにおいて、この速度は、膵炎および膵石などのような急性膵外傷の状態下を除いて、十分ではない。そのため、免疫最下点時に開始され、ヒトにおいて1型糖尿病を逆転させる可能性を有するベータ再生を刺激する作用物質との標的免疫寛容剤の併用療法が、本発明において含まれる。

20

#### 【0160】

免疫寛容剤の多くは、処置後何年間も持続性の免疫をもたらす能力を実証したが、存在する残りのベータ細胞を保護する免疫にもかかわらず、新たなベータ細胞の生成は、患者をインスリンフリーにするのに十分ではない、しかし、シクロスポリン、抗CD3抗体、GADワクチン、Diap277、およびBCGワクチンを含む免疫寛容剤のいくつかは、内因性のインスリンにおける改善に相当する、刺激されたc-ペプチドの改善をもたらした。シクロスポリンは、1型糖尿病を有する新たに発症した患者の50%を1年でインスリンフリーにした。Bougneres et al., N Engl J Med; 1988(318)11: 663-670。たとえば、GADワクチン処置を与えた4年後、記憶T細胞およびB細胞応答において持続性の改善があった。Axelsson S, et al. PLoS One. 2011; 6(12)。同様に、2つの抗CD3抗体もまた、単一過程の療法後の5年間、残りの内因性のインスリンを維持することを示した。Herold KC, et al. Clin Immunol. 2009; 132(2): 166-73。Keymeulen B, et al. Diabetologia. 2010; 53(4): 614-23。

30

#### 【0161】

新たなベータ細胞の生成に関しての膵臓の回復力の証拠もまた、平均20年間、彼女たちの妊娠の間にインスリンを完全に中止することができた、1型糖尿病を有する女性の間で、c-ペプチドの正常化についての証拠資料と共に示された。1/3もの女性は、インスリンの必要性が劇的に低下し、何人かの女性は、妊娠の始めに検出できないレベルのc-ペプチドを有したにもかかわらず、彼女たちの妊娠の間にインスリンを完全に中止した。いくつかのメカニズムが、妊娠で起こり、特有であり、また、1型糖尿病を有する人が彼女たちの妊娠の間にインスリンフリーになる特有の環境をもたらし、1)胎児の拒絶を妨げるための母親の免疫系のダウンレギュレーション、2)妊娠していない状態よりも25mg/dL低い、糖尿病性および非糖尿病性の女性の間の妊娠中の正常なグルコースレベルを伴う妊娠でのベータ細胞生成の増加、ならびに3)急性傷害の時に典型的にアップ

40

50

レギュレートされるだけではなく、妊娠の間にもアップレギュレートされることが分かった Reg ペプチドのアップレギュレーションを含む。I l i c S e t a l . , D i a b e t o l o g i a 2005 ; 43 : 1329 - 1330、A l t s c h u l S F . , N u c l e i c A c i d s R e s . 25 : 3389 - 3402。

#### 【0162】

現在までに、いくつかのチームは、Reg のペプチドを利用し、げっ歯動物モデルにおいて糖尿病を逆転させ、正常血糖を生成する能力を実証した。2つのチームはまた、ヒト死体から膵臓を取り出した後に島から単離したヒト管細胞を利用することによって、14 アミノ酸ヒト Reg 3 a ペプチド (H I P) および 15 アミノ酸ハムスター Reg 3 ガンマペプチド (I N G A P) が、新たなベータ細胞を含有する島クラスターへの非内分泌細胞のインビトロにおける分化を増大させ、増強させることをも実証した。

10

#### 【0163】

15 アミノ酸ハムスター Reg 3 ガンマペプチド (I N G A P) によるヒト治験は、ヒト 1 型患者の間で 56 日目までに刺激された c - ペプチドの 27% の上昇を実証した (p < 0.001)。D u n g a n K M e t . , M e t a b R e s R e v . 2009 ; 25 (6) : 558 - 565。すべての患者は、ベースライン C - ペプチドレベル 0.3 ナノグラム / m を有したが、患者は、続いて起こる免疫攻撃から新たな島形成を保護するためにいかなる免疫寛容剤によっても処置されなかった。一方の積極的治療アームにおける患者の 22% は、G A D 65 抗体力価において > 50% 増加したことが確認されたが、プラセボでは変化は確認されなかった。1 型糖尿病の間で、サイトカイン誘発性のベータ細胞死は、新たに形成されるベータ細胞に優先的に作用し、したがって、G A D 65 抗体の増加は、新たなベータ細胞の形成のマーカーとなり得、また、新たに形成されたベータ細胞に対する自己免疫は、ヘモグロビン A 1 C および内因性のインスリン産生のマーカーである刺激された c - ペプチドの点から、研究のアウトカムをネガティブに影響を与え得ると仮定することができる。

20

#### 【0164】

本発明は、この治験において登録された患者が、シクロスポリンなどのような免疫寛容剤によりあらかじめ処置され、刺激された C - ペプチドのより著しい上昇があり得たことを仮定する。さらに、ヒト治験を終了した、新たに発症した 1 型患者において利用された免疫寛容剤についてのデータを調査した後、それぞれの免疫寛容剤は、患者が免疫最下点を起こす特有の時間を有する。たとえば、免疫最下点は、シクロスポリン、抗 C D 3 抗体、テプリズマブによる静脈内処置後 6 日目に起こり、B C G ワクチンにより処置した人々の間の免疫最下点は、第 2 の B C G 注射の 5 週目に起こる。

30

#### 【0165】

そのため、本発明は、P e r l e ペプチド、誘導体、製剤、最適化されたバージョン、P e r l e のペプチド模倣薬、および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含むベータ細胞アゴニストの使用を開始する最適な時間が、所定の免疫寛容剤についての免疫最下点であることを含む。本発明は、特に、利用される作用物質の間で変動する免疫寛容剤のいずれかによる免疫最下点の間の、P e r l e ペプチド、誘導体、製剤、最適化されたバージョン、P e r l e ペプチド模倣薬、および R e g 受容体に対する刺激性抗体を含むベータアゴニストの開始を含む。また、最初、免疫最下点時に P e r l e ペプチドを開始することによって、P e r l e ペプチド、誘導体、製剤、最適化されたバージョン、P e r l e ペプチド模倣薬、および R e g 受容体に対する刺激性抗体によって生成された新たなベータ細胞を外來性のものとして認識する免疫系の潜在性に対して健忘性の応答を生成する潜在能力がある (図 14)。

40

#### 【0166】

P e r l e ペプチド、製剤、誘導体、ペプチド模倣薬、および R e g 受容体に対する刺激性抗体は、P e r l e ペプチド、製剤、誘導体、ペプチド模倣薬、および R e g 受容体に対する刺激性抗体によって形成された新たなベータ細胞を保護するために、1 つまたは複数の多くの免疫修飾物質と共に利用されてもよい。作用物質のタイプは、欠乏症が糖尿

50

病のより高い発生率に関連するビタミンDなどのような他の作用物質と共に、典型的に臓器移植において使用される一般的な免疫抑制剤、特に、島を攻撃するリンパ球に対する標的抗体を含むが、これらに限定されない。作用物質は、シクロスポリン、ミコフェノール酸モフェチル、リツキシマブ、Bリンパ球リンパ腫の処置のためのFDA承認の作用物質である抗CD20作用物質を含む。他の免疫剤は、シクロスポリン、抗CD3抗体、hOKT3ガンマ1 (Ala-Ala) (テプリズマブ)、およびモノクローナル抗体TRX4 (ChAglyCD3)を含むが、これらに限定されない。免疫寛容剤はまた、ポリクローナル抗Tリンパ球グロブリン(ATG)、T細胞の同時刺激を阻害する選択的同時刺激修飾物質であるCTLA4-Ig(アパタセプト)、もしくはキャンパス-1H(抗CD52抗体)、T細胞に対するヒト化モノクローナル抗体を含んでいてもよいまたはアルファ-1抗トリプシン(AAT)は、セリンプロテイナーゼ阻害剤である。

10

#### 【0167】

以下の免疫寛容剤のいずれも成功が限られており、どれも患者をインスリンフリーにしておらず、本発明の方法において使用することができなかった。ポリクローナル抗Tリンパ球グロブリン(ATG)、熱ショックタンパク質であり、ベータ細胞を破壊するサイトカインおよび炎症促進性細胞の放出に影響を与えると考えられる誘導体熱ショックタンパク質60であるDiaPeP277は、糖尿病を有する新たに診断された患者で成功したアウトカムを有する大人および子供において、また潜在性自己免疫性成人糖尿病(LADA)を有する患者においても研究されている。他の作用物質は、組換えヒトグルタミン酸デカルボキシラーゼタンパク質(rhGAD65)の65kDaアイソフォームに基づくGAD抗体ワクチンである。CTLA4-Ig(アパタセプト)は、T細胞の活性化において重大な刺激性経路を阻害する。このメカニズムによって、薬剤は、インスリン産生細胞のT細胞媒介性自己免疫破壊を阻止するまたは遅らせると考えられ、それらの機能を保存する。CTLA-4 Igは、診断の3か月以内に始め、次いで、合計25回の処置について毎月、静脈内作用物質として治験されている。キャンパスH1は、新たに発症した1型糖尿病の間で治験されている他の免疫寛容剤であり、本発明において同定されたPerleペプチド、製剤、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびReg受容体上の結合領域に対する刺激抗体と共に利用されてもよい。そのうえ、アルファ-1抗トリプシンは、セリンプロテイナーゼ阻害剤であり、現在、新たに診断された1型患者の間でのベータ機能の保存について研究中である。シクロスポリンは、ベータ細胞に対する初めの攻撃の後の10%くらいの残りの島を保持するのを支援することによって、1型糖尿病を有する新たに発症した患者の50%を1年でインスリンフリーにした。Bougneres et al., N Engl J Med; 1988 (318) 11: 663-670。不幸にも、これらの患者が6年間続けた場合、ベータ細胞質量は減少したが、非常に興味深いことに、毎年、その患者らはシクロスポリンを続け、島を攻撃する抗体のパーセンテージは、シクロスポリンにより処置しなかった患者よりも毎年著しく低かった。De Filippo et al. Diabetes. 1996. 45 (1): 101-4。ベータ細胞免疫プロテクターと併用して与えられる、本発明において含まれるPerleペプチドの能力は、1型糖尿病の根底にある病理に対処する処置を真に反映し得る。

20

30

#### 【0168】

最適な血糖コントロールは、Perleペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体を含むベータアゴニストを開始した後だけではなく前も重大である。Perleペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体を含むベータアゴニストの開始の前に、グルコースコントロールの強化の4週間の期間が必要とされ、この間、患者は、食前および食後血中グルコースレベルの両方を厳密にモニターするべきである。

40

#### 【0169】

血糖コントロールの最適化のこの期間の間、患者についてのグルコース目標は、常時100~200mg/dLとしてもよい。Perleペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体を開始するために最適

50

化されたグルコース目標を達成するために、患者は、皮下連続モニタリングシステムを含む最先端技術の糖尿病ツールと共に医療チームを利用してもよい。主要な目標は、グルコースレベルが最適化期間の間に  $70 \text{ mg/dL}$  未満に落ちないことを確実にすることであろう。症候性の低血糖症の何らかのエピソードがあるまたはグルコースレベルが  $70 \text{ mg/dL}$  未満に落ちることがあれば、患者のインスリンレジメンにおける変更が、4週間のグルコースレベルの強化の再開と共になされなければならない。

#### 【0170】

1型糖尿病を有する新たに診断されたまたは先在する患者において *Perle* ペプチドを使用するための方法は、免疫寛容剤を利用するであろう。たとえば、新たに発症した1型糖尿病を有する患者に与えられる免疫寛容剤が、シクロスポリンと選択される場合、患者は、*Perle* ペプチドが始められる前に、7日間、 $7.5 \text{ mg/kg/day}$  を経口的に受けるであろう。シクロスポリンの高ピーク濃度への曝露を減少させるために、毎日の投薬量の半分は朝食で与えられ、半分は夕食で与えられるであろう。投薬量は、標準的なアッセイによって評価されるように、1ミリリットル当たり  $150 \sim 350 \text{ ng}$  にシクロスポリンのトラフレベルを維持するために、処置の3、7、15、30、および45日目に調節されるであろう。処置後の45日目に、トラフレベルは、毎月、次いで、投薬量のそれぞれの変更の7日後に決定されるであろう。最適化された *Perle* ペプチドは、7日間の処置シクロスポリン後、8日目にスタートし、2回の最も量の多い食事と共に皮下  $1 \text{ mg/kg}$  の投薬量で始められるであろう。

10

#### 【0171】

免疫寛容剤がテプリズマブである場合、患者は、体重に基づく投薬量で6日連続の静脈内テプリズマブを受けるであろう。処置の6日目に、遮断（すなわち、アセチル基およびアミド基による選択された *Perle* ペプチドのアミノ末端およびカルボキシル末端のエンドキャッピング）によって修飾された最適化された *Perle* ペプチド（たとえば配列番号8）が皮下に毎日2度（ $1 \text{ mg/kg}$ ）で開始されるであろう。 *Perle* ペプチドの開始後、グルコースレベルに基づいて、外因性のインスリンは、下記に記載されるように、次第に減らされるであろう。

20

#### 【0172】

選択される免疫寛容剤が、熱ショックタンパク質60、*Dia Pep 277*である場合、初めの  $1 \text{ mg}$  皮下投薬量の後に、*Perle* ペプチド（たとえば配列番号8）の遮断（すなわち、アセチル基およびアミド基によるペプチドの両方のアミノ末端およびカルボキシル末端のエンドキャッピング）によって修飾された最適化された *Perle* ペプチドの皮下毎日2度の  $60 \text{ mg}$  が開始されるであろう。3か月ごとに一度、患者は、熱ショックタンパク質、*Dia pep 277*の別の皮下注射を受けるであろう、その間に、グルコースレベルに基づいて、外因性のインスリンは、下記に記載されるように次第に減らされるであろう。 *Perle* ペプチドの開始後、グルコースレベルに基づいて、外因性のインスリンは、下記に記載されるように、次第に減らされるであろう。

30

#### 【0173】

選択される選択された免疫寛容剤が結核ワクチンとして知られているウシ結核菌（*Mycobacterium bovis*）カルメット-ゲラン杆菌（BCG）ワクチンである場合、低用量のBCG（ $1.6 \sim 3.26106$ コロニー形成単位/注射）を含有する三角筋のエリアへの2回の  $0.1 \text{ mL}$  皮内注射が、*Perle* ペプチド（配列番号8）の遮断（すなわち、アセチル基およびアミド基による選択された *Perle* ペプチドのアミノ末端およびカルボキシル末端のエンドキャッピング）によって修飾された最適化された *Perle* ペプチドの皮下2度毎日の  $60 \text{ mg}$  の開始と共に4週間間隔で投与される。 *Perle* ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体は、少なくとも30グラムの炭水化物が消費される場合、食べた2回の主な食事の15分以内に送達されてもよい。 *Perle* ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、またはReg受容体に対する刺激性抗体の開始の後、個人のグルコースレベルに基づいて、外因性のインスリンは、下記に記載されるように

40

50



次第に減らされるであろう。

【0174】

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体の初めの投与前に 4 週間の期間があるであろう、この間、患者は、症候性の低血糖症のいかなるエピソードも有するべきではない。万一、患者が、投与された Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体を含むベータアゴニストに対して症候性の低血糖症を示したら、低血糖症の存在下において新たなベータ細胞の形成を妨げる多数の逆調節ホルモンのために、低血糖症がベータ生成の効果を無効にし得るので、患者の糖尿病レジメンは変更されるべきである。

10

【0175】

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体を含むベータアゴニスト療法が投与される期間の間に、患者のインスリン投薬量は、低血糖症のあらゆるエピソードを妨げ、島新生のための最適な範囲にグルコースレベルを維持するために、必要に応じて減少させてもよく、最初の 30 日間、1 日当たり 1 %、最初に低下させてもよい。これは、食事前のインスリン投薬量からの 1 日当たり合計 1 % の低下となる。（以前の食前の投薬量からの総食前インスリン投薬量の食事当たり 0.33 % の低下）。Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体の 31 ~ 60 日目の間に、前日から基本インスリンにおいて 1 日当たり 1 % 低下させてもよい。

20

【0176】

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体を含むベータアゴニスト療法による療法の最初の約 60 日間の間に、患者は、糖尿病医療チームにグルコース値をフィードバックするために、電話、電子メール、またはオフィス訪問を介して毎日連絡するであろう。グルコース値に基づいて、食前グルコースレベルが 100 mg / dL 未満である場合、基本インスリン投薬量におけるより積極的な低下が行われてもよく、食後 2 時間のレベルが 140 mg / dL 未満である場合、食前インスリンにおけるより積極的な低下が行われてもよい。

【0177】

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体を含む作用物質を有するベータアゴニスト療法の約 61 ~ 90 日間の間に、インスリン投薬量は、毎日のグルコース値に基づいて 1 日当たり 0.5 ~ 2.0 % 低下させてもよい。基本インスリン投薬量における低下は、低血糖症のあらゆるエピソードを妨げ、島新生のための最適な範囲にグルコースレベルを維持するために、必要とされてもよく、食前の値が 100 ~ 125 mg / dL である場合、最初に 1 日当たり 0.5 % 低下させてもよく、食後 2 時間のレベルが 140 ~ 160 mg / dL である場合、食前インスリンにおける 1 日当たり合計 0.6 % の低下（前日からの食事当たり 0.18 % の低下）が行われてもよい。食前のグルコースレベルが 100 mg / dL 未満である場合、毎日、基本インスリンにおいて 1 % 低下させてもよく、食後 2 時間のレベルが 140 mg / dL 未満である場合、食前のインスリンにおける 1 % の低下（前日からの食事当たり 0.33 % の低下）が行われてもよい。食前の期間に低血糖症のエピソードがある場合、前日から基本インスリンにおいて前日から 2.0 % 低下させてもよい。食後の状態の間に低血糖症の何らかのエピソードがある場合、食事前のインスリンの投薬量は、食事の前に 2.0 % 低下させてもよい（食前のインスリンにおいて食事当たり 0.7 % ）。

30

40

【0178】

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体を含むベータアゴニストは、刺激された C - ペプチドレベルが正常な範囲内にある場合および最適化された血糖コントロールがインスリンを含む他の糖尿病性作用物質の使用を伴うことなく達成された場合、中断することができる。処置の期間を通じて、患者は、糖尿病医療チームにグルコース値をフィードバックするために、

50

電話、電子メール、またはオフィス訪問を介して毎日連絡してもよい。グルコース値に基づいて、基本および食前のインスリン投薬量におけるより積極的な低下が、それぞれ、食前および食後のグルコースレベルに基づいて行われてもよい。

#### 【0179】

##### 実施例 5

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体を利用する、新たなおよび既存の 2 型糖尿病ならびに糖尿病前症およびインスリン/ベータ細胞欠乏症の状態を処置するための方法

正常に機能する膵臓において、少数のベータ細胞は、一日一日を基準に自然に死に、グルコースレベルを保つために必要に応じて交換される。非糖尿病患者において、既存の島内のベータ細胞質量は、個人のインスリン必要性に依存して、増えるまたは収縮することができる。2 型糖尿病を有する患者において、ベータ細胞アポトーシスは、新たなベータ細胞の増殖を上回る。より最近の研究は、糖尿病前症、インスリン抵抗性、高血圧症、不活性、および家族歴が、ベータ細胞質量を減らす島ストレスとなることを実証した。

#### 【0180】

代謝機能およびヘモグロビン A1C を改善し得る、2 型糖尿病のために現在利用可能な多くの新たな種類の療法にもかかわらず、正常なヘモグロビン A1C は 5.5% であり、大多数が達成できないままである。Stratton IM et al., BMJ. 2000; 321 (7258): 405 - 412。ヘモグロビン A1C が 5.5% 以上に上昇すると、同様に上昇する合併症の危険性が増加する。2 型または糖尿病前症を有する患者の間で 5.5% のヘモグロビン A1C を安全におよび有効に達成することができそうな注射液および経口医薬品を含む利用可能な糖尿病治療薬は、互いに併用して使用された場合でさえ、非常にまれである。2 型糖尿病、糖尿病前症、ならびにインスリン抵抗性、インスリン不足、ベータ細胞欠乏症、および関連する状態の他の状態を有する患者に自分自身の膵臓前駆細胞由来の新たなベータ細胞を提供することは、この疾患状態を逆転させるチャンスを提供する。

#### 【0181】

ライフスタイル調節およびメトホルミンが、糖尿病前症を有する大人において糖尿病の発症の進行の危険性を低下させることができたが、ライフスタイル調節がヘモグロビン A1C を改善もせず、糖尿病を有する子供および青年期の間でインスリン療法を含むさらなる薬物療法の必要性を防ぎもしなかったことが示された。The TODAY Study Group., N Engl J Med 2012; 366: 2247 - 2256. Diabetes Research Program Prevention Group, Lancet. 2009; 374 (9702): 1677 - 1686。TODAY 研究は、インスリンを分泌するベータ細胞の欠乏症である、糖尿病において根底にある問題に対処する新たな療法についての、糖尿病を有する患者のすべての集団の間での必要性を示す。糖尿病を有する患者の間で使用するのに入手可能なすべての新たな医薬品および技術にもかかわらず、糖尿病は、新たな失明、切断、および透析を必要とする腎不全の主な原因のままである。自分の膵臓前駆細胞から新たなベータ細胞を刺激することは、大人および子供において 2 型糖尿病を逆転させる最善の方法として果たす。

#### 【0182】

糖尿病および糖尿病前症を有する多くの患者は、現在、注射用および経口作用物質の両方の作用物質の併用を含んでもよい 1 つまたは複数の作用物質を受けている。Perle ペプチド、製剤、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、および Reg 受容体上の結合領域に対する刺激抗体は、新たに発症したおよび既存の 2 型糖尿病ならびに糖尿病前症のための第一線の療法として使用されるであろう。Perle ペプチド、製剤、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、および Reg 受容体上の結合領域に対する刺激抗体は、すべてのタイプのインスリン、グルカゴン様ペプチド - 1 (GLP-1) 受容体アナログ、リラグルチドおよびエクセナチド、ジペプチジルペプチダーゼ - 4 阻害剤 (DP

10

20

30

40

50

P - 4 阻害剤) および (シタグリブチン、サクサグリブチン、リナグリブチン) を含む、アミリン、アナログ、プラムリンチド、アカルボース、オーリストット、コレセベラム、プロモクリブチン、オーリストット、ピグアナイド、メトホルミンとの併用療法、ならびにチアゾリジンジオン、スルホニル尿素、および D P P - 4 阻害剤ならびに新たな作用物質 S G L T 2 阻害剤 (ダバグリフロジンおよびカナグリフロジン) との併用を含む他の糖尿病治療薬に追加されてもよい。新たなベータ細胞を 2 型糖尿病を有する患者に提供する能力は、インスリンを含む他の医薬品を次第に減らすことができ、また、糖尿病前症の 2 型糖尿病への進行を妨げるために利用されてもよい。

#### 【0183】

図 15 は、P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または R e g 受容体に対する刺激性抗体を含むベータ細胞アゴニストを利用する 2 型糖尿病を逆転させるための方法の概要を示す。本発明において同定された P e r l e ペプチド、製剤、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、および R e g 受容体上の結合領域に対する刺激抗体は、2 型糖尿病および糖尿病前症を有する患者についての第一線の療法になると思われるまたはインスリンを含む既存の糖尿病薬レジメンに追加されと思われる。グルコースレベルに基づいて、インスリンを含む他の糖尿病薬は、下記に記載されるように、新たなベータ細胞が形成されるにつれて、次第に減らされるであろう。

#### 【0184】

これらの方法は、メトホルミンにより処置されてもよい糖尿病前症を有する前記患者またはメトホルミン、インスリン、および D P P - 4 阻害剤により処置されてもよい、2 型糖尿病を有する患者に提供され、患者は、目標以上のヘモグロビン A 1 C を維持し、そのため、ベータ細胞欠乏症である、糖尿病を引き起こす根底にあるメカニズムに対処する作用物質を必要とする。

#### 【0185】

糖尿病前症、新たに発症した 2 型糖尿病、または既存の 2 型糖尿病を有する前記患者は、P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または R e g 受容体に対する刺激性抗体を含むベータアゴニストの初めの投与前に 2 週間の期間を受けるであろう、この間、患者は、食前および食後血中グルコースレベルの両方を厳密にモニターするべきであり、症候性の低血糖症のいかなるエピソードまたは  $< 70 \text{ mg / dL}$  のグルコースレベルの証拠資料を有するべきではない。万一、患者が症候性の低血糖症を示したらまたはグルコースレベルが  $70 \text{ mg / dL}$  未満となったら、糖尿病医薬品が、次第に減らされるべきであり、グルコースレベルの強化が、P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または R e g 受容体に対する刺激性抗体を含むベータ細胞アゴニストの効果を阻害するであろう低血糖症を防ぐために、再開されるべきである。

#### 【0186】

P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または R e g 受容体に対する刺激性抗体は、P e r l e ペプチド (配列番号 8) の遮断 (すなわち、アセチル基およびアミド基による選択された P e r l e ペプチドのアミノ末端およびカルボキシル末端のエンドキャッピング) によって修飾された最適化された P e r l e ペプチドの皮下 2 度毎日の  $60 \text{ mg}$  ( $1 \text{ mg / kg}$ ) の投薬量で、患者の毎日の医薬品レジメンに追加される。P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または R e g 受容体に対する刺激性抗体は、少なくとも 30 グラムの炭水化物が消費される場合、食べた 2 回の主な食事の 15 分以内に送達されてもよい。P e r l e ペプチドの開始後、グルコースレベルに基づいて、外因性のインスリンを含む他の作用物質は、下記に記載されるように、次第に減らされてもよい。

#### 【0187】

一旦、P e r l e ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または R e g 受容体に対する刺激性抗体が投与されたら、低血糖症の存在下において新たなベータ細胞の形成を妨げる多数の逆調節ホルモンのために、低血糖症がベータ生成の効果を

無効にするとと思われるので、患者の糖尿病レジメンは、グルコースレベルが  $100\text{ mg/dL}$  未満に落ちた場合、変更されるべきである。

【0188】

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体が投与される期間の間に、万一、患者がインスリンを受けていれば、患者の糖尿病薬は、インスリンから始めて、作用物質を次第に減らすことを必要としてもよい。インスリン投薬量は、低血糖症のあらゆるエピソードを妨げ、ベータ細胞再生のための最適な範囲にグルコースレベルを維持するために、必要に応じて減少させてもよく、患者がインスリン療法を受けている場合、インスリン投薬量は、最初の30日間、1日当たり1%、最初に低下させてもよい。インスリンを受けている患者について、これは、食事前のインスリン投薬量からの1日当たり合計1%の低下となる（以前の食前の投薬量からの総食前インスリン投薬量の食事当たり0.33%の低下）。Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体の31～60日目の間に、インスリンにより処置される患者について、前日から基本インスリンにおいて1日当たり1%低下させてもよい。

10

【0189】

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体による療法の最初の約60日間の間に、患者は、糖尿病医療チームにグルコース値をフィードバックするために、電話、電子メール、またはオフィス訪問を介して毎日連絡するであろう。グルコース値に基づいて、食前グルコースレベルが  $100\text{ mg/dL}$  未満である場合、作用物質、注射用医薬品、または基本およびボラスインスリン投薬量を含むインスリンのより積極的な低下が行われてもよく、食後2時間のレベルが  $140\text{ mg/dL}$  未満である場合、GLP 受容体アナログ、DPP-4 阻害剤、スルホニル尿素、および食前インスリンを含む、食後グルコースレベルを低下させる糖尿病性作用物質におけるより積極的な低下が行われてもよい。

20

【0190】

療法の約61～90日目の間に、インスリンを含む経口および注射用作用物質を含む他の作用物質は、毎日のグルコース値に基づいて、さらに次第に減らされてもよい。基本インスリン投薬量における低下は、低血糖症のあらゆるエピソードを妨げ、島新生のための最適な範囲にグルコースレベルを維持するために、必要とされてもよく、食前の値が  $100 \sim 125\text{ mg/dL}$  である場合、最初に1日当たり0.5%低下させてもよく、食後2時間のレベルが  $140 \sim 160\text{ mg/dL}$  である場合、食前インスリンにおける1日当たり合計0.6%の低下（前日からの食事当たり0.18%の低下）が行われてもよい。食前のグルコースレベルが  $100\text{ mg/dL}$  未満である場合、毎日、基本インスリンにおいて1%の低下があってもよく、食後2時間のレベルが  $140\text{ mg/dL}$  未満である場合、食前のインスリンにおける1%の低下（前日からの食事当たり0.33%の低下）が行われてもよい。食前の期間に低血糖症のエピソードがある場合、前日からの基本インスリンにおいて前日から2.0%の低下があってもよい。食後の状態の間に低血糖症のあらゆるエピソードがある場合、食事前のインスリンの投薬量は、食事の前に2.0%低下させてもよい（食前のインスリンにおいて食事当たり0.7%）。食事前のインスリンが次第に減らされた場合、DPP-4 阻害剤、GLP-1 受容体アゴニスト、メグリチニド、およびスルホニル尿素を含む、食後のグルコースを低下させるために作用する他の作用物質は、次第に減らされてもよい。一旦インスリンが次第に減らされたら、メトホルミンおよび/またはチアゾリジンジオンを含む他の基本の作用物質は、次第に減らされてもよい。

30

40

【0191】

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、または Reg 受容体に対する刺激性抗体は、刺激されたC-ペプチドレベルが正常な範囲内にある場合および最適化された血糖コントロールがインスリンを含む他の糖尿病性作用物質または作用物質および注射用作用物質の使用を伴うことなく達成された場合、中断することができる。処置の期間を通じて、患者は、糖尿病医療チームにグルコース値をフィードバック

50

するために、電話、電子メール、またはオフィス訪問を介して毎日連絡してもよい。グルコース値に基づいて、基本および食前のインスリン投薬量におけるより積極的な低下が、それぞれ、食前および食後のグルコースレベルに基づいて行われてもよい。

#### 【0192】

##### 実施例 6

##### Perle ペプチドのエキスピボにおける使用

本発明は、管、腺房、および前駆体胚性組織を含むヒト島外組織、ヒト幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯幹細胞、または他の幹細胞を含んでいてもよく、また、Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびペプチド模倣薬として果たすPerle 受容体の特定の結合領域に対して生成された抗体の追加によってベータ細胞に形質転換するのが促進される成人膵臓内に存在する内因性幹細胞の常在性の集団を含んでいてもよい前駆細胞からの新たなベータ細胞のエキスピボ生成のために利用された場合の、Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびペプチド模倣薬として果たすPerle 受容体の特定の結合領域に対して生成された抗体によって生成された新たなベータ細胞の形成および送達のための方法を含む。新たなベータ細胞は、Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびペプチド模倣薬として果たすPerle 受容体の特定の結合領域に対して生成された抗体から、新たなベータ細胞への本明細書における本発明を使用するエキスピボ形質転換で生成される。新たなベータ細胞は、糖尿病前症、1型および2型糖尿病、ならびにベータ細胞欠乏症の他の状態を有する患者に、器官特異的なターゲティングありおよびなしの、臍静脈、門脈系統、肝大動脈、皮下送達を介しての送達を含む経口、静脈内を含み、膵臓または肝臓への直接的な投与を含んでいてもよい送達のルートによりその後送達される(図16)。

#### 【0193】

Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびペプチド模倣薬として果たすPerle 受容体の特定の結合領域に対して生成された抗体は、次いで、管、腺房、および前駆体組織、胚性幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯幹細胞、または他の幹細胞を含み、新たなベータ細胞を形成するために成人の膵臓内に存在する内因性幹細胞の常在性の集団を含んでいてもよいヒト島外組織にエキスピボで投与される。新たなベータ細胞は、Perle ペプチド、誘導体、最適化されたバージョン、ペプチド模倣薬、およびPerle 受容体の特定の結合領域に対して生成された抗体の、成人の膵臓内の存在する内因性幹細胞の常在性の集団を含み、新たなベータ細胞の形成を亢進してもよい、ヒト胚性幹細胞、ヒト成人骨髄由来細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯幹細胞、または他の幹細胞のエキスピボ培養物への送達によって生成される。次いで、これらのベータ細胞は、糖尿病前症、1型および2型糖尿病ならびにベータ細胞欠乏症の他の状態を有する患者に、器官特異的なターゲティングありおよびなしの、臍静脈、門脈系統、肝大動脈、皮下送達を介しての送達を含む経口、静脈内を含み、膵臓または肝臓への直接的な投与を含んでいてもよい送達のルートにより送達される。

#### 【0194】

本発明は、膵臓ベータ細胞生成のための方法を含み、インスピボおよびエキスピボベータ細胞生成の両方ならびに新たに発症したおよびすでに存在している1型および2型糖尿病、成人潜在性自己免疫糖尿病(LADA)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ-65抗体である陽性自己免疫抗体マーカーを有する人々、糖尿病前症ならびに高血糖症、グルコース不耐性およびベータ細胞機能障害または欠乏症、インスリン抵抗性の疾患、肥満、糖尿病の発達前の肥満、糖尿病前症に至る子供における肥満、小児期および青年期における1型および2型糖尿病の両方を含む関連する状態の疾患を有する人々を含むが、これらに限定されない、1型糖尿病の危険性がある人々を処置するための方法を含み、多嚢胞性卵巣症候群、非アルコール性脂肪性肝炎、高脂血症および高トリグリセリド血症、ならびに有効量のインスリンの欠乏に係るまたはそれを欠く他の状態などのような状態を含むが

、これらに限定されない。

【0195】

一方の研究は、Perleペプチド誘導体、製剤、最適化されたバージョン、およびPerle受容体に対する刺激性抗体を含むPerleペプチドペプチド模倣薬の、プラセボ以上のあらゆる島新生に対する影響を検出し、測定するために、妊娠中期ヒト胎児膵臓組織培養物、間葉系幹細胞の用量反応比較を実証するために設計する。ベータ細胞を含む島クラスターの評価は、膵臓組織の部分的な酵素消化によって得られ、また、これらを、Perleペプチド誘導体、製剤、最適化されたバージョン、およびPerle受容体に対する刺激性抗体を含むPerleペプチドペプチド模倣薬の存在下または非存在下において3日間、培養する。次いで、ベータ細胞を含有する島クラスターをホルマリン中に固定し、組織学的切出しならびにホルモンインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、および膵臓ポリペプチドならびに膵管マーカーCK19についての免疫組織化学的染色前にパラフィンブロック中に包埋した。それぞれおよびCK19について陽性の細胞のパーセンテージを数える。最低6回の別々の反復実験について決定する。

10

【0196】

他方の研究において、Perleペプチド、誘導体、製剤、最適化されたバージョン、およびPerle受容体に対する刺激性抗体を含むPerleペプチドペプチド模倣薬の場合に、全体的なあらゆる島新生およびベータ細胞を検出し、測定するために、正常血糖免疫不全マウスの中に移植した妊娠中期ヒト胎児膵臓組織において、プラセボならびにPerleペプチド誘導体、製剤、最適化されたバージョン、およびPerle受容体に対する刺激性抗体を含むPerleペプチドペプチド模倣薬の間の用量反応比較をエキスビボにおいて行い、プラセボと比較する。

20

【0197】

ヒト胎児膵臓組織は、13～20週間の妊娠期間の間の妊娠の治療の終結から得られる。ベータ細胞を含有する島様の細胞クラスターを、膵臓組織の部分的な酵素消化によって得、これらを3日間培養する。次に、ベータ細胞を含む島クラスターを、NOD/SCIDマウスの腎臓被膜の下に移植し、マウスに毎日注射するまたはプラセボを注射する。最低6匹のマウスをそれぞれのグループにおいて使用する。ベータ細胞を含有する島様の細胞クラスターを移植した4週間後、マウスを安楽死させ、移植片を分析のために取り出す。それらをホルマリン中に固定し、組織学的切出しならびにホルモンインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、および膵臓ポリペプチドならびに膵管マーカーCK19についての免疫組織化学的染色前にパラフィンブロック中に包埋した。それぞれのホルモンおよびCK19について陽性の細胞のパーセンテージを数え、Perle受容体に対する刺激性抗体を含むPerleペプチドペプチド模倣薬の間で比較をエキスビボにおいて行い、プラセボと比較する。

30

【0198】

糖尿病性免疫不全マウスの中に移植された妊娠中期ヒト胎児膵臓組織におけるPerleペプチド誘導体、製剤、最適化されたバージョン、およびPerle受容体に対する刺激性抗体を含むPerleペプチドペプチド模倣薬対プラセボの用量反応比較を評価する。様々な投薬量のPerle受容体に対する刺激性抗体を含むPerleペプチドペプチド模倣薬の影響は、プラセボ以上の島新生およびベータ細胞生成を検出し、測定するために、エキスビボにおいて行い、プラセボと比較する。

40

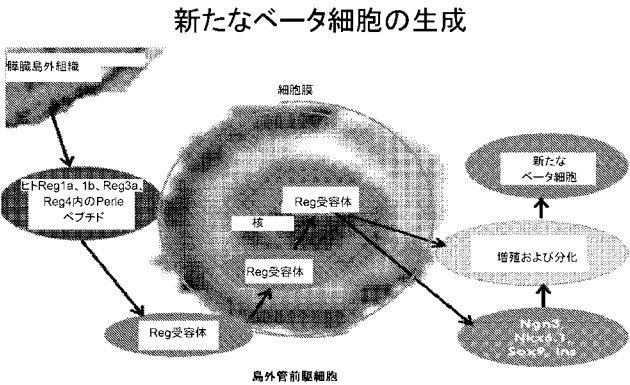
【産業上の利用可能性】

【0199】

開示された本発明は、糖尿病の処置において価値があるであろう。

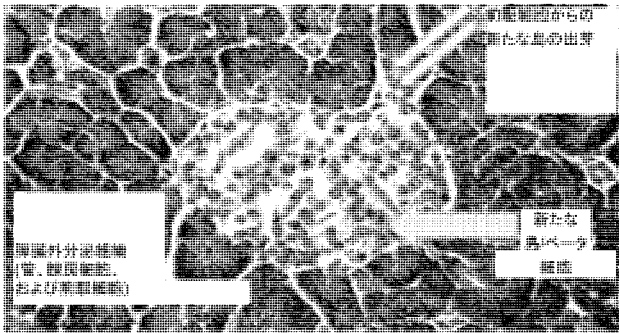
【 図 1 】

新たなベータ細胞の生成



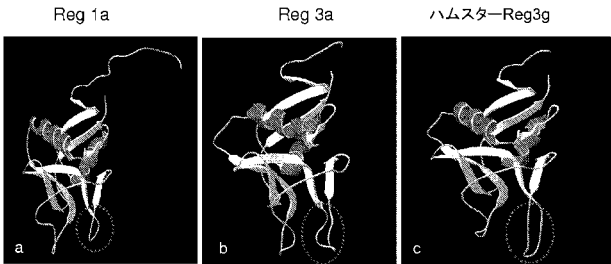
【 図 2 】

前駆細胞からの  
島出芽



【 図 3 】

ヒトRegの構造



赤色の円で囲まれる結合アームは、ヒトReg1a、Reg3a、およびハムスターReg3ガンマの間の相同な配列領域を示した

【 図 4 】

Reg遺伝子における相同なペプチド配列

ヒトReg1a  
MAQTSSYFMIISCLMFLSOSQGOEAQTLPQARISCPPEGTNAYRSYCYFFNEDRETWVDADLYCONMNSGNL  
VSVLTQAEAGAFVASLIKESGTDDEFWIGLHDPKKNRRWHWSSGSLVSKWSWIGAPSSVNPVGYCVSLTS  
STGFQKWKDVPCEKFSFYCKFKN

ヒトReg1b  
MAQTNSFFMLIISCLMFLSOSQGOESQTELPNPRISCPPEGTNAYRSYCYFFNEDPETWVDADLYCONMNSGNLV  
SVLTQAEAGAFVASLIKESGTDDEFWIGLHDPKKNRRWHWSSGSLVSKSWDTGSPSSANAGYCASLTSC  
SGFKKWKDSECKKFSFYCKFKN

ヒトReg3a  
MLPPMALPVSVMWMLLSCLMFLSOSQGOEAPQHELPQARISCPPEGTNAYRSYCYFFNEDPETWVDADLYCONMNSGNLV  
SVLTQAEAGAFVASLIKESGTDDEFWIGLHDPKKNRRWHWSSGSLVSKWSWIGAPSSVNPVGYCVSLTS  
STGFQKWKDVPCEKFSFYCKFKN

ヒトReg IV  
MASRSMRLLLLLSCLAKTGVLDIIMRPSCAPGWFFYHKSNICYGFRKLNNWSDAELECGSYNGAHLASLSLK  
CASTIACYISGYQRSQPIWIGLHDPKKNRRWHWSSGSLVSKWSWIGAPSSVNPVGYCVSLTS  
STGFQKWKDVPCEKFSFYCKFKN

ハムスターReg3ガンマ  
MLPMTLCRMSWMLLSCLMFLSOSQGOEESQKLPSSRITCPQGSVAYGYSYCLILIPQT  
WSNAELSCMHFSGHLAFLSTGEITFVSSLVK--NSLTAYQYIWIGLHDPKKNRRWHWSSGSLVSKWSWIGAPSSVNPVGYCVSLTS  
STGFQKWKDVPCEKFSFYCKFKN

【 図 5 】

配列番号8  
多くの種に共通

|        |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ヒト     | W | I | G | L | H | D | P | T |
| チンパンジー | W | I | G | L | H | D | P | T |
| マウス    | W | I | G | L | H | D | P | T |
| 雌ウシ    | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ヒツジ    | W | I | G | L | H | D | P | T |

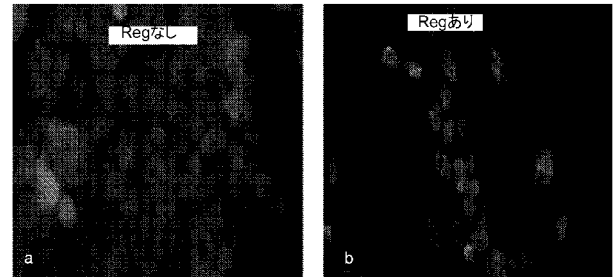
【図 6】

### Reg結合部位を有する Reg受容体の919アミノ酸配列

MTGYTMLRNGGAGNGGQTCMLRWSNRIRLTWLSFTLFVILVFFPLIAHYLTLD  
EADKAGKRIFGPRVGNELCEVHVLDCRIRSVSEELLQLEAKROELNSEIAKLN  
LKIEACKKSIENAKQDLLQLKNVISQTEHSYKELMAONQPKLSLPIRLPEKD  
DAGLPPPKATRGCRLLHNCFDYSRCPLTSGFPVYVYDSQDFVFGSYLDPLVKQAF  
QATARANVYVTENADIACLYVILVGMQEPVVL RPAELEKQLYSLPHWRDGHN  
HVIINLSRKSDTQNLNLYNVSTGRAMVAQSTFYTVQYRPGFDLVVSPLVHAMSEPN  
FMEIPPQVPVKRYLFTFQGEKIESLRSSLOEARSFEEMEEDPPADYDDRIATL  
KAVQDSKLDQVLVEFTCKNQPKSLPTEWALCGEREDRLELLKLSTFALIITPGD  
PRLVISGCGATHLEALEVGAVPVVLGEQVQLPYQDMLQWNEAALVVPKPHVTE  
VHFLRLSLSDSLLAMRRQGRFLWETVSTADSIINTVLAMIRTRIQIPAAPIREEA  
AAEIPHRSGKAAGTDPNMADNGDLGLGVETEPYASPRYLRFNFTLVTDYFYS  
WNCAPGPFHLPHTPFDPLPSEAKFLGSGTGFRPIGGGAGGSGKEFQAALGG  
NVPREQFTVVMILTYEREVLNMSLERLNGLPYLKVVVVWNSPKLPSEDLLWPD  
IGVPMVVRTEKNLSLNNRFLPWNEIETAILSDDDAHLRHDEIMFGFRVWREARD  
RIVGFPGRYHAWDIPHQSWLYNSNYSCELSMVLTGAFFHKYAYLYSYVMPQA  
IRDMVDEYINCEDIAMNFLVSHITRKPKIKVTSRWTFRCPCGQALSHDDSHFHE  
RHKCINFFVKVGYMPLLYTQFRVDSVLFKTRLPHDKTKCKFKFI.

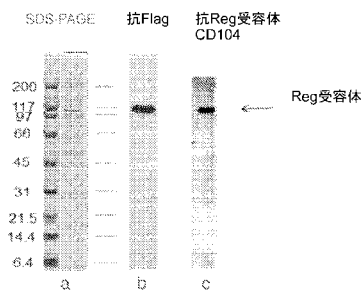
【図 8】

### ヒト臍管組織上のReg受容体



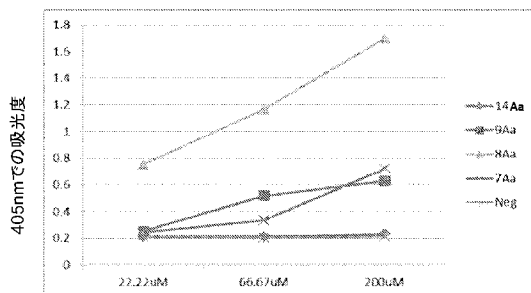
【図 7】

### Reg受容体の精製および検出



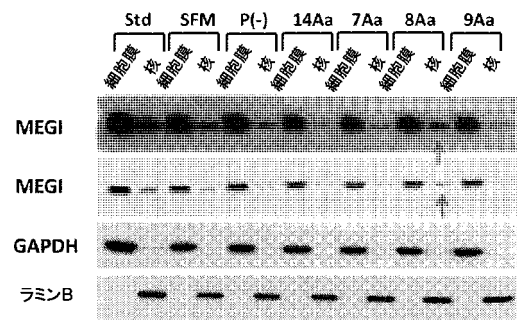
【図 9】

### Reg受容体へのPerleペプチドの 直接的な結合の検出



【図 10】

### ウェスタンブロット分析





【図 1 1】

**COVANCE**  
The Covance Laboratory Services Company

## EIA力価アッセイ結果概要

研究者: Claretta Levitan  
種: SPFウサギ  
免疫原: CCKLT... + CCKSS... KLF  
スクリーニングAg: CCKSS...  
濃度: 1ng/mL

| サンプル            | コントロール(ネガティブ)   | コントロール(ポジティブ) |
|-----------------|-----------------|---------------|
| 採血タイプ: 試験       | 採血タイプ: 免疫前      | 抗オハルブミン(ウサギ)  |
| 採血日: 2011年1月28日 | 採血日: 2010年12月8日 | 1:750,000に希釈  |
|                 | 50%の力価          | 平均値(O.D.)     |
| 動物ID            | コントロール(ネガティブ)   | コントロール(ポジティブ) |
| CD 153          | <100            | 0.667         |
| CD 154          | <100            |               |

ブランク: 0.033  
ブランク標準偏差: 0.065  
ノイズカットオフ: 0.047  
オペレーター: JH  
収集日: 2011年2月2日4:00PM

【図 1 2】

## Reg受容体内の21アミノ酸配列に対する抗体の開発のためのプロトコル

ウサギタンパク質 イベントスケジュール、118日

## イベントの標準的なスケジュール

| 日      | イベント  |
|--------|---|
| 0      | SPFウサギ<br>免疫前採血(平均5mLの血液)<br>SC, 250マイクログラム FCAあり |
| 21     | 追加免疫SC, 125マイクログラム FIAあり                          |
| 37     | 試験採血(平均5mLの血液)                                    |
| 32-38  | 採血のELISAカセット                                      |
| 42     | 追加免疫SC, 125マイクログラム FIAあり                          |
| 52     | 試験採血(平均5mLの血液)                                    |
| 62     | 追加免疫SC, 125マイクログラム FIAあり                          |
| 72     | 本番の採血(平均20mLの血液)                                  |
| 84     | 追加免疫SC, 125マイクログラム FIAあり                          |
| 94     | 本番の採血(平均20mLの血液)                                  |
| 95-101 | 採血のELISAカセット                                      |
| 105    | 追加免疫SC, 125マイクログラム FIAあり                          |
| 115    | 本番の採血(平均20mLの血液)                                  |
| 118    | 最後の採血(平均50mLの血液)                                  |

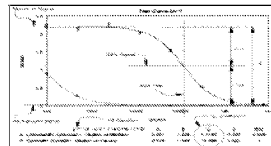
【図 1 3】

**COVANCE**  
The Covance Laboratory Services Company

50%力価は、最大濃度(50%)を示し、抗体の希釈度である。ここで報告される50%力価は、全データセットに対するlog10平均値に基づき、

50%力価は、このアッセイにおける各サンプルについての最大のシグナル(免疫反応)と最小バックグラウンドシグナルの間の差(Δ)の半分と等しいシグナルを示すであろうサンプルの希釈度である。希釈log-log形式(図)において下記に示される(Fit Equation 16)。  
血中濃度データをフィットさせるために使用される場合、(1)希釈は50%力価となる。右に示される例において、Unknown#1についての50%力価は約1:7,000である。Control#1についての50%力価も、使用した最も高い希釈である(1:100)より大幅に低く決定することができない。これはデータが最大シグナルに関する情報を含んでいないからである。

\*\*\* 50%力価の例 \*\*\*



以下は、50%力価の範囲の範囲を分析する場合、参考として使用されてもよい。

<5000 非常に低い  
5000-15,000 低い  
15,000-50,000 平均  
50,000-100,000 良好  
>100,000 高い

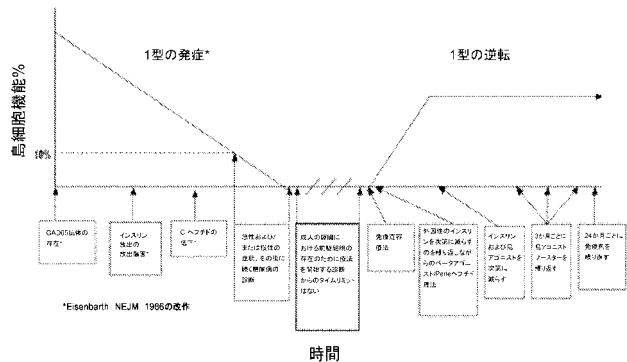
以下は、50%力価の範囲の範囲を分析する場合、参考として使用されてもよい。

<1000 非常に低い  
1,000-5,000 低い  
5,000-10,000 平均  
10,000-20,000 良好  
>20,000 高い

\*\*\* これらのガイドラインは50%力価を代表するものである。 \*\*\*

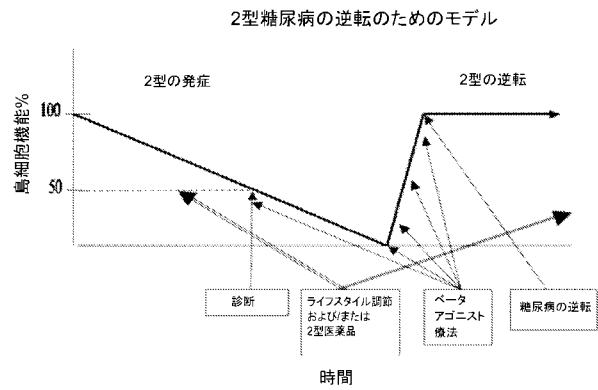
【図 1 4】

## 1型糖尿病の逆転のためのモデル

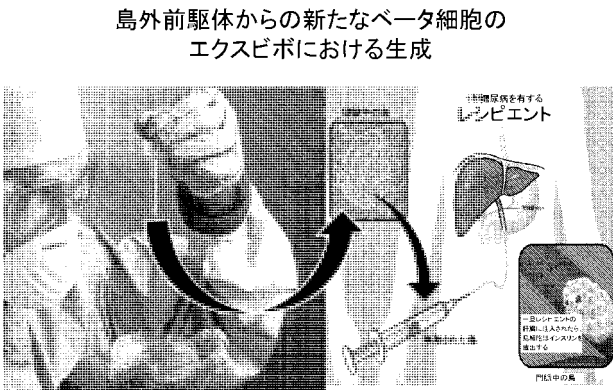


\*Eisenbarth NEJM 1996の改作

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

配列番号1

他の哺乳動物に100%相同性

|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ヒト              | N | V | W | I | G | L | H | D | P |
| チンパンジー          | N | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ラット             | N | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ゴールデンハムスター      | N | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ホオジロテナガザル       | N | V | W | I | G | L | H | D | P |
| スマトラ島のオランウータン   | N | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ローランドゴリラ        | N | V | W | I | G | L | H | D | P |
| 白い房状の耳をしたマーモセット | N | V | W | I | G | L | H | D | P |

【 図 1 8 】

配列番号4

他の哺乳動物に100%相同性

|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ヒト              | V | W | I | G | L | H | D | P |
| チンパンジー          | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ラット             | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ゴールデンハムスター      | V | W | I | G | L | H | D | P |
| モルモット           | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ウサギ             | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ブタ              | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ヒツジ             | V | W | I | G | L | H | D | P |
| 雌ウシ             | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ホオジロテナガザル       | V | W | I | G | L | H | D | P |
| スマトラ島のオランウータン   | V | W | I | G | L | H | D | P |
| ローランドゴリラ        | V | W | I | G | L | H | D | P |
| 白い房状の耳をしたマーモセット | V | W | I | G | L | H | D | P |

【 図 1 9 】

配列番号8

他の哺乳動物に100%相同性

|                |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ヒト             | W | I | G | L | H | D | P | T |
| チンパンジー         | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ラット            | W | I | G | L | H | D | P | T |
| マウス            | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ゴールデンハムスター     | W | I | G | L | H | D | P | T |
| モルモット          | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ウサギ            | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ブタ             | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ヒツジ            | W | I | G | L | H | D | P | T |
| 雌ウシ            | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ホオジロテナガザル      | W | I | G | L | H | D | P | T |
| スマトラ島のオランウータン  | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ローランドゴリラ       | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ヨーロッパの家畜のフェレット | W | I | G | L | H | D | P | T |

【図 2 0】

配列番号7  
他の哺乳動物に100%相同性

|                 |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| ヒトBRAD 4        | W | I | G | L | H | D | P |
| チンパンジー          | W | I | G | L | H | D | P |
| ラット             | W | I | G | L | H | D | P |
| マウス             | W | I | G | L | H | D | P |
| ゴールデンハムスター      | W | I | G | L | H | D | P |
| モルモット           | W | I | G | L | H | D | P |
| ウサギ             | W | I | G | L | H | D | P |
| ブタ              | W | I | G | L | H | D | P |
| ヒツジ             | W | I | G | L | H | D | P |
| 雌ウシ             | W | I | G | L | H | D | P |
| ホオジロテナガザル       | W | I | G | L | H | D | P |
| スマトラ島のオランウータン   | W | I | G | L | H | D | P |
| ローランドゴリラ        | W | I | G | L | H | D | P |
| 白い肩状の耳をしたマーモセット | W | I | G | L | H | D | P |
| ヨーロッパの霊猫のフェレット  | W | I | G | L | H | D | P |

【図 2 1】

配列番号14  
他の哺乳動物に100%相同性

|               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ヒト            | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| チンパンジー        | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ラット           | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| マウス           | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ゴールデンハムスター    | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| モルモット         | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ウサギ           | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ブタ            | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ヒツジ           | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| 雌ウシ           | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ホオジロテナガザル     | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| スマトラ島のオランウータン | V | W | I | G | L | H | D | P | T |
| ローランドゴリラ      | V | W | I | G | L | H | D | P | T |

【配列表】



2015533821000001.xml

【図 2 2】

配列番号9  
他の哺乳動物に100%相同性

|                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ヒト                | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | H | V | I | S |   |
| チンパンジー            | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| ラット               | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| マウス               | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| マウス               | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| モルモット             | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| ウサギ               | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| イヌ                | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| 雌ウシ               | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| ハイロジネズミオボッサム      | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| コミカガザ(Sh. galago) | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| ホオジロテナガザル         | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| スマトラ島のオランウータン     | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| アカガザル             | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| ローランドゴリラ          | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| 白い肩状の耳をしたマーモセット   | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| ウマ                | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |
| タスマニアデビル          | C | K | K | S | I | E | N | A | K | Q | D | L | L | Q | L | K | N | V | I | S |

## 【 国際調査報告 】

|   |   |  |
|---|---|--|
| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>  |   | International application No.<br><b>PCT/US2013/061947</b>  |
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>  |   |  |
| <b>C07K 14/47(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i</b>   |   |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>   |   |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K 14/47; C07K 100; A61K 38/02; C07K 7/06; C07K 14/00; C07K 2/00; A61K 38/10; C07K 19/00; A61K 38/17; C07K 16/28; G01N 33/53   |   |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Korean utility models and applications for utility models<br>Japanese utility models and applications for utility models   |   |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>eCOMPASS(KIPO internal) & keywords: isolated peptide, regenerating islet-derived (Reg) protein, progenitor cell   |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |   |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| X   | US 2011-0171178 A1 (LEVETAN, CLARESA S. et al.) 14 July 2011<br>See claims 12 and 17.   | 17   |
| A   |   | 1-16, 18-60, 87-95   |
| X   | US 2007-0087971 A1 (LEVETAN, CLARESA S. et al.) 19 April 2007<br>See claims 1 and 3.  | 17   |
| A   |   | 1-16, 18-60, 87-95   |
| A   | US 6812326 B2 (SATO, TAKA-AKI) 02 November 2004<br>See abstract; claim 4.   | 1-60, 87-95  |
| A   | US 5834590 A (VINIK, AARON I. et al.) 10 November 1998<br>See column 4, lines 13-20.  | 1-60, 87-95  |
| A   | OKAMOTO, HIROSHI, "The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic $\beta$ -cells", Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, September 1999, Vol. 6, No. 3, pp. 254-262.<br>See abstract. | 1-60, 87-95  |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.  |   |  |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> |   |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>23 December 2013 (23.12.2013)  |   | Date of mailing of the international search report<br><b>27 December 2013 (27.12.2013)</b>   |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br> Korean Intellectual Property Office<br>189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City,<br>302-701, Republic of Korea<br>Facsimile No. +82-42-472-7140   |   | Authorized officer<br>HEO, Joo Hyung<br>Telephone No. +82-42-481-8150<br> |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
**PCT/US2013/061947****Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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.: 61-86,96-112  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 61-86 and 96-112 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
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:
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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2013/061947**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2011-0171178 A1                        | 14/07/2011          | AU 2009-292913 A1          | 05/03/2009          |
|   |                     | CA 2698100 A1              | 05/03/2009          |
|   |                     | CN 101896499 A             | 24/11/2010          |
|   |                     | CO 6270235 A2              | 20/04/2011          |
|   |                     | EA 201000399 A1            | 28/02/2011          |
|   |                     | EP 2193142 A1              | 09/06/2010          |
|   |                     | JP 2010-538017 A           | 09/12/2010          |
|   |                     | KR 10-2010-0080519 A       | 08/07/2010          |
|   |                     | MA 31822 B1                | 01/11/2010          |
|   |                     | NZ 583679 A                | 25/05/2012          |
|   |                     | WO 2009-029847 A1          | 05/03/2009          |
|   |                     | WO 2009-029847 A8          | 05/11/2009          |
| US 2007-0087971 A1                        | 19/04/2007          | CA 2609667 A1              | 30/11/2006          |
|   |                     | CA 2609667 C               | 22/02/2011          |
|   |                     | CA 2726759 A1              | 30/11/2006          |
|   |                     | EA 013821 B1               | 30/08/2010          |
|   |                     | EA 200702625 A1            | 30/06/2008          |
|   |                     | EP 1883417 A2              | 06/02/2008          |
|   |                     | EP 2295066 A1              | 16/03/2011          |
|   |                     | JP 2008-545712 A           | 18/12/2008          |
|   |                     | US 2008-0300190 A1         | 04/12/2008          |
|   |                     | US 2010-0093605 A1         | 15/04/2010          |
|   |                     | US 2011-0280833 A1         | 17/11/2011          |
|   |                     | US 7393919 B2              | 01/07/2008          |
|   |                     | US 7714103 B2              | 11/05/2010          |
|   |                     | US 7989415 B2              | 02/08/2011          |
|   |                     | WO 2006-128083 A2          | 30/11/2006          |
|   |                     | WO 2006-128083 A3          | 19/07/2007          |
| US 6812326 B2                             | 02/11/2004          | AU 2000-49899 A            | 17/04/2000          |
|   |                     | CA 2343656 A1              | 06/04/2000          |
|   |                     | JP 2002-525126 A           | 13/08/2002          |
|   |                     | US 2003-0139584 A1         | 24/07/2003          |
|   |                     | WO 00-18959 A1             | 06/04/2000          |
| US 05834590 A                             | 10/11/1998          | US 0039299 E1              | 19/09/2006          |
|   |                     | WO 96-26215 A1             | 29/08/1996          |

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. |         |           | F I     |         | テーマコード (参考) |           |
|-------------|---------|-----------|---------|---------|-------------|-----------|
| A 6 1 K     | 45/06   | (2006.01) | A 6 1 K | 39/395  | D           | 4 C 0 8 5 |
| A 6 1 P     | 43/00   | (2006.01) | A 6 1 K | 45/06   |             | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 K     | 31/436  | (2006.01) | A 6 1 P | 43/00   | 1 0 7       | 4 C 0 8 7 |
| A 6 1 K     | 31/706  | (2006.01) | A 6 1 K | 31/436  |             | 4 C 2 0 6 |
| A 6 1 K     | 39/04   | (2006.01) | A 6 1 K | 31/706  |             | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 K     | 39/00   | (2006.01) | A 6 1 K | 39/04   |             |           |
| A 6 1 K     | 31/343  | (2006.01) | A 6 1 K | 39/00   | H           |           |
| A 6 1 K     | 31/592  | (2006.01) | A 6 1 K | 31/343  |             |           |
| A 6 1 K     | 31/593  | (2006.01) | A 6 1 K | 31/592  |             |           |
| A 6 1 K     | 38/21   | (2006.01) | A 6 1 K | 31/593  |             |           |
| A 6 1 K     | 38/55   | (2006.01) | A 6 1 K | 37/66   | G           |           |
| A 6 1 K     | 38/28   | (2006.01) | A 6 1 K | 37/64   |             |           |
| A 6 1 K     | 31/7034 | (2006.01) | A 6 1 K | 37/26   |             |           |
| A 6 1 K     | 31/48   | (2006.01) | A 6 1 K | 31/7034 |             |           |
| A 6 1 K     | 31/365  | (2006.01) | A 6 1 K | 31/48   |             |           |
| A 6 1 K     | 31/155  | (2006.01) | A 6 1 K | 31/365  |             |           |
| A 6 1 K     | 31/64   | (2006.01) | A 6 1 K | 31/155  |             |           |
| A 6 1 K     | 31/195  | (2006.01) | A 6 1 K | 31/64   |             |           |
| A 6 1 K     | 38/26   | (2006.01) | A 6 1 K | 31/195  |             |           |
| A 6 1 K     | 31/437  | (2006.01) | A 6 1 K | 37/28   |             |           |
| A 6 1 P     | 3/10    | (2006.01) | A 6 1 K | 31/437  |             |           |
| A 6 1 P     | 3/04    | (2006.01) | A 6 1 P | 3/10    |             |           |
| A 6 1 P     | 37/06   | (2006.01) | A 6 1 P | 3/04    |             |           |
| A 6 1 P     | 15/00   | (2006.01) | A 6 1 P | 37/06   |             |           |
| A 6 1 P     | 1/16    | (2006.01) | A 6 1 P | 15/00   |             |           |
| A 6 1 P     | 3/06    | (2006.01) | A 6 1 P | 1/16    |             |           |
| C 0 7 K     | 16/28   | (2006.01) | A 6 1 P | 3/06    |             |           |
| C 1 2 N     | 15/09   | (2006.01) | A 6 1 P | 43/00   | 1 1 1       |           |
| C 1 2 N     | 1/15    | (2006.01) | C 0 7 K | 16/28   |             |           |
| C 1 2 N     | 1/19    | (2006.01) | C 1 2 N | 15/00   | A           |           |
| C 1 2 N     | 1/21    | (2006.01) | C 1 2 N | 1/15    |             |           |
| C 1 2 N     | 5/10    | (2006.01) | C 1 2 N | 1/19    |             |           |
| C 1 2 N     | 5/074   | (2010.01) | C 1 2 N | 1/21    |             |           |
| A 6 1 K     | 35/39   | (2015.01) | C 1 2 N | 5/00    | 1 0 1       |           |
| A 6 1 K     | 35/545  | (2015.01) | C 1 2 N | 5/00    | 2 0 2 D     |           |
| A 6 1 K     | 35/28   | (2015.01) | A 6 1 K | 35/39   |             |           |
| A 6 1 K     | 35/51   | (2015.01) | A 6 1 K | 35/545  |             |           |
| A 6 1 K     | 35/50   | (2015.01) | A 6 1 K | 35/28   |             |           |
| A 6 1 K     | 35/44   | (2015.01) | A 6 1 K | 35/51   |             |           |
| A 6 1 K     | 35/55   | (2015.01) | A 6 1 K | 35/50   |             |           |
| C 1 2 P     | 21/08   | (2006.01) | A 6 1 K | 35/44   |             |           |
|             |         |           | A 6 1 K | 35/55   |             |           |
|             |         |           | C 1 2 P | 21/08   |             |           |

(31)優先権主張番号 61/706,225

(32)優先日 平成24年9月27日(2012.9.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 13/662,232  
 (32)優先日 平成24年10月26日(2012.10.26)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(72)発明者 クラレッサ レヴェタン

米国, ペンシルバニア州 19010, プリン マー, ヒッコリー レーン 103

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA01 CA04 CA06 DA02 DA05 EA04 GA11 HA01  
 4B064 AG20 AG27 CA01 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01  
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24  
 CA44  
 4C076 AA19 BB01 BB13 BB14 BB15 BB16 CC21  
 4C084 AA02 AA07 AA17 AA19 AA20 BA01 BA08 BA17 BA18 BA23  
 BA44 DA11 DA22 DB34 DB35 DC34 DC50 MA24 MA52 MA66  
 NA05 NA14 ZA701 ZA751 ZA811 ZB081 ZB082 ZB112 ZB221 ZC202  
 ZC331 ZC351 ZC352 ZC412 ZC422  
 4C085 AA03 AA13 AA14 AA15 BA09 CC23  
 4C086 AA01 BA06 BC17 CB05 CB22 DA14 DA21 EA04 EA08 MA02  
 MA04 ZA70 ZA75 ZA81 ZB08 ZB22 ZC33 ZC35 ZC41  
 4C087 AA01 AA02 BB44 BB51 BB57 BB58 BB59 BB63 MA02 MA52  
 MA66 NA14 ZA70 ZA75 ZA81 ZB08 ZB22 ZC33 ZC35 ZC41  
 4C206 AA01 GA07 GA36 HA31 MA02 MA04 NA05 ZA70 ZA75 ZA81  
 ZB08 ZB22 ZC33 ZC35 ZC41  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA14 BA15 BA30 BA41 BA57 CA40  
 DA50 DA75 DA76 EA20 EA50 FA10 FA71 GA26