

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014 年 5 月 1 日(01.05.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/065341 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 45/00 (2006.01) A61P 21/02 (2006.01)  
A61K 38/04 (2006.01) C07K 14/46 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/078743
- (22) 国際出願日: 2013 年 10 月 23 日(23.10.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2012-234300 2012 年 10 月 24 日(24.10.2012) JP
- (71) 出願人: 第一三共株式会社(DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 松尾 剛(MATSUO, Tsuyoshi); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町 6 丁目 4 番 3 号 アスビオファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 村山 宣人(MURAYAMA, Norihito); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町 6 丁目 4 番 3 号 アスビオファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 古谷 真優美(FURUYA, Mayumi); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町 6 丁目 4 番 3 号 アスビオファーマ株式会社内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 石橋 公樹, 外(ISHIBASHI Koki et al.); 〒1400005 東京都品川区広町一丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, IR, 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, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

(54) 発明の名称: 筋萎縮性側索硬化症治療剤

(57) Abstract: The present invent addresses the problem of providing a medicine for treating amyotrophic lateral sclerosis, a disease for which there is currently no effective therapeutic agent, and provides a therapeutic agent for amyotrophic lateral sclerosis that contains a growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) agonist or a pharmaceutically acceptable salt thereof. The therapeutic agent for amyotrophic lateral sclerosis contains a GHS-R agonist such as ghrelin and is for administration to an individual who is suffering from amyotrophic lateral sclerosis and who does not exhibit severe dysphagia. The individual may be an individual who is unresponsive or insufficiently responsive to existing therapeutic agents for ALS.

(57) 要約: 成長ホルモン分泌促進因子受容体(GHS-R)作動薬又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する筋萎縮性側索硬化症治療剤。現在有効な治療薬のない筋萎縮性側索硬化症に対する医薬品を提供することを課題とする。嚥下障害が重篤でない筋萎縮性側索硬化症に罹患している個体を投与対象とするグレリンに代表される GHS-R 作動薬を有効成分とする筋萎縮性側索硬化症治療剤。当該個体が既存の ALS 治療剤に不応性又は応答が不十分な個体であってもよい。



WO 2014/065341 A1

## 明 細 書

発明の名称：筋萎縮性側索硬化症治療剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬を有効成分として含有する筋萎縮性側索硬化症治療剤に関する。

### 背景技術

[0002] 筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis；以下、ALS）は成人の最も一般的な運動神経疾患で、上位及び下位運動神経細胞が選択的かつ系統的に死滅する神経変性疾患である。運動神経細胞死の結果、上肢、及び下肢の筋肉萎縮、筋力低下が進行し、この間に言語障害、嚥下困難などの球麻痺症状及び呼吸筋麻痺が加わる経過をとることが多い。ALSは主に中年以降に発症し、人工呼吸器による呼吸管理を行わない場合、多くの患者が発症後2～3年で呼吸不全のために死亡にいたる重篤な疾患である。呼吸筋を含めた全身の筋萎縮及び筋力低下にもかかわらず、知能などの高次機能や感覚は保たれる（非特許文献1）。

[0003] ALSの原因遺伝子の一つとしてCu/Zn superoxide dismutase(SOD1)が挙げられている。ALS患者で同定された変異SOD1遺伝子をマウスやラットに導入することにより、ヒトALSの病態と同様に、成熟後に運動神経細胞が選択的に死滅し、骨格筋萎縮や筋力低下が進行し、死亡することが分かり、これらの変異SOD1遺伝子導入マウスやラットがALSモデル動物として確立され、ALSの病態解析や治療剤の探索に汎用されている。特にヒトSOD1の93位Gly(G)のAla(A)置換タンパク質を発現するトランスジェニックマウス、即ち変異SOD1遺伝子(G93A)導入マウス（以下、SOD1<sup>G93A</sup>マウス）を用いた研究が最も進んでおり、本動物を用いた評価が欧州ALS/MND学会で推奨されている（非特許文献2）。

[0004] 現在、全世界で認可されているALS治療剤はリルゾール（riluzole）のみである。本薬はALS発症要因の一つとされるグルタミン酸毒性に拮抗するが、その延命効果は数ヶ月に過ぎず、効果は限定的なものである（非特許文献1）。

[0005] グレリン(ghrelin)は成長ホルモン分泌促進因子受容体 (Growth Hormone Secretagogue Receptor ; 以下、GHS-R) の内因性リガンドとして発見されたペプチドホルモンである (非特許文献3) 。グレリンはヒト及び動物において成長ホルモン (Growth Hormone ; 以下、GH) 分泌を亢進させる (非特許文献4等) 。

GHは肝臓や骨格筋においてinsulin-like growth factor-1(以下、IGF-1)産生を促すこと、IGF-1は運動神経細胞の栄養因子のひとつであることが知られている。IGF-1遺伝子を含む組換えAAV4ウイルスベクターをSOD1<sup>G93A</sup>マウスの側脳室内に注入すると、生存期間が有意に延長し、運動機能及び筋力の低下が有意に抑制された (特許文献1) 。このようにIGF-1を脳内で強制発現させたときの効果が報告されているものの、SOD1<sup>G93A</sup>マウスの骨格筋でヒトIGF-1を過剰発現させても運動神経細胞死や生存期間に影響しなかった (非特許文献5) 。また、臨床でGH又はIGF-1をALS患者に投与したとき、GH療法は無効で (非特許文献6) 、IGF-1もALS患者の筋力、機能転帰、及び生存期間のいずれに対しても効果を示さなかった (非特許文献7) 。従って、末梢性のGH、IGF-1系の活性化がALSに有効であるとは言えない。グレリンも脳下垂体からのGH分泌を促進し、血中GH濃度を増加させるが (例えば、非特許文献3、4) 、脳内や脊髄でIGF-1を増加させる作用は知られていないので、グレリンがALS病態に対して有効であるか否かは不明である。

また、グレリンは末梢に存在する唯一の摂食亢進物質であり、ヒトや動物において摂食量を増加させることが報告されている (例えば、非特許文献4) 。しかし、ALSは運動神経細胞の死滅により骨格筋が萎縮し、筋力が低下し、死亡に至る疾患であるため、グレリンの投与によって摂食量が増加し、体重や骨格筋量が維持されるだけでは、運動神経細胞死の抑制との関係も不明であり、グレリンがALS病態に対して有効であるか否かは不明である。

[0006] 一方、ALS患者の中で血中LDL/HDL比が高く、高脂血症を呈する患者では、そうでない患者と比べて12ヶ月以上生存期間が長く、高脂血症がALSの予後規定因子であることが報告されている (非特許文献8) 。同様に、血中コレステ

ロールや中性脂肪濃度の高いALS患者では予後が良いことが報告されている（非特許文献9）。

マウスにグレリンを投与すると血中中性脂肪濃度には影響しなかったが、血中総コレステロール濃度を増加させたという報告があるが（非特許文献10）、グレリンが高脂血症の治療に有用であるという報告もある（特許文献2）。

また、慢性呼吸器炎症患者にグレリンを3週間反復投与したとき、体重や栄養状態を改善させたが、血中コレステロール濃度に影響しなかったことも報告されている（非特許文献11）。

以上のように、グレリンの血中コレステロールや中性脂肪に対する影響については一定の知見が得られていない。

[0007] 胎仔ラット海馬神経細胞をイオノマイシンで処置し細胞内カルシウム（Ca）を上昇させることで細胞死を誘発したとき、GHS-R作動薬である以下の化合物、ラットグレリン、プラルモレリン（pralmorelin; Growth Hormone Releasing Peptide-2(以下、GHRP-2))、ヘキサレリン（hexarelin）及びMK-0677が細胞死抑制作用を示すことが報告されており、当該化合物群が有効な非虚血性の神経変性疾患の例としてALSが挙げられている（特許文献3）。ALSは成人以降に運動神経細胞が選択的に死滅する疾患であり、海馬の細胞は障害を受けていない。よって、Ca濃度上昇で誘発される胎仔ラット海馬神経細胞の細胞死をGHRP-2やグレリンが*in vitro*で抑制したとしても、これらの化合物がALSに有効であるか否かは不明である。

[0008] *in vitro*のラット脊髄器官培養系において、グレリンはグルタミン酸で誘発される運動神経細胞死を抑制することが報告されている（非特許文献12、13）。しかし、*in vitro*の脊髄器官培養系が、ALSのような複雑な疾患の病態を十分に反映するとはいえない。

[0009] プラルモレリン（GHRP-2）がラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞において細胞体の1.5倍以上の樹状突起と軸索を持つ細胞数の割合を対照群に比べて約1.2倍に増加させることが報告されている（特許文献4）が、当該細胞は運動

神経細胞ではないので、GHRP-2がALSに有用であるか否かを判断することはできない。

[0010] 1,2-ジアセチルベンゼン(diacetylbenzene)の投与によって惹起したマウス近位軸索損傷モデルにおいて、GHS-R作動薬の一種であるGrowth Hormone Releasing Peptide-6(以下、GHRP-6)及び細胞増殖因子であるEGFは、それぞれ単独では歩行パターン障害を改善するのみであるが、両者を同時に投与すると行動学的にマウスの歩行能を改善させ、骨格筋の活動電位も有意に改善せるとの報告があるが(非特許文献14)、用いられた動物モデルはALSの臨床病態と異なるので、GHRP-6がALSに有用であるか否かを判断することはできない。

[0011] 一方、グレリン受容体であるGHS-R拮抗薬がALSの治療に有用であることを記載した報告(特許文献5、特許文献6)もあることから、グレリンを含むGHS-R作動薬がALSの治療に有用であるとは必ずしも推定されない。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0012] 特許文献1 : W02007/146046  
特許文献2 : 特開2008-127377  
特許文献3 : W001/047558  
特許文献4 : 特開2005-239712  
特許文献5 : US7829589  
特許文献6 : US2012/0080747

### 非特許文献

- [0013] 非特許文献1 : Expert Opinion on Emerging Drugs (2011年) 16巻 (2号) 537-558頁  
非特許文献2 : Amyotrophic Lateral Sclerosis (2010年) 11巻 38-45頁  
非特許文献3 : Nature (1999年) 402巻 656-660頁  
非特許文献4 : Physiological Reviews (2005年) 85巻 495-522頁  
非特許文献5 : Experimental Neurology (2007年) 207巻 52-63頁

非特許文献6 : Muscle & Nerve (1993年) 16巻 (6号) 624-633頁

非特許文献7 : Neurology (2008年) 71巻 1770-1775頁

非特許文献8 : Neurology (2008年) 70巻 1004-1009頁

非特許文献9 : Journal of Neurology (2011年) 258巻 (4号) 613-617頁

非特許文献10 : Nature Neuroscience (2010年) 13巻 (7号) 877-883頁

非特許文献11 : Pulmonary Pharmacology & Therapeutics (2008年) 21巻 (5号) 774-779頁

非特許文献12 : Experimental Neurology (2011年) 230巻 114-122頁

非特許文献13 : Korean Journal of Physiology and Pharmacology (2012年) 16巻 (1号) 43-48頁

非特許文献14 : Neurotoxicity Research (2011年) 19巻 195-209頁

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0014] 既存のALS治療剤であるリルゾールの臨床効果は限定的なものであり、その上市から既に15年以上が経過し、様々な化合物の臨床開発が行われたにも関わらず、未だに新たなALS治療剤は創製されていない。このように、ALSに対する有効な治療剤の開発に対して現在も大きな医療上の未充足ニーズがある。本発明では、現在有効な治療薬のないALSに対して、病態進展を抑制し、効果的に治療することができるALS治療剤を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

- [0015] 本発明者等は、現在有効な治療薬のないALSに対して有用な治療剤、特に唯一の既存薬であるリルゾールと比べてより有効に治療することができる薬剤について鋭意検討を行い、GHS-R作動薬が当該既存薬よりも有効な運動神経細胞保護作用を示すことを見出し、本発明を完成した。即ち、本発明は以下の発明を包含する。
- [0016] (1) 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有し、嚥下障害が重篤でない筋萎縮性側索硬化症に罹患している個体に投与するための筋萎縮性側索硬化症治療剤。

[0017] (2) 個体が更に既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤に不応性又は応答が不十分な個体である上記(1)に記載の治療剤。

(3) 既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤と併用する上記(1)又は(2)に記載の治療剤。

(4) 既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤がリルゾールである上記(2)又は(3)に記載の治療剤。

[0018] (5) 皮下注射剤である上記(1)又は(2)に記載の治療剤。

[0019] (6) 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬が、グレリン、プラルモレリン、GHRP-6、ヘキサレリン、イパモレリン、イブタモレンメタンスルホン酸塩、ウリモレリン、アナモレリン、マシモレリン、カプロモレリン又はSM-130686である上記(1)乃至(5)のいずれか1項に記載の治療剤。

[0020] (7) グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から5番目乃至28番目までのアミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物であり、且つ成長ホルモン分泌促進因子受容体に結合することによって細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチド系化合物である上記(6)に記載の治療剤。

[0021] (8) グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖の水酸基に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物である上記(7)に記載の治療剤。

[0022] (9) グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基の側鎖の水酸基がn-オクタノイル基によりアシル化されているペプチド系化合物である上記(8)に記載の治療剤。

(10) 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する筋萎縮性側索硬化症治療剤を嚥下障害が重篤でない筋萎縮性側索硬化症に罹患している個体に投与することを特徴とする筋萎縮性側索硬化症の治療方法。

(11) 個体が更に既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤に不応性又は応答が不十分な個体である上記(10)に記載の治療方法。

(12) 既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤を併用して投与する上記(10)又は(11)に記載の治療方法。

(13) 既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤がリルゾールである上記(11)又は(12)に記載の治療方法。

(14) 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する筋萎縮性側索硬化症治療剤が皮下注射剤である上記(10)乃至(13)のいずれか1項に記載の治療方法。

(15) 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬が、グレリン、プラルモレリン、GHRP-6、ヘキサレリン、イパモレリン、イブタモレンメタンスルホン酸塩、ウリモレリン、アナモレリン、マシモレリン、カプロモレリン又はSM-130686である上記(10)乃至(14)のいずれか1項に記載の治療方法。

(16) グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から5番目乃至28番目までのアミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物であり、且つ成長ホルモン分泌促進因子受容体に結合することによって細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチド系化合物である上記(15)に記載の治療方法。

(17) グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖の水酸基に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物である上記(16)に記載の治療方法。

(18) グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基の側鎖の水酸基がn-オクタノイル基によりアシル化されているペプチド系化合物である上記(17)に記載の治療方法。

(19) 嚥下障害が重篤でない筋萎縮性側索硬化症に罹患している個体に投与して筋萎縮性側索硬化症を治療するための成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

(20) 個体が更に既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤に不応性又は応答が不十分な個体である上記(19)に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

(21) 上記治療が既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤と併用する治療である上記(19)又は(20)に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

(22) 既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤がリルゾールである上記(20)又は(21)に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

(23) 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩の個体への投与が皮下注射剤としての投与である上記(19)乃至(22)のいずれか1項に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

(24) 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬が、グレリン、プラルモレリン、GHRP-6、ヘキサレリン、イパモレリン、イブタモレンメタンスルホン酸塩、ウリモレリン、アナモレリン、マシモレリン、カプロモレリン又はSM-130686である上記(19)乃至(23)のいずれか1項に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

(25) グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から5番目乃至28番目までのアミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物であり、且つ成長ホルモン分泌促進因子受容体に結合することによって細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチド系化合物である上記(24)に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

(26) グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖の水酸基に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物である上記(25)に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

(27) グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基の側鎖の水酸基がn-オクタノイル基によりアシル化されているペプチド系化合物である上記(26)に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

## 発明の効果

[0023] 本発明のGHS-R作動薬は、ALSにおける病態進展を抑制することにより生存期間を延長させる効果を有するため、現在有効な治療薬のないALSの治療に非常に有用である。また、ALS病態発症及び進展の特徴である運動神経細胞数の減少を抑制して当該細胞の死滅を顕著に抑制することにより、筋力低下を抑制する効果も有するためさらに有用である。当該効果は、既存のALS治療剤であるリルゾールが無効である時期からのGHS-R作動薬の投与でも生存期間を延長させることから、リルゾールよりも優れたものであり、長年の医療上の未

充足ニーズを満たすものである。さらに、運動神経細胞保護作用を有し、筋力低下を抑制することから、生存期間の延長のみならず生存期間中の生活の質の向上にも繋がる。また、GHS-R作動薬が運動神経細胞保護効果を示すことから、ALS以外の運動神経疾患、例えば脊髄性筋萎縮症等にも有用である。

### 発明を実施するための形態

[0024] 本発明のGHS-R作動薬としては、公知のペプチド系化合物や非ペプチド系化合物を用いることができる。当該ペプチド系化合物としては内因性リガンドであるグレリンの他に、プラルモレリン (GHRP-2)、GHRP-6、ヘキサレリン、イパモレリン (ipamorelin) 等が挙げられ、当該非ペプチド系化合物としてはイブタモレンメタンスルホン酸塩 (ibutamoren mesilate; MK-0677)、ウリモレリン (ulimorelin; TZP-101)、アナモレリン (anamorelin; RC-1291)、マシモレリン (macimorelin、AEZS-130)、カプロモレリン (capromorelin; CP-424391)、SM-130686等が挙げられる。特にペプチド系化合物であればグレリンが望ましく、また非ペプチド系化合物であればアナモレリンが望ましい。

[0025] グレリンとしては、ヒト由来グレリンをはじめ、ラット、マウス、ブタ、ウシ等その他の動物由来のグレリン及びその誘導体を挙げることができる（例えば国際公開W001/07475参照）。投与対象の個体がヒトである場合はヒト由来グレリンを用いることが望ましい。ヒト由来グレリンは28個のアミノ酸からなり（配列番号1）、アミノ末端から3番目のセリン残基の側鎖の水酸基が脂肪酸（*n*-オクタノイル基）によりアシル化されたペプチド系化合物である。

内因性リガンドであるグレリンは生体内に存在するホルモンであり、既にヒトに投与され、その安全性が確認されていることから、特に安全性の高いALS治療剤となり得る。

[0026] また、グレリン誘導体としては、配列番号1に記載されたアミノ酸配列においてアミノ末端から5番目～28番目のアミノ酸残基において1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加したアミノ酸配列を有し、アミノ末端が

ら3番目のアミノ酸（セリン）残基が当該アミノ酸残基の側鎖（水酸基）に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチドであり、且つGHS-Rに結合することによって、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチドであれば使用することができる（国際公開W001/07475参照）。

なお、本明細書中における「数個」とは、1乃至8個、1乃至7個、1乃至6個、1乃至5個、1乃至4個、1乃至3個、又は1乃至2個を意味する。

グレリン誘導体のアミノ酸配列としては天然型のアミノ酸配列と比較して70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、特に好ましくは95%、最も好ましくは97%の相同性を有することが望ましい。27個のアミノ酸よりなるヒト由来グレリンのスプライスバリエーション（配列番号2）においても同様である。

[0027] また、グレリン誘導体の活性については、GHS-Rに対するアゴニスト活性や上記刊行物に記載された生理作用を指標とすることができ、当該指標に基づいて目的のグレリン誘導体を選抜することができる。例えば、GHS-Rに対するアゴニスト活性については、細胞内カルシウムイオン濃度を指標に検討することができるが、当該指標に係る測定法は公知の方法が利用でき、例えば、カルシウムイオン濃度変化によるFluo-4 AM (Molecular Probe社)の蛍光強度の変化を利用したFLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices社)を用いることができる。また、カルシウム上昇活性を有するペプチド系化合物又は非ペプチド系化合物が、*in vivo*で摂食亢進活性を有するか確認するためには、公知の方法を利用することができる。例えば健常マウスでの摂食亢進作用を確認するためには、カルシウム上昇活性を有するペプチド系化合物又は非ペプチド系化合物を動物に皮下投与又は腹腔内投与し、投与後1時間の摂餌量を、溶媒投与群と比較すればよい。

[0028] プラルモレリン (GHRP-2) としては、D-アラニル-D-(2-ナフチル)アラニル-L-アラニル-L-トリプトフィル-D-フェニルアラニル-L-リジンアミド（米国特許第5,663,146号）を用いることができる。

[0029] GHRP-6としては、L-ヒスチジル-D-トリプトフィル-L-アラニル-L-トリプトフィル-D-フェニルアラニル-L-リジンアミド（Endocrinology (1984年) 114

巻(5号) 1537-1545頁) を用いることができる。

- [0030] ヘキサレリンとしては、L-ヒスチジル-2-メチル-D-トリプトフィル-L-アラニル-L-トリプトフィル-D-フェニルアラニル-L-リジンアミド (米国特許第5, 646, 301号) を用いることができる。
- [0031] イパモレリンとしては、 $\alpha$ -メチルアラニル-L-ヒスチジル-D- $\beta$ -(2-ナフチル)-L-アラニル-D-フェニルアラニル-L-リジンアミド (Journal of Medicinal Chemistry (1998年)41巻 3699-704頁) を用いることができる。
- [0032] イブタモレンメタンスルホン酸塩 (MK-0677) としては、2-アミノ-2-メチル-N-[(1R)-2-(1-メタンスルフォニルスピロ[インドリン-3,4'-ピペリジン]-1'-イル)-2-オキソ-1-(フェニルメトキシメチル) エチル]プロパンアミドメタンスルホン酸塩 (米国特許第5, 536, 716号) を用いることができる。
- [0033] ウリモレリン (TZP-101) としては、5(S)-シクロプロピル-11(R)-(4-フルオロベンジル)-2(R),7,8(R)-トリメチル-2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,13,14,15,16-テトラデカヒドロ-1,4,7,10,13-ベンゾキサテトラアザシクロオクタデシン-6,9,12-トリオン (米国特許第7, 476, 653号) を用いることができる。
- [0034] アナモレリンとしては、2-アミノ-N- {((1R)-2-[3-ベンジル-3-(N,N',N'-トリメチルヒドラジノカルボニル)ピペリジン-1-イル]-1-((1H-インドール-3-イル)-2-オキソエチル)-2-メチルプロピオンアミド} (米国特許第6, 576, 648号) を用いることができる。
- [0035] マシモレリン (AEZS-130) としては、2-メチルアラニル-N-[1(R)-フォルムアミド-2-(1H-インドール-3-イル)エチル]-D-トリプトファンアミド (米国特許第6, 861, 409号) を用いることができる。
- [0036] カプロモレリン (CP-424391) としては、2-アミノ-N-[2-[3a(R)-ベンジル-2-メチル-3-オキソ-3,3a,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-2H-ピラゾロ [4,3-c]ピリジン-5-イル]-1(R)-(ベンジルオキシメチル)-2-オキソエチル]イソブチラミド (欧州特許第0869968号) を用いることができる。
- [0037] SM-130686としては、(+)-3(S)-(2-クロロフェニル)-1-[2-(ジエチルアミノ)エチル]-3-ヒドロキシ-2-オキソ-4-(トリフルオロメチル)-2,3-デヒドロ-1H

-インドール-6-カルボキシアミド塩酸塩（米国特許第6,576,656号）を用いることができる。

[0038] 本願発明に用いることができるGHR-S作動薬に係る塩としては薬学的に許容される塩が好ましく、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性又は酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。

[0039] 無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。

[0040] 有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。

[0041] 無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。

[0042] 有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。

[0043] 塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

以上の塩の中でも特にナトリウム塩、カリウム塩が最も好ましい。

[0044] 本発明のGHS-R作動薬は常法により得ることができる。例えば、天然の原料から単離することができ、又は組換えDNA技術及び／若しくは化学的合成技術によって製造することができる。

[0045] 本発明のペプチド系化合物を組換えDNA技術を用いて製造する場合、本発明に係るペプチド系化合物をコードする目的遺伝子を組み込むベクターとしては、例えば大腸菌のベクター（pBR322、pUC18、pUC19等）、枯草菌のベクタ

ー (pUB110、pTP5、pC194等)、酵母のベクター (YEp型、YRp型、YIp型)、又は動物細胞のベクター (レトロウィルス、ワクシニアウィルス等) 等が挙げられるが、その他のものであっても、宿主細胞内で安定に目的遺伝子を保持できるものであれば、いずれをも用いることができる。当該ベクターは、適当な宿主細胞に導入される。目的の遺伝子をプラスミドに組み込む方法や宿主細胞への導入方法としては、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載された方法が利用できる。

[0046] 上記プラスミドにおいて目的のペプチド遺伝子を発現させるために、当該遺伝子の上流にはプロモーターを機能するように接続させる。

本願発明において用いられるプロモーターとしては、目的遺伝子の発現に用いる宿主細胞に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、形質転換する宿主細胞がEscherichia属の場合はlacプロモーター、trpプロモーター、lppプロモーター、λPLプロモーター、recAプロモーター等を用いることができ、Bacillus属の場合はSP01プロモーター、SP02プロモーター等を用いることができ、酵母の場合はGAPプロモーター、PH05プロモーター、ADHプロモーター等を用いることができ、動物細胞の場合は、SV40由来プロモーター、レトロウィルス由来プロモーター等を用いることができる。

[0047] 上記のようにして得られた目的遺伝子を含むベクターを用いて宿主細胞を形質転換する。宿主細胞としては細菌 (例えば、Escherichia属、Bacillus属等)、酵母 (Saccharomyces属、Pichia属、Candida属等)、動物細胞 (CHO細胞、COS細胞等) 等を用いることができる。培養時の培地としては液体培地が適当であり、当該培地中には培養する形質転換細胞の生育に必要な炭素源、窒素源等が含まれることが特に好ましい。所望によりビタミン類、成長促進因子、血清などを添加することができる。

[0048] 培養後、培養物から本発明に係るペプチド系化合物を常法により分離精製する。例えば、培養菌体又は細胞から目的物質を抽出するには、培養後、菌

体又は細胞を集め、これをタンパク質変性剤（塩酸グアニジン等）を含む緩衝液に懸濁し、超音波などにより菌体又は細胞を破砕した後、遠心分離を行う。次に上清から目的物質を精製するには、目的物質の分子量、溶解度、荷電（等電点）、親和性等を考慮して、ゲル濾過、限外濾過、透析、SDS-PAGE、各種クロマトグラフィーなどの分離精製方法を適宜組み合わせて行うことができる。

[0049] また本発明のペプチド系化合物を化学的合成技術を用いて製造する場合、例えば保護基の付いたアミノ酸を液相法及び／又は固相法により縮合、ペプチド鎖を延長させ、酸で全保護基を除去し、得られた粗生成物を公知の精製方法で精製することにより得られる。

[0050] 本発明に係るグレリン及びその誘導体についても常法により得ることができ、例えば、天然の原料から単離・精製することにより得ることができ、又は組換えDNA技術及び／若しくは化学的合成技術により製造することができる。

[0051] グレリンには側鎖が修飾（アシル化）されたアミノ酸残基が含まれるので、アミノ酸残基に修飾（アシル化）する場合は、公知の手段に従って当該修飾反応を施すことができる。例えば、組換えDNA技術を用いる製法においては、グレリン又はその誘導体をコードするDNAを有する発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、当該培養物から目的のペプチドを採取することにより本発明に係るグレリン又はその誘導体を得ることもできる。当該宿主細胞を選択することにより、当該細胞内において目的のペプチドに修飾（アシル化）がされた化合物を得ることができる。例えば脂肪酸修飾（アシル化）ペプチド系化合物を直接製造する場合は、当該ペプチドの前駆体ポリペプチドを適切な位置で切断できるプロセッシング・プロテアーゼ活性を有し、当該ペプチド中のセリン残基をアシル化できる活性を有する細胞を用いることが望ましい。このようなプロセッシング・プロテアーゼ活性及びセリンアシル化活性を有する宿主細胞は、当該前駆体ポリペプチドをコードするcDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞がカルシウム

上昇活性又は成長ホルモン分泌促進活性を有する脂肪酸修飾ペプチド系化合物を産生することを確認することにより選抜できる。

[0052] また化学合成技術を用いる製法においては、例えば、保護基の付いたアミノ酸を液相法及び／又は固相法により縮合、ペプチド鎖を延長させ、酸で全保護基を除去し、得られた粗生成物を上記の精製方法で精製することにより得ることができる。アシル化酵素又はアシル基転移酵素で選択的に目的位置にあるアミノ酸の側鎖をアシル化することができる。

[0053] 更に、組換えDNA技術と化学合成技術を併用した製法を用いてもよく、修飾アミノ酸残基を含むフラグメントを化学合成により製造し、修飾アミノ酸残基を含まないその他のフラグメントを組換えDNA技術を用いて製造し、その後各々のフラグメントを融合させる方法でも製造することができる（国際公開W 001/07475、W003/084983参照）。

[0054] 本発明において用いることができるその他の化合物、即ち、プラルモレリン（GHRP-2）、GHRP-6、ヘキサレリン、イパモレリン、イブタモレンメタンスルホン酸塩（MK-0677）、ウリモレリン、アナモレリン、マシモレリン、カプロモレリン及びSM-130686等についても上記の方法を含め公知の方法により製造することができる。

[0055] ALSモデル動物（SOD1<sup>G93A</sup>マウス）を制限給餌下で飼育し、GHS-R作動薬の摂食亢進作用が発現しない状態でGHS-R作動薬を当該動物に投与する場合には、骨格筋量の減少が抑制されたものの、筋力低下抑制作用や運動神経細胞死抑制作用は認められないことから、GHS-R作動薬はその摂食亢進作用が示される個体において筋力低下抑制作用や生存期間延長作用を示す。よって、本発明の投与対象としては、ALS罹患個体のうち、GHS-R作動薬の投与により摂食量が増加しうる個体、換言すれば個体自己の欲する摂食量を経口摂取することができる個体としての「嚥下障害が重篤でない個体」である。更にGHS-R作動薬はリルゾールが無効である時期からの投与でも治療効果を有するので、当該個体は「リルゾールに不応性又は応答が不十分な個体」であってもよい。

[0056] （１）嚥下障害が重篤でない個体

「嚥下障害が重篤でない個体」とは、欲するだけの食事量を経口摂取することができる個体を示し、食べたいと考える食事量を取ることができる個体である。即ち、当該個体は嚥下機能が維持されている限り、食べ易い摂食内容の工夫（ペースト状の加工食品等）、食べ易いような摂食用具の工夫及び摂食に際して介護の補助（例えば摂食用具の使用の際の補助）があってもよい。

[0057] 「嚥下障害が重篤でない」とは、全世界で確立された臨床評価指標である改訂版ALS機能評価尺度（Revised ALS Functional Rating Scale（以下、ALS FRS-R）： Journal of the Neurological Sciences（1999年）169巻（1-2号）13-21頁）を用いて判断することができ、当該機能評価尺度の嚥下の項目において、2点（食事内容の工夫を要する）以上の場合であり、好ましくは3点（時々むせる）以上の場合であり、より好ましくは4点（何でも飲み込める）の場合である。

[0058] GHS-R作動薬としてグレリンを用いる場合、実施例において詳述されているように、SOD1<sup>G93A</sup>マウスが餌箱からの摂餌が困難になる18週齢以降は餌を床にも撒き、当該マウスが餌を食べられるように補助した条件でも、グレリンは筋力低下抑制作用及び／又は生存期間延長作用を示す。即ち、グレリンをその摂食亢進作用が実現しうる条件で投与する場合、ALSモデル動物の筋力低下を抑制し、生存期間を延長させることができる。

[0059] （2）既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤に不応性又は応答が不十分な個体

既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤（ALS治療剤）に「不応性」とは、以前又は現在において既存のALS治療剤により治療効果がみられない又は効果が維持されない状態、即ち、既存のALS治療剤を服用していても病態の進展が抑制されない状態を示す。既存のALS治療剤による治療に対して不応性であることは、上述のALSFRS-Rにおいて1種以上の臨床評価指標を検討することによって評価される。従って、既存のALS治療剤に不応性であることは、ALSの治療に熟練した臨床家が判断することができる。例えば、臨床家が3ヶ月毎の診療時に個体の状態を、ALSFRS-Rを用いて評価し、既存のALS治療剤治療開始後の一

定期間（例えば3ヶ月）の評価尺度の変化度（減少した点数/期間）が既存のALS治療剤治療開始前の一定期間（例えば6ヶ月間）の評価尺度の変化度と比較したときに同程度以上である場合には、当該個体に既存のALS治療剤は有効でなく、当該個体は既存のALS治療剤に不応性であると判断される。

また、既存のALS治療剤による治療に不応性である個体には、以前に当該治療に応答して治療効果が得られたが、現時点ではもはや当該治療により同様の効果が得られない個体も含まれる。

[0060] 既存のALS治療剤に「応答が不十分」であるとは、既存のALS治療剤による治療効果が不十分で、既存のALS治療剤治療によっても病態進展が十分に抑制されない状態を示す。既存のALS治療剤による治療に対する応答が不十分であることは、上述のALSFRS-Rにおいて1種以上の臨床評価指標を検討することによって評価される。従って、既存のALS治療剤に「応答が不十分」であることは、ALSの治療に熟練した臨床家が判断することができる。例えば、臨床家が3ヶ月毎の診療時に患者の状態を、ALSFRS-Rを用いて評価し、既存のALS治療剤治療開始後の一定期間（例えば3ヶ月）の評価尺度の変化度（減少した点数/期間）を既存のALS治療剤治療開始前の一定期間（例えば6ヶ月間）の評価尺度の変化度と比較したときに軽減傾向が30%未満である場合には、当該個体に対する既存のALS治療剤の有効性が不十分で、当該個体は既存のALS治療剤に「応答が不十分」であるとみなされる。

[0061] 本明細書で使用される「治療」とは、ALS病態の進展抑制、低減又は排除を表し、その病態としては運動神経細胞の進行性変性、筋線維の除神経、筋萎縮、筋力低下、痙縮又は麻痺の進展抑制、低減又は排除、及び生存期間の延長が含まれる。

[0062] 本明細書で使用される「治療効果」は、公知の方法で判断することができる。例えば、ALSFRS-Rに基づく機能状態（functional status）、努力性肺活量（Forced Vital Capacity, FVC）に基づく呼吸機能、MRCスケール（Medical Research Council Scale）に基づく筋力等を評価することで判断することができる。

また、この他にもALS症状の程度を判断できる方法であれば、どのような方法であっても用いることができる。例えば、握力、背筋力、独立歩行の可否、経管栄養の有無、経管栄養までの期間（期間の起算日は任意に設定することができる。例えば、本発明のALS治療剤又は既存のALS治療剤の投与開始日でもよいし、筋力低下等のALSの症状が認められた時点でもよい）、気管切開の有無、人工呼吸器装着の有無、人工呼吸器装着のための挿管又は気管切開までの期間（期間の起算日は任意に設定することができる。例えば、本発明のALS治療剤又は既存のALS治療剤の投与開始日でもよいし、筋力低下等のALSの症状が認められた時点でもよい）又は生存期間（期間の起算日は任意に設定することができる。例えば、本発明のALS治療剤又は既存のALS治療剤の投与開始日でもよいし、筋力低下等のALSの症状が認められた時点でもよい）等によっても判断することができる。

これらの方法を用いて薬物の「治療効果」を判断する時期は、本発明のALS治療剤又は既存のALS治療剤の投薬期間が終了した後でもよいし、投薬期間中であってもよい。

[0063] 本発明におけるGHS-R作動薬を有効成分とするALS治療剤は、投与対象の個体に単独で投与されてもよいし、他の薬剤と併用投与されてもよい。

本明細書で使用される「併用」及び「併用する」とは、2種類以上の薬剤を同じ個体に投与することを言う。これらの薬剤は同時に又はほぼ同時に（例えば、1時間以内）投与されてもよいし、数時間を空けて投与されてもよい。例えば、毎日最初の薬剤を投与した直後に2番目の薬剤を投与する。典型的には、第1及び第2の薬剤の両者がそれらの効果を適切に発揮するタイミングで投与する。例えば、GHS-R作動薬としてグレリンを有効成分とするALS治療剤と既存のALS治療剤を併用する場合には、毎朝食前及び毎夕食前に既存のALS治療剤を服用し、その直後にグレリンを有効成分とするALS治療剤を投与（例えば、皮下投与）することにより、又は逆の順序で投与することにより、両薬剤を併用することができる。

[0064] グレリンは既存のALS治療剤が無効な条件下で、筋力低下抑制作用及び／又

は生存期間の延長作用を示すことから、既存のALS治療剤に不応性又は応答が不十分なALS罹患個体に有効であり、既存のALS治療剤に応答が不十分な個体において既存のALS治療剤との併用効果も期待される。既存のALS治療剤としてはリルゾールを挙げることができる。

[0065] 本願発明に用いることができるGHS-R作動薬又はそれらの薬理学的に許容しうる塩は、薬学的に許容される担体と配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤などの固形製剤、又はシロップ剤、注射剤などの液状製剤として経口又は非経口的に投与することができる。

[0066] 薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機又は無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、pH調整剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。

[0067] 賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。

[0068] 結合剤の好適な例としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

[0069] 崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムなどが挙げられる。

[0070] 溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。

[0071] 溶解補助剤の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、

クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0072] 懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。

[0073] 等張化剤の好適な例としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。

[0074] 緩衝剤の好適な例としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

[0075] 無痛化剤の好適な例としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。

防腐剤の好適な例としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

[0076] 抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

[0077] 非経口投与に適する製剤形態としては、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、又は筋肉内投与用などの注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、又は吸入剤などを挙げることができ、経口投与に適する製剤形態としては、例えば、カプセル剤、錠剤、シロップ剤などを挙げることができるが、本発明の医薬の有効成分がペプチド系化合物の場合、その製剤形態としては非経口投与に適する製剤形態が好ましく、例えば、注射剤、点滴剤、又は吸入剤などの製剤形態が好ましい。これらの製剤形態は当業者に種々知られており、当業者は所望の投与経路に適する製剤形態を適宜選択し、必要に応じて当業界で利用可能な1又は2以上の製剤用添加物を用いて医薬用

組成物の形態の製剤を製造することが可能である。例えば、注射剤又は点滴剤の形態の医薬は、有効成分であるGHS-R作動薬と共に等張化剤、pH調節剤、無痛化剤、防腐剤などの1又は2以上の製剤用添加物を注射用蒸留水に溶解して滅菌することにより調製できる。また、注射剤又は点滴剤の形態の医薬は、凍結乾燥形態の医薬として提供することもできる。このような製剤は、用時に注射用蒸留水や生理食塩水などを添加して溶解することにより注射剤又は点滴剤として使用できる。

[0078] ヒトグレリンは皮下投与でALSモデル動物において筋力低下抑制作用や生存期間延長作用を示すことから、グレリン、その誘導体若しくはそれらの薬理的に許容しうる塩、又はペプチド系若しくは非ペプチド系のGHS-R作動薬は、皮下注射剤のような注射剤として投与することができる。

[0079] 有効成分がペプチド系化合物の場合、消化管内で分解を受けにくい製剤、例えば活性成分であるペプチドをリボゾーム中に包容したマイクロカプセル剤として経口投与することも可能である。また、直腸、鼻内、舌下などの消化管以外の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。この場合は坐剤、点鼻スプレー、吸入薬、舌下錠といった形態で個体に投与することができる。また、デキストランなどの多糖類、ポリアミン、PEG等に代表される生分解性高分子をキャリアとした各種の放出制御製剤、持続化製剤等を採用することにより、ペプチドの血中滞留性を改善させた製剤についても、本発明において用いることができる。

[0080] 有効成分が非ペプチド系化合物で、経口投与で使用するならば、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤などの固体担体と共に錠剤化、粉末又は小丸薬形態で硬カプセル内に充填され、あるいはトローチの形態とすることができる。固体担体の量は広く変化するであろうが、通常約25mg～約1gである。液体担体を使用されるならば、有効成分と液体担体からなる調製物は、シロップ、乳化剤、軟カプセル、水性若しくは非水性の液状懸濁液又は溶液の形態として投与することができる。

[0081] 本発明に係るALS治療剤の有効成分として用い得るGHS-R作動薬の投与量は

、個体（患者）の年齢、体重、症状の程度及び投与経路に応じて適宜選択可能であるが、ALS罹患個体であるヒト成人に対して一般的に1日あたりの投与量の上限としては、物質の重量として例えば上限としては約100mg/kg以下であり、好ましくは約10mg/kg以下であり、さらに好ましくは1mg/kg以下である。また、1日あたりの投与量の下限としては、例えば約0.1 $\mu$ g/kg以上であり、好ましくは1 $\mu$ g/kg以上、より好ましくは10 $\mu$ g/kg以上である。本発明に係る医薬組成物の有効成分として用い得る物質は、その摂食亢進を実現する条件でALSの病態進展を抑制することから、投与期間の終期はALS罹患個体の嚥下障害が顕著となり、もはや嚥下障害が重篤でない状態ではなくなり、経管栄養等の非自発的経口摂取の手段が必要になるまでとするが、それまでの数ヶ月～数年間、1日1～2回程度の反復投与又は連続投与することができる。また、物質を反復投与する際には、毎朝食及び／又は毎夕の食前に投与することが望ましい。

## 実施例

[0082] 以下、実施例により本発明を具体的に説明する。実施例に示されたものは、本発明の実施形態の一例であり、本発明はこれに限定されるものではない。

[0083] 以下の実施例では、ALSモデル動物としてSOD1<sup>G93A</sup>マウスを用いた。まず、The Jackson Laboratory (ME, USA)よりB6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/Jマウス (SOD1<sup>G93A</sup>マウス) 及び野生型同系統マウスを購入し、これらを交配して産仔を得た。得られたSOD1<sup>G93A</sup>マウス及び野生型同腹仔 (WTマウス) をさらに交配繁殖させ、出生したSOD1<sup>G93A</sup>マウスを実験に用いた。一部の実施例ではWTマウスも用いた。

SOD1<sup>G93A</sup>マウス及びWTマウスは、水道水とげっ歯類標準飼料ペレット (CRF-1、総カロリー中13.6%のカロリーが脂肪由来、3570kcal/kg、オリエンタル酵母工業株式会社) の自由摂取により飼育した。なお、SOD1<sup>G93A</sup>マウスの下肢機能が低下し、餌箱からの摂餌が困難になる18週齢以降は餌を床にも撒き、マウスが餌を食べられるように補助した。

[0084] ＜実施例1＞10週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスとWTマウスの体重及び前肢筋力の比較

SOD1<sup>G93A</sup>マウスは、ヒトのALSと同様に、成熟期に運動神経細胞の選択的な死滅を生じるようになり、骨格筋萎縮や筋力の低下を呈して、やがて死にいたる。そこで、先ず10週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスの体重及び前肢筋力をWTマウスと比較し、本週齢におけるALSの発症を確認した。

[0085] 1. 材料及び方法

本実施例には10週齢のWTマウス及びSOD1<sup>G93A</sup>マウスを用い、体重及び前肢筋力を測定した。前肢筋力はラット・マウス簡易筋力測定器；200 g 計（小原医科産業株式会社）を用いて測定した。

[0086] 2. 結果

各群の体重及び前肢筋力を表1に示す。

SOD1<sup>G93A</sup>マウスではWTマウスと比較して平均体重が約1g少なく、前肢筋力が平均で約0.1N低く、有意に低値であった。このことから、SOD1<sup>G93A</sup>マウスは10週齢の時点で既に筋力が低下し、ALSを発症することを確認した。

[0087] [表1]

|          | WT マウス           | SOD1 <sup>G93A</sup> マウス |
|----------|------------------|--------------------------|
| 体重 (g)   | 25.2 ± 0.7 (18)  | 24.1 ± 0.7 (10)          |
| 前肢筋力 (N) | 1.04 ± 0.04 (18) | 0.91 ± 0.04 (10) *       |

数値は平均値 ± SE (例数)

\*: P < 0.05. WTマウスとの比較 (Studentのt検定)

[0088] ＜実施例2＞リルゾールのSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対する作用

1. 材料及び方法

既存のALS治療剤であるリルゾールは、SOD1<sup>G93A</sup>マウスの発症前である4週齢及び7週齢から投与したときに、延命効果を示したと報告されている (Amyotrophic Lateral Sclerosis (2009年) 10巻、85-94頁、Annals of Neurology (1996年) 39巻、147-157頁)。実施例1で、SOD1<sup>G93A</sup>マウスが10週齢においてALS症状である筋力低下を示すことを確認した。

本実施例では、SOD1<sup>G93A</sup>マウスを10週齢の時点で溶媒（生理食塩液）群及び

リルゾール群の2群に分け、生理食塩液、又はリルゾール（シグマ・アルドリッチ、16 mg/kg）を死亡するまで腹腔内に1日1回投与し、各個体の生存期間を解析した。リルゾールの用量は先行報告に準じて設定した（Amyotrophic Lateral Sclerosis（2009年）10巻、85-94頁）。

[0089] 2. 結果

各群の平均生存期間を表2に示す。

溶媒群とリルゾール群の平均生存期間は同程度であり、10週齢からの投与条件において、リルゾールの延命効果は認められなかった。

[0090] [表2]

|         | 溶媒群       | リルゾール群    |
|---------|-----------|-----------|
| 生存期間(日) | 137±3 (7) | 134±3 (6) |

数値は平均値 ± SE（例数）

[0091] ＜実施例3＞ヒト由来グレリン（以下、ヒトグレリン）のSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対する作用（1）：持続皮下投与時の骨格筋量、筋力及び生存期間に対する作用

実施例2でSOD1<sup>G93A</sup>マウスの10週齢よりリルゾールを投与しても生存期間の延長作用が見られないことを確認した。このようにSOD1<sup>G93A</sup>マウスが既にALS症状である筋力低下を示し、リルゾールが生存期間に対する効果を示さない条件において、ヒトグレリン（配列番号1）の作用について検討した。

[0092] 1. 材料及び方法

実験には10週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスを用い、溶媒群及びヒトグレリン群の2群を設けた。ヒトグレリン（50 µg/day、約2 mg/kg/day）を溶媒（生理食塩液）に溶解し投与液とした。投与液、又は生理食塩液を充填した浸透圧ポンプ（Alzet（登録商標）MINI-OSMOTIC PUMP MODEL1004, DURECT Corporation）を背部皮下に埋め込み持続皮下投与した。10週齢より投与を開始し、生存していた個体に対して4週間毎に浸透圧ポンプを交換し、投与を継続した。

[0093] 体重及び餌重量を投与開始前及び8週間投与後に測定し、体重変化量及び摂餌量を算出した。投与8週後にマウス下半身の骨格筋量をX線CT（Latheta

LCT-200、日立アロカメディカル株式会社）を用いて測定した。血漿中総コレステロール濃度は8週間投与後に尾静脈より採取した血液より分離した血漿を用いて、コレステロール E - テストワコー（和光純薬工業株式会社）により測定した。前肢筋力は、ラット・マウス簡易筋力測定器；200 g 計（小原医科産業株式会社）を用いて16週目に測定した。また、各個体の生存期間を解析した。

[0094] 2. 結果

各群の8週間投与後の平均体重変化量、摂餌量、及び下半身骨格筋量を表3に示す。

ヒトグレリン群では溶媒群と比較して8週間投与後の体重変化量、摂餌量、及び下半身骨格筋量が有意に増加した。

[0095] [表3]

|             | 溶媒群              | ヒトグレリン群            |
|-------------|------------------|--------------------|
| 体重変化量 (g)   | 0.4 ± 0.4 (15)   | 2.6 ± 0.4 (15) **  |
| 摂餌量 (g)     | 177.0 ± 2.9 (15) | 188.2 ± 3.6 (15) * |
| 下半身骨格筋量 (g) | 4.8 ± 0.3 (15)   | 5.7 ± 0.3 (15) *   |

数値は平均値 ± SE (例数)

\*, \*\*: P < 0.05, 0.01. 溶媒群との比較 (Studentのt検定)

[0096] 各群の8週間投与後の血漿中総コレステロール濃度を表4に示す。

溶媒群とヒトグレリン群の間に差はなかった。

[0097] [表4]

|                       | 溶媒群             | ヒトグレリン群         |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| 血漿中総コレステロール濃度 (mg/dL) | 86.5 ± 5.6 (15) | 85.8 ± 4.0 (15) |

数値は平均値 ± SE (例数)

[0098] 各群の6週間投与後の平均前肢筋力を表5に示す。

ヒトグレリン群では溶媒群に比べて前肢筋力が有意に強かったことから、筋力の低下が抑制されたことが示された。

[0099]

[表5]

|          | 溶媒群              | ヒトグレリン群             |
|----------|------------------|---------------------|
| 前肢筋力 (N) | 0.74 ± 0.05 (15) | 0.96 ± 0.05 (15) ** |

数値は平均値 ± SE (例数)

\*\* : P < 0.01. 溶媒群との比較 (Studentのt検定)

[0100] 次に各群の平均生存期間を表6に示す。

ヒトグレリン群では溶媒群に比べて生存期間が有意に延長し、平均生存日数は溶媒群と比べてヒトグレリン群で13.8%長かった。

[0101] [表6]

|          | 溶媒群          | ヒトグレリン群         |
|----------|--------------|-----------------|
| 生存期間 (日) | 152 ± 5 (15) | 173 ± 4 (15) ** |

数値は平均値 ± SE (例数)

\*\* : P < 0.01. 溶媒群との比較 (ログランク検定)

[0102] 以上の結果より、SOD1<sup>G93A</sup>マウスが既に筋力低下を示し、リルゾールが生存期間に対して作用を示さない10週齢からヒトグレリンを持続皮下投与したとき、溶媒群に比べて体重及び摂餌量が増加し、血漿中総コレステロール濃度に影響しなかったが、前肢筋力の低下を抑制し、生存期間を延長させることが明らかとなった。このことから、既存のALS治療剤であるリルゾールが有効性を示さない条件においても、ヒトグレリンがALS症状の進展を抑制することが判明した。

[0103] ＜実施例4＞ヒトグレリンのSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対する作用 (2) : 持続皮下投与時の運動神経細胞保護作用

実施例3でSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対して10週齢よりヒトグレリンを投与することにより前肢筋力の低下を抑制し、生存期間を延長させることを確認した。ALSは運動神経細胞が死滅することにより筋肉が萎縮し、最終的には死に至る疾患なので、ヒトグレリンが運動神経細胞保護作用を有するかについて検討した。

## [0104] 1. 材料及び方法

実験には10週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウス及びWTマウスを用いた。SOD1<sup>G93A</sup>マウスを溶媒群及びヒトグレリン群の2群に分け、溶媒を投与したWTマウスをControl群とした。ヒトグレリン (50  $\mu$ g/day、約2 mg/kg/day) を溶媒 (生理食塩液) に溶解し投与液とした。投与液、又は生理食塩液を充填した浸透圧ポンプ (alzet(登録商標) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL1004, DURECT Corporation) を背部皮下に埋め込み持続皮下投与した。10週齢より投与を開始し、4週後に浸透圧ポンプを交換して投与を継続した。投与開始から7週間後に解剖し、T9領域の脊髄を摘出した。ニッスル染色切片を作製し、組織学的に運動神経細胞数を同定した。各個体あたり隣接しない3枚の切片を用い、前角に存在する運動神経細胞数を計測した。測定値はControl群の運動神経細胞数の平均値を100%としたときの相対値として算出した。

## [0105] 2. 結果

Control群と比較したときの各群の運動神経細胞数相対値を表7に示す。

溶媒群ではControl群と比較して運動神経細胞数が約1/2で有意に少なかった。他方、ヒトグレリン群では溶媒群と比較して運動神経細胞数が有意に多かった。

## [0106] [表7]

|             | Control 群       | 溶媒群                  | ヒトグレリン群              |
|-------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| マウス遺伝子型     | WT              | SOD1 <sup>G93A</sup> | SOD1 <sup>G93A</sup> |
| 被験物質        | 溶媒              | 溶媒                   | ヒトグレリン               |
| 運動神経細胞数 (%) | 100 $\pm$ 4 (9) | 51 $\pm$ 3 (8) **    | 84 $\pm$ 7 (7) *, ** |

数値は平均値  $\pm$  SE (例数)

\*, \*\*: P < 0.05, 0.01. Control群との比較 (Dunnettの多重比較検定)

## : P < 0.01 ; 溶媒群との比較 (Studentのt検定)

[0107] 以上の結果より、SOD1<sup>G93A</sup>マウスにおいて、ヒトグレリン投与により運動神経細胞数の減少が抑制されること、即ち、運動神経細胞が保護されることが示された。

[0108] <実施例5>ヒトグレリンのSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対する作用 (3) : 反復皮下投

### 与時の筋力及び生存期間に対する作用

実施例3及び実施例4でSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対して10週齢よりヒトグレリンを持続皮下投与することにより、前肢筋力の低下が抑制され、生存期間が延長、並びに運動神経細胞が保護されることを確認した。

本実施例では、10週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスにヒトグレリンを反復皮下投与したときの前肢筋力及び生存期間に対する作用を検討した。

#### [0109] 1. 材料及び方法

実験には10週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスを用い、溶媒群及びヒトグレリン群の2群を設けた。ヒトグレリン（1 mg/kg）又は溶媒（5%マンニトール溶液）を10週齢より死亡するまで皮下に1日2回投与した。体重及び餌重量を投与開始前及び8週間投与後に測定し、体重変化量及び摂餌量を算出した。前肢筋力はラット・マウス簡易筋力測定器；200 g 計（小原医科産業株式会社）を用いて投与開始前及び8週間投与後に測定した。また、各個体の生存期間を解析した。

#### [0110] 2. 結果

各群の8週間投与後の平均体重変化量及び摂餌量を表8に示す。

ヒトグレリン群では溶媒群と比較して8週間投与後の体重変化量及び摂餌量が有意に増加した。

#### [0111] [表8]

|           | 溶媒群              | ヒトグレリン群             |
|-----------|------------------|---------------------|
| 体重変化量 (g) | 0.1 ± 0.7 (12)   | 2.1 ± 0.4 (13) **   |
| 摂餌量 (g)   | 160.8 ± 3.9 (12) | 176.2 ± 3.5 (13) ** |

数値は平均値 ± SE（例数）

\*\* : P < 0.01. 溶媒群との比較（Studentのt検定）

[0112] 各群における10週齢から8週間投与後の前肢筋力の変化の平均値を表9に示す。ヒトグレリン群では溶媒群と比べて前肢筋力の低下が有意に抑制された。

#### [0113]

[表9]

|             | 溶媒群               | ヒトグレリン群              |
|-------------|-------------------|----------------------|
| 前肢筋力の変化 (N) | -0.34 ± 0.05 (12) | -0.08 ± 0.07 (13) ** |

数値は平均値 ± SE (例数)

\*\* : P < 0.01. 溶媒群との比較 (Studentのt検定)

[0114] 次に各群の平均生存期間を表10に示す。

ヒトグレリン群では溶媒群と比べて生存期間が有意に延長し、平均生存日数は溶媒群に比べ、ヒトグレリン群で21.8%長かった。

[0115] [表10]

|          | 溶媒群          | ヒトグレリン群         |
|----------|--------------|-----------------|
| 生存期間 (日) | 147 ± 5 (13) | 179 ± 8 (13) ** |

数値は平均値 ± SE (例数)

\*\* : P < 0.01 ; 溶媒群との比較 (ログランク検定)

[0116] 以上の結果より、ヒトグレリンの反復皮下投与が持続皮下投与時と同様にSOD1<sup>G93A</sup>マウスのALS病態進展を抑制することが示された。このことから、ヒトグレリンを反復皮下投与することによりヒトALS患者の病態進展を抑制し、治療効果を示す可能性が示された。

[0117] ＜実施例6＞ヒトグレリンのSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対する作用（4）：制限給餌下での体重、骨格筋量、筋力及び運動神経細胞数に対する作用

実施例3及び実施例5でSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対して10週齢よりヒトグレリンを持続皮下投与又は反復投与することにより、前肢筋力の低下が抑制され、生存期間が延長することを示した。また、実施例4でグレリンをSOD1<sup>G93A</sup>マウスに持続皮下投与すると運動神経細胞が保護されることを確認した。

本実施例ではSOD1<sup>G93A</sup>マウスの自由摂餌条件下での1日摂餌量の約90%とした制限給餌下でSOD1<sup>G93A</sup>マウスを飼育し、それ以上摂餌できない、即ち、グレリンの摂食亢進作用が発現しない条件でヒトグレリンを持続皮下投与したときの、体重、骨格筋量、筋力、運動神経細胞数、並びに骨格筋萎縮に関わるAtr

ogin1及びMuscle RING-finger protein-1 (MuRF1) のmRNA発現に対する作用を検討した。

[0118] 1. 材料及び方法

実験には10週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウス及びWTマウスを用いた。WTマウスを2群に分け、1群は自由摂餌条件で飼育し (WT-Control群)、もう1群はSOD1<sup>G93A</sup>マウスの自由摂餌条件下での1日摂餌量の約90%である2.8 ~ 2.9 g の餌を毎日摂取させた (WT-制限給餌群)。SOD1<sup>G93A</sup>マウスは溶媒群及びヒトグレリン群の2群に分け、いずれも1日当たり2.8 ~ 2.9gの餌を与える制限給餌条件で飼育した (G93A-溶媒群、及びG93A-ヒトグレリン群)。

ヒトグレリン (50 µg/day、約2 mg/kg/day) を溶媒 (生理食塩液) に溶解し投与液とした。投与液又は生理食塩液を充填した浸透圧ポンプ (alzet (登録商標) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL1004, DURECT Corporation) を背部皮下に埋め込み持続皮下投与した。10週齢より投与を開始し、4週後に浸透圧ポンプを交換した。

投与開始日及び6週間後に体重を測定し、体重変化量を算出した。

前肢筋力はラット・マウス簡易筋力測定器 ; 200 g 計 (小原医科産業株式会社) を用いて投与開始7週間後に測定した。

[0119] また、投与開始前 (10週齢) 及び7週後にマウス下半身の骨格筋量をX線CT (Latheta LCT-200、日立アロカメディカル株式会社) を用いて測定し、骨格筋量の変化量を求めた。

その後、マウスを解剖し、T9領域の脊髄を摘出した。ニッスル染色切片を作製し、組織学的に運動神経細胞数を同定した。各個体あたり隣接しない3枚の切片を用い、前角に存在する運動神経細胞数を測定した。測定値はWT-Control群の運動神経細胞数の平均値を100%としたときの相対値として算出した。

更に、腓腹筋を摘出し、mRNAを抽出後定量PCR法でAtrogin1及びMuRF1 mRNA発現量を測定した。測定値は、WT-Control群のmRNA発現量を100%としたときの相対値として算出した。

## [0120] 2. 結果

いずれの群においても、制限給餌したマウスの全例が、試験期間中与えた餌を全て摂取した。このことから、制限給餌させたWT-制限給餌群、G93A-溶媒群及びG93A-ヒトグレリン群の摂餌量は同じであったことを確認した。

各群のマウスの投与開始6週後の体重変化量、及び投与開始7週後の下半身骨格筋量を表11に示した。

自由摂餌させたWT-Control群では体重が増加したが、制限給餌すると、WTマウスでもSOD1<sup>G93A</sup>マウスでも体重は減少し、特に制限給餌したSOD1<sup>G93A</sup>マウスで減少が顕著であった。SOD1<sup>G93A</sup>マウスに溶媒を投与したとき（G93A-溶媒群）と比べて、ヒトグレリン群（G93A-ヒトグレリン群）ではその体重減少が有意に小さかった。同様に、自由摂餌させたWTマウスでは下半身骨格筋量も増加したが、制限給餌群では減少した。G93A-溶媒群と比べて、G93A-ヒトグレリン群では骨格筋の減少が有意に抑制された。このように、制限給餌によりグレリンの摂食亢進作用が発現しない条件下であっても、グレリンの投与によってSOD1<sup>G93A</sup>マウスの体重や骨格筋量の減少が抑制された。

## [0121] [表11]

|                   | 体重変化量 (g)        | 下半身骨格筋変化量 (g)   |
|-------------------|------------------|-----------------|
| WT-Control 群 (9)  | 3.5 ± 1.1        | 0.3 ± 0.2       |
| WT-制限給餌群 (8)      | -2.5 ± 0.9**     | -1.3 ± 0.1**    |
| G93A-溶媒群 (13)     | -4.7 ± 0.6**     | -1.6 ± 0.2**    |
| G93A-ヒトグレリン群 (15) | -1.4 ± 0.7**, ** | -0.9 ± 0.2**, * |

( ) : N数、\*\* : P < 0.01 ; WT-Control群との比較 (Dunnettの多重比較検定)

#, ##: P < 0.05、0.01 ; G93A-溶媒群との比較 (Studentのt検定)

[0122] 投与開始7週後の骨格筋におけるAtrogin1及びMuRF1のmRNA発現量を表12に示した。

WTマウスでは制限給餌下で飼育してもこれらの遺伝子発現に大きな変動はなかったが、制限給餌下で溶媒を投与したSOD1<sup>G93A</sup>マウス（G93A-溶媒群）では、自由摂食させたWTマウス（Control群）に比べて両遺伝子発現が有意に上

昇した。

一方、制限給餌下でヒトグレリンを投与したSOD1<sup>G93A</sup>マウス（G93A-グレリン群）では、Atrogin1及びMuRF1 mRNAの発現が溶媒群に比べて有意に低かったことから、ヒトグレリン群では骨格筋萎縮が抑制されたことが示唆された。これは、表11で骨格筋量の減少がヒトグレリン群で少なかったことと一致する。

[0123] [表12]

|                   | Atrogin 1 mRNA 発現量 (%) | MuRF1 mRNA 発現量 (%)     |
|-------------------|------------------------|------------------------|
| WT-Control 群 (9)  | 100 ± 11               | 100 ± 8                |
| WT-制限給餌群 (8)      | 113 ± 19               | 142 ± 24               |
| G93A-溶媒群 (13)     | 528 ± 143**            | 613 ± 196*             |
| G93A-ヒトグレリン群 (15) | 205 ± 34 <sup>##</sup> | 207 ± 36 <sup>##</sup> |

( ) : N数、\*,\*\* :  $P < 0.05, 0.01$  ; WT-Control群との比較 (Dunnettの多重比較検定) <sup>##</sup> :  $P < 0.01$  ; G93A-溶媒群との比較 (Studentのt検定)

[0124] このように、ヒトグレリンは制限給餌下においてもSOD1<sup>G93A</sup>マウスの骨格筋萎縮を抑制した。

次に、本条件でのマウスの前肢筋力及び脊髄運動神経細胞数を表13に示した。

WTマウスにおいては、制限給餌下で飼育しても前肢筋力や運動神経細胞数は自由摂餌群と同程度であった。制限給餌したSOD1<sup>G93A</sup>マウスでは、自由摂餌下のWT-Control群に比べて前肢筋力や運動神経細胞数が有意に低下し、ヒトグレリン投与群でも同様であった。このように、ヒトグレリンは制限給餌下では、運動神経細胞死や前肢筋力の低下を抑制しなかった。

[0125] [表13]

|                   | 運動神経細胞数 (%) | 前肢筋力 (N)      |
|-------------------|-------------|---------------|
| WT-Control 群 (9)  | 100 ± 11    | 1.02 ± 0.05   |
| WT-制限給餌群 (8)      | 93 ± 10     | 0.99 ± 0.07   |
| G93A-溶媒群 (13)     | 63 ± 4**    | 0.74 ± 0.06** |
| G93A-ヒトグレリン群 (15) | 66 ± 5**    | 0.77 ± 0.06** |

( ) : N数、\*\* :  $P < 0.01$  ; WT-Control群との比較 (Dunnettの多重比較検

定)

[0126] これらのことから、グレリンは制限給餌下においても、その摂食亢進作用と独立した作用によって、SOD1<sup>G93A</sup>マウスの体重減少や骨格筋萎縮を抑制した。

一方、運動神経細胞死や筋力の低下を抑制するためには、グレリンが摂食亢進を実現すること、換言すれば、グレリン投与によって摂食量が増加する個体に投与する必要があることが示された。即ち、グレリンは摂食亢進作用により全身のエネルギー状態を改善することによって間接的に運動神経細胞死を抑制し、ALS病態の進展を抑制することがわかった。

[0127] ＜実施例 7＞16週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスとWTマウスの体重及び前肢筋力の比較

実施例3、4及び5で、ヒトグレリンはSOD1<sup>G93A</sup>マウスが既に前肢筋力低下を示した10週齢からの投与で、摂餌量や体重を増加させ、運動神経細胞死や筋力の低下を抑制し、生存期間を延長させることを示した。

臨床では、患者がALSを発症後、臨床家による確定診断がなされて初めて治療が開始される。ALSの確定診断には半年から1年以上を要するので（ALS治療ガイドライン2002、日本神経学会治療ガイドライン）、治療開始までに症状が進展すると考えられる。

そこで、ヒトグレリンをSOD1<sup>G93A</sup>マウスのALS病態がより進展した時期から投与したときの効果を検討することとした。そのために、本実施例では16週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスの体重及び前肢筋力をWTマウスと比較した。

[0128] 1. 材料及び方法

実験には16週齢のWTマウス及びSOD1<sup>G93A</sup>マウスを用い、体重及び前肢筋力を測定した。前肢筋力はラット・マウス簡易筋力測定器；200 g 計（小原医科産業株式会社）を用いて測定した。

[0129] 2. 結果

各群の体重及び前肢筋力を表14に示す。

SOD1<sup>G93A</sup>マウスではWTマウスと比較して平均体重が2g以上少なく、前肢筋力は平均で約0.5 N低値を示し、これらのWTマウスとの差は10週齢時（表1）に

比べてより顕著であった。また、16週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスの前肢筋力は10週齢のとき (0.91 N) と比べて低値であった (表1)。

[0130] [表14]

|        | WT マウス          | SOD1 <sup>G93A</sup> マウス |
|--------|-----------------|--------------------------|
| 体重 (g) | 28.0 ± 0.5 (5)  | 25.3 ± 0.9 (8) *         |
| 前肢筋力   | 1.21 ± 0.06 (5) | 0.68 ± 0.06 (8) **       |

数値は平均値 ± SE (例数)

\*, \*\*: P < 0.05, P < 0.01. WTマウスとの比較 (Studentのt検定)

[0131] このように、16週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスは同週齢のWTマウスや10週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウス (表1) と比較して前肢筋力が低かったことから、ALS病態がより進展した状態であることを確認した。

[0132] ＜実施例8＞ヒトグレリンのSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対する作用 (5) : 16週齢より持続皮下投与したときの生存期間に対する作用

本実施例では、筋力低下が顕著でALS病態がより進展した16週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対するヒトグレリンのALS病態進展抑制作用を、生存期間を指標に検討した。

[0133] 1. 材料及び方法

実験には16週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスを用い、溶媒群及びヒトグレリン群の2群を設けた。ヒトグレリン (50 µg/day、約2 mg/kg/day) を溶媒 (生理食塩液) に溶解し投与液とした。投与液又は生理食塩液を充填した浸透圧ポンプ (alzet (登録商標) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL1004, DURECT Corporation) を背部皮下に埋め込み持続皮下投与した。16週齢より投与を開始し、生存していた個体には4週間毎に浸透圧ポンプを交換し、投与を継続した。各個体の生存期間を解析した。

[0134] 2. 結果

各群の平均生存期間を表15に示す。

ヒトグレリン群では溶媒群と比べて生存期間が有意に延長し、平均生存日数は、溶媒群に比べヒトグレリン群で17.6%長かった。

[0135] [表15]

|         | 溶媒群         | ヒトグレリン群        |
|---------|-------------|----------------|
| 生存期間(日) | 153 ± 7 (9) | 180 ± 11 (9) * |

数値は平均値 ± SE (例数)

\*:  $P < 0.05$ . 溶媒群との比較 (ログラंक検定)

[0136] このように、SOD1<sup>G93A</sup>マウスにおいて筋力低下が顕著でALS病態がより進展した16週齢から投与を開始した場合にも、ヒトグレリンは溶媒群に比べて有意に生存期間を延長させた。

実施例2で示したように、既存のALS治療剤であるリルゾールは10週齢からの投与でも生存期間を延長させなかった。即ち、既存のALS治療剤と比べて、グレリンはSOD1<sup>G93A</sup>マウスの16週齢から投与した場合にも、生存期間を有意に延長させるという顕著な効果を示すことが判明した。

このことから、グレリンがALS病態進展を顕著に抑制し、治療効果を有することが示された。

[0137] <実施例9>成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬であるGHRP-6及びアナモレリンのSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対する作用：反復皮下投与時の生存期間に対する作用

実施例5でSOD1<sup>G93A</sup>マウスに対して10週齢よりヒトグレリンを反復皮下投与することにより、生存期間が延長することを確認した。

本実施例では、10週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスに成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬であるGHRP-6及びアナモレリンを反復皮下投与したときの生存期間に対する作用を検討した。

[0138] 1. 材料及び方法

実験には10週齢のSOD1<sup>G93A</sup>マウスを用い、溶媒群、GHRP-6群及びアナモレリン群の3群を設けた。GHRP-6 (1 mg/kg)、アナモレリン (1 mg/kg) 又は溶媒 (5%マンニトール溶液) を10週齢より死亡するまで皮下に1日2回投与した。体重及び餌重量を投与開始前及び5週間投与後に測定し、体重変化量及び摂餌量を算出した。また、各個体の生存期間を解析した。

## [0139] 2. 結果

各群の5週間投与後の平均体重変化量及び摂餌量を表16に示す。

GHRP-6群では溶媒群と比較して5週間投与後の体重変化量及び摂餌量が有意に増加した。また、アナモレリン群では溶媒群と比較して5週間投与後の体重変化量が有意に増加し、摂餌量が増加傾向を示した。

## [0140] [表16]

|           | 溶媒群              | GHRP-6 群            | アナモレリン群            |
|-----------|------------------|---------------------|--------------------|
| 体重変化量 (g) | 0.0 ± 0.4 (31)   | 1.9 ± 0.2 (30) **   | 0.9 ± 0.2 (31) *   |
| 摂餌量 (g)   | 132.0 ± 2.6 (31) | 142.7 ± 2.1 (30) ** | 139.5 ± 2.5 (31) † |

数値は平均値 ± SE (例数)

†, \*, \*\*: P < 0.1、P < 0.05、P < 0.01. 溶媒群との比較 (Dunnetの多重比較検定)

## [0141] 次に各群の平均生存期間を表17に示す。

GHRP-6群及びアナモレリン群では溶媒群と比べて生存期間が有意に延長した。

## [0142] [表17]

|          | 溶媒群          | GHRP-6 群       | アナモレリン群        |
|----------|--------------|----------------|----------------|
| 生存期間 (日) | 130 ± 2 (31) | 138 ± 2 (30) * | 136 ± 2 (31) * |

数値は平均値 ± SE (例数)

\*: P < 0.05; 溶媒群との比較 (ウィルコクソン検定)

[0143] 以上の結果より、成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬であるGHRP-6及びアナモレリンの反復皮下投与がヒトグレリンと同様にSOD1<sup>G93A</sup>マウスのALS病態進展を抑制することが示された。

### 産業上の利用可能性

[0144] 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物は、嚥下障害が重篤でない筋萎縮性側索硬化症に罹患している個体に対して筋萎縮性側索硬化症治療剤となり得る。

### 配列表フリーテキスト

- [0145] 配列番号 1   ー  ヒトグレリンのアミノ酸配列
- 配列番号 2   ー  ヒトグレリン（スプライスバリエント、アミノ酸27個）  
のアミノ酸配列

## 請求の範囲

- [請求項1] 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有し、嚥下障害が重篤でない筋萎縮性側索硬化症に罹患している個体に投与するための筋萎縮性側索硬化症治療剤。
- [請求項2] 個体が更に既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤に不応性又は応答が不十分な個体である請求項1に記載の治療剤。
- [請求項3] 既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤と併用する請求項1又は2に記載の治療剤。
- [請求項4] 既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤がリルゾールである請求項2又は3に記載の治療剤。
- [請求項5] 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する筋萎縮性側索硬化症治療剤が皮下注射剤である請求項1乃至4のいずれか1項に記載の治療剤。
- [請求項6] 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬が、グレリン、プラルモレリン、GHRP-6、ヘキサレリン、イパモレリン、イブタモレンメタンサルホン酸塩、ウリモレリン、アナモレリン、マシモレリン、カプロモレリン又はSM-130686である請求項1乃至5のいずれか1項に記載の治療剤。
- [請求項7] グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から5番目乃至28番目までのアミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物であり、且つ成長ホルモン分泌促進因子受容体に結合することによって細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させ

る活性を有するペプチド系化合物である請求項 6 に記載の治療剤。

[請求項8]       グレリンが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から 3 番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖の水酸基に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物である請求項 7 に記載の治療剤。

[請求項9]       グレリンが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から 3 番目のアミノ酸残基の側鎖の水酸基が *n*-オクタノイル基によりアシル化されているペプチド系化合物である請求項 8 に記載の治療剤。

[請求項10]       成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する筋萎縮性側索硬化症治療剤を嚥下障害が重篤でない筋萎縮性側索硬化症に罹患している個体に投与することを特徴とする筋萎縮性側索硬化症の治療方法。

[請求項11]       個体が更に既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤に不応性又は応答が不十分な個体である請求項 10 に記載の治療方法。

[請求項12]       既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤を併用して投与する請求項 10 又は 11 に記載の治療方法。

[請求項13]       既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤がリルゾールである請求 11 又は 12 に記載の治療方法。

[請求項14]       成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する筋萎縮性側索硬化症治療剤が皮下注射剤である請求項 10 乃至 13 のいずれか 1 項に記載の治療方法。

[請求項15]       成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬が、グレリン、プラルモレリン、GHRP-6、ヘキサレリン、イパモレリン、イブタモレンメタンサルホン酸塩、ウリモレリン、アナモレリン、マシモレリン、カプロモレリン又は SM-130686 である請求項 10 乃至 14 のいずれか 1 項に記載の治療方法。

[請求項16]       グレリンが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端

から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から5番目乃至28番目までのアミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物であり、且つ成長ホルモン分泌促進因子受容体に結合することによって細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチド系化合物である請求項15に記載の治療方法。

[請求項17]        グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖の水酸基に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物である請求項16に記載の治療方法。

[請求項18]        グレリンが、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のアミノ酸残基の側鎖の水酸基がn-オクタノイル基によりアシル化されているペプチド系化合物である請求項17に記載の治療方法。

[請求項19]        嚥下障害が重篤でない筋萎縮性側索硬化症に罹患している個体に投与して筋萎縮性側索硬化症を治療するための成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

[請求項20]        個体が更に既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤に不応性又は応答が不十分な個体である請求項19に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

[請求項21]        上記治療が既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤と併用する治療である請求項19又は20に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

[請求項22]        既存の筋萎縮性側索硬化症治療剤がリルゾールである請求項20又

は 2 1 に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

[請求項23] 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩の個体への投与が皮下注射剤としての投与である請求項 1 9 乃至 2 2 のいずれか 1 項に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

[請求項24] 成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬が、グレリン、プラルモレリン、GHRP-6、ヘキサレリン、イパモレリン、イブタモレンメタンサルホン酸塩、ウリモレリン、アナモレリン、マシモレリン、カプロモレリン又はSM-130686である請求項 1 9 乃至 2 3 のいずれか 1 項に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

[請求項25] グレリンが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から 3 番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から 5 番目乃至 2 8 番目までのアミノ酸配列において 1 乃至数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から 3 番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物であり、且つ成長ホルモン分泌促進因子受容体に結合することによって細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチド系化合物である請求項 2 4 に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

[請求項26] グレリンが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から 3 番目のアミノ酸残基が当該アミノ酸残基の側鎖の水酸基に脂肪酸が導入された修飾アミノ酸残基であるペプチド系化合物である請求項 2 5 に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

[請求項27]           グレリンが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有し、アミノ末端から 3 番目のアミノ酸残基の側鎖の水酸基が n-オクタノイル基によりアシル化されているペプチド系化合物である請求項 26 に記載の成長ホルモン分泌促進因子受容体作動薬又はその薬学的に許容される塩。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/078743

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K38/04(2006.01)i, A61P21/02(2006.01)i, C07K14/46(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00, A61K38/04, A61P21/02, C07K14/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2013 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2013 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2013 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),  
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | LEE S et al, Ghrelin protects spinal cord motoneurons against chronic glutamate excitotoxicity by inhibiting microglial activation, Korean J Physiol Pharmacol, 2012 Feb, Vol.16, No.1, p.43-8, entire text, particularly, Abstract                                                 | 1, 2, 5-9, 19-27      |
| Y         |                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 3, 4                  |
| X         | LIM E et al, Ghrelin protects spinal cord motoneurons against chronic glutamate-induced excitotoxicity via ERK1/2 and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 $\beta$ pathways, Exp Neurol, 2011, Vol.230, No.1, p.114-22, entire text, particularly, Abstract | 1, 2, 5-9, 19-27      |
| Y         |                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 3, 4                  |
| Y         | Isao NAGANO, Modern Physician, 2002, vol.22, no.5, pages 579 to 584, entire text                                                                                                                                                                                                    | 1-9, 19-27            |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 December, 2013 (06.12.13)

Date of mailing of the international search report

17 December, 2013 (17.12.13)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/078743

**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.: 10-18  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 10-18 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K38/04(2006.01)i, A61P21/02(2006.01)i, C07K14/46(2006.01)n

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K45/00, A61K38/04, A61P21/02, C07K14/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 日本国実用新案公報   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 3 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 3 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 3 年 |

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                               | 関連する<br>請求項の番号   |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| X               | LEE S et al, Ghrelin protects spinal cord motoneurons against chronic glutamate excitotoxicity by inhibiting microglial activation, Korean J Physiol Pharmacol, 2012 Feb, Vol.16, No.1, p.43-8, 全文, 特に Abstract | 1, 2, 5-9, 19-27 |
| Y               |                                                                                                                                                                                                                 | 3, 4             |

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 1 2 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 7 . 1 2 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

小堀 麻子

4 C

2 9 3 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                            |                  |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                          | 関連する<br>請求項の番号   |
| X                     | LIM E et al, Ghrelin protects spinal cord motoneurons against chronic glutamate-induced excitotoxicity via ERK1/2 and                      | 1, 2, 5-9, 19-27 |
| Y                     | phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 $\beta$ pathways, Exp Neurol, 2011, Vol.230, No. 1, p.114-22, 全文, 特に Abstract | 3, 4             |
| Y                     | 永野功, Modern Physician, 2002, Vol.22, No. 5, p. 579-584, 全文                                                                                 | 1-9, 19-27       |

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 10-18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求項10-18は手術又は治療による人体の処置方法に関するものである。
2. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。