

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C07K 14/60
C12N 15/16
A61K 38/25

(11) 공개번호 10-2005-0071498
(43) 공개일자 2005년07월07일

(21) 출원번호 10-2005-7004781
(22) 출원일자 2005년03월18일
 번역문 제출일자 2005년03월18일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2003/001418
 국제출원일자 2003년09월17일

(87) 국제공개번호 WO 2004/027064
 국제공개일자 2004년04월01일

(30) 우선권주장 60,411,340 2002년09월18일 미국(US)

(71) 출원인 상트르 오스피탈리에 드 루니버시떼 드 몬트리알
 캐나다, 퀘벡 에이치2더블유 1티8, 몬트리알, 8-107에이 뷰로, 루 세인트-어바인 3840, 파빌
 론 마송

(72) 발명자 가드로, 피에레트
 캐나다, 퀘벡 제이4엑스 1뷔5, 브로사드, 보울. 리바드 9123

(74) 대리인 손은진

심사청구 : 없음

(54) 성장 호르몬 방출 호르몬 유사체

명세서

기술분야

본 발명은 성장 호르몬 방출 호르몬(GHRH) 유사체 분야와 관련된다. 보다 상세하게는, 본 발명은 인간 고유의 GHRH(1-29)NH₂와 비교하여, 단백질 분해에 증가된 저항성을 보여주고, 상대적으로 시험관 내 연구에서 인간 GHRH 수용체에 상대적으로 높은 결합 친화성을 가지는 29개 또는 그 이상의 아미노산 GHRH 유사체에 관련된 것이다.

배경기술

성장호르몬(GH)는 성장조절과 단백질합성과 성장, 그리고 지방분해와 같은 동화작용 운동을 관장하여 성장을 자극하는 뇌하수체 전엽 호르몬이다. 1980년대 중반까지, 인간 GH(h-GH)의 유일한 출처는 사(死)후에 수집된 뇌하수체였다. 오늘날, hGH는 유전공학을 통해 대량으로 이용가능하다.

GH는 어린이들에게 성장을 촉진시키고 어른의 신진대사에 큰 역할을 한다. 어린이들에게 있어 각각 GH결핍은 성장지연 또는 실패와 관련되고, GH과다는 거인증이나 말단비대증을 유발한다.

GH는 포유류의 뇌하수체의 성장자극세포에서 생산되어 일생을 통해 분비된다. 두개의 시상하부 펩티드에 의해 뇌 내부에서 주로 조절된다: 그 분비와 합성을 자극하는 GHRH, 그리고 이를 방해하는 성장억제호르몬. 많은 주변 인자들이 GH 분비를 조절한다. 그들 중에는, 인슐린같은 성장 인자-1(IGF-1)는 GH에 반응하여 간에서 생산되고, GH 분비에 네거티브 피드백을 일으키는 시상하부에 작용하기 때문에 중요한 인자로 대표된다.

GH 축을 표적으로 하는 약제는 GH방출을 자극하는 합성 GHRH; GH방출을 방해하는 성장억제호르몬 유사체, 옥트레이타이드; 결핍상태에서 GH를 대신하기 위해서 사용되는 재조합 인간 GH(성장호르몬, 성장호르몬 유사체); 그리고 GH 무감응(라론형 난장이증)을 다루기 위해 사용되는 재조합 IGF-1를 포함한다.

GH는 기록하기 위해 시험된 모든 동물종에서 나이에 따라 감소한다. 인간에게 있어서는, 21세에서 31까지의 나이가 지나면 GH의 양이 십년당 약 14%가량 떨어지고, 60세경에까지 전체 24-시간 GH생산율이 절반으로 감소된다. 결국 인간은 20세 때 약 500μg 생산하고, 40세 때 200μg, 80세 때 25μg을 생산한다.

1985년 이후 미국에서 처방용으로 생합성 GH의 이용으로, GH 대체 요법이 성장호르몬 결핍의 경우에서 최적요법이 되었다. 미국에서, GH 치료에 적합한 어린이들의 수는 GH결핍에 대한 엄격한 기준이 적용되더라도 11,000이며, 3자리 백분위수이하의 키를 가진 모든 이들이 후보자라면 13,000에 달한다. 진료의 기준이 덜 엄격해 지더라도 GH요법의 각 가격은 매년 155만에서 200만원 상승할 것이다(커터 엘.등., 1996). 20,000명의 어린이들만이 GH요법을 받고 있기 때문에, 지금까지 미국에서 소아과 의사는 입증되지 않은 지시에 대해 GH를 조제하는 데에 만족할 만한 자제를 보여왔다.(핀켈스타인, B.S. 등 1998).

생합성 GH가 주입되었을 때, 또 다른 문제는 낮은 환자 순응이다. GH(191 아미노산)의 복잡한 아미노산 구조는 위장관에서 완전히 파괴된다.

대개, GH는 활성 불량 질병, 양성 머리속 고혈압, 그리고 증식 또는 증식전 당뇨병막변증을 가진 환자에게는 금기된다.

성장 호르몬 방출 호르몬(GHRH)는 44개의 아미노산들의 펩티드다. 일부 저자들은 GHRH(1-29)NH₂, GHRH(1-44)NH₂의 29 아미노산 N-종단 조각,이 GHRH(1-44)NH₂의 완전한 생(bio)활성을 보인다고 보고하였다.

GHRH는 최초 이자중양으로부터 분리되었고, 순차적으로 다양한 포유류의 시상하부로부터 분리되었다. 시상하부의 활꼴핵 외에도, GHRH는 시신경교차상부핵(suprachiasmatic nucLeus)같은 시상하부의 다른 핵산과 가장자리계통과 같은 뇌의 다른 구간에 현재 존재한다. GHRH 유사 면역활성 및/또는 GHRH 리보핵산(m-RNA)이 태반, 위장관, 난소, 고환, 가슴샘, 지라, 그리고 콩팥수질에서도 발견되었다.

GHRH 결합부위는 보통 또는 중양 뇌하수체, 그리고 보통 시상하부, 고환, 난소 그리고 콩팥수질로부터의 다양한 조직 표본과 세포배양에 따라 다르며, 특징적이다. 약제학적 연구는 뇌하수체와 난소에서 GHRH 결합부위의 두가지 형태의 존재를 증명하였다: 친화성의 생리적으로 관련된 형식에 따라 높은 친화성과 낮은 용량 결합부위, 그리고 낮은 친화성과 높은 용량 결합부위.

쥐 뇌하수체 GHRH 결합부위 파라미터의 변경은 나이가 들면서 발생하고, 높은 친화성 결합부위의 손실을 일으킨다.

GHRH는 생체내에서 급속히 퇴화한다는 것이 알려져 있다. 혈청과 혈장, 간 그리고 뇌하수체와 시상하부와 같은 표적 조직에서 GHRH의 퇴화 패턴이 설명되었다. 지금까지 인식된 취약 펩티드는 R2-R3, R10-11, R11-R12, R14-R15, R18-R19, R20-R21, R21-R22이다(볼렌저 등. Brain Res 1993; 볼렌저 등. 펩티드 1992). 더욱이, 이러한 아미노산 잔기에서 변형은 GHRH와 그 유사체의 활성을 더 오래 지속되게 함은 물론 단백질 분해를 방해하거나 감소시킬 수 있다(지라드 P. 등 Eur J Clin Pharmacol 1987, 32: 507-513)는 것이 알려졌다.

자연적으로 발생하는 GHRH에서 이러한 경과와 제한은 미국 특허 등록번호 제 5,854,216호에서 설명되었듯이, 쥐 뇌하수체 GHRH 수용체에 대한 친화성에서 5 내지 13배의 증가를 보이는 새로운 분류의 14 다중치환 합성 GHRH 조작동체에 대한 발견을 초래하였다. 그런 발명은 무독성 고민감, 그리고 고선택 표지 펩티드와 GHRH 수용체의 표지 다른 항체를 제공하였다.

추가로, 학문기관 또는 제약/생기술 회사로부터 지금까지 고안된 GHRH 유사체는 단순히 생물학적 검정 또는 동물에 대한 생체실험에서 그들의 민감기를 개선하기 위해 목적된 이러한 유사체의 구조적 변화에 기반을 두고 있었다.

지금까지, 단일 아미노산 다중치환체에 의해, 뇌하수체 GHRH 수용체에 대한 그들의 친화성과 그들의 생체 민감기 양자 모두를 증가시키기 위해 변형될 수 있는 GHRH 유사체에 대한 요구가 있었다. 더욱이 생체 내에서 GHRH 유사체가 동물 내에서 GH 분비를 자극할 수 있을 것이라는 것과 그들이 선천적 GHRH(1-44)-NH₂보다 더 효력있을 것이라는 것이 증명될 필요가 있었다. 이러한 연결로서, 미국 특허 등록번호 제 5,584,216에 개시된 GHRH 유사체 중에 선택에 따라 예기치 않은 장점이 관측되었다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 목적은 상기 언급된 필요를 만족시키기 위는 GHRH 유사체를 제공하는 것이다. 따라서, 본 발명은 GHRH 유사체, 그들의 사용 그리고 GHRH-유도 생물학적 활성을 개시하기 위한 방법에 관련한 것이다.

제 1 측면에 따르면, 본 발명은 GHRH 유사체, 상기 유사체의 유도체, 또는 식 X로 구성되는 약제학적으로 수용가능한 그의 염을 지시한다. 식 X:

Tyr-A2-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-A8-A9-A10-Arg-Lys-Val-Leu-A15-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-A21-A22-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-A30-NH₂, 여기서

A2 는 Ala 또는 D-Ala ;

A8 은 Asn, D-Asn 또는 Ala ;

A9 는 Ser 또는 Ala ;

A10 은 Tyr 또는 D-Tyr ;

A15 는 Gly, Ala 또는 D-Ala ;

A21 는 Lys 또는 D-Lys ;

A22 는 Leu, D-Leu, Lys 또는 Ala ; 그리고

A30 은 결합 또는 1에서 15까지의 어떤 아미노산 서열의 잔기 ;

실질적으로 자연상 발생하는 GHRH의 시험관 효능지수 보다 높은 시험관 효능지수를 가지는 상기 유사체, 상기 유사체의 유도체 또는 그의 염이다.

다른 측면은, 본 발명은 상기 언급된 유사체, 유도체 또는 그의 염으로 구성되는 약제 조성 및 약제학적으로 수용가능한 운반체를 지시한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 생체내에서 GH의 방출에 대한 특정 자극을 위해서 상기 유사체의 용도를 지시한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 GH 결핍관련 상태의 치료에 있어서 의학의 조제를 위한 상기 유사체의 용도를 지시한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 GHRH 유도 생물학적 활성을 개시하기 위한 방법을 지시한다.

본 발명 및 그 장점은 다음의 첨부된 도면을 참조하여 제시되는 바람직한 실시예의 비제한적 설명을 읽음으로써 더 잘 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따라 자연적 인간 GRF(1-44)NH₂ 펩티드를 비교해서, 용량을 증가시키면서 GHRH 유사체의 1회 정맥 주사 후 쥐 성장 호르몬의 분비 구배를 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 바람직한 실시예에 따라 GHRH 유사체의 용량을 증가시키면서, 1회 피하투여 주사 후 쥐 성장 호르몬의 분비 구배를 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 바람직한 실시예에 따라 GHRH 유사체의 용량을 증가시키면서, 다수 회 피하투여 주사 후 쥐 성장 호르몬의 분비 구배를 나타내는 그래프이다.

실시예

본 발명의 기본은 단백질 분해에 증가된 저항성을 보이고, 인간의 자연적인 GHRH(1-29)NH₂에 비교해서, 시험관 연구에서 인간 GHRH 수용체에 비해 상대적으로 높은 결합 친화성을 가지는 GHRH 유사체를 지시한다. 발명자는 그런 GHRH 유사체의 일반 아미노산 서열을 식별하였다. "GHRH 유사체"라는 용어는 GHRH 작용제를 의미하고, 보다 구체적으로는 GHRH 수용체에 높은 친화성으로 결합하고 GH를 방출하기 위해서 뇌하수체 전엽의 성장자극세포를 자극함으로써 혈장 성장 호르몬(GH)농도를 증가시키는 합성 펩티드로 이해된다.

본 발명은 또한 여기서 정의된 GHRH 유사체를 구성하는 조성과 그런 GHRH 유사체 및/또는 조성의 사용 방법과 관련된다.

GHRH 유사체, 유도체 또는 그 염

제 1 측면에 따르면, 본 발명은 GHRH 유사체와, 작용 유도체 또는 그의 약제학적 수용가능한 염과 관련된다. 보다 구체적으로, 본 발명의 GHRH 유사체는 다음 식 X를 따르는 아미노산 서열을 가지고 있다. 식 X :

Tyr-A2-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-A8-A9-A10-Arg-Lys-Val-Leu-A15-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-A21-A22-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-A30-NH₂, 여기서

A2 는 Ala 또는 D-Ala ;

A8 은 Asn, D-Asn 또는 Ala ;

A9 는 Ser 또는 Ala ;

A10 은 Tyr 또는 D-Tyr ;

A15 는 Gly, Ala 또는 D-Ala ;

A21 는 Lys 또는 D-Lys ;

A22 는 Leu, D-Leu, Lys 또는 Ala ; 그리고

A30 은 결합 또는 1에서 15의 어떤 아미노산 서열의 잔기이다.

용어 "잔기"는, 아미노산과 관련되어 사용될 때, 아미노기의 수소 하나와 카르복실기의 히드록시기를 제거함으로써 대응되는 아미노산으로부터 유도되는 라디칼을 의미한다.

더욱이, 본 발명의 GHRH 유사체는 실질적으로 자연상 발생 GHRH의 시험관 효능지수보다 실질적으로 높은 시험관 효능지수를 가진다. "자연상 발생 GHRH"는 hGHRH(1-29)NH₂(자연적 GHRH 펩티드의 작용부분)과 hGHRH(1-44)NH₂(완전한 자연적 GHRH 펩티드) 양자를 포함한다.

여기에 사용된 "시험관 효능지수"라는 표현은 hGHRH 수용체를 표현하는 BHK 세포에서, i- hGHRH(1-29)NH₂와 비교되는 GHRH 유사체의 상대 결합 친화성을 곱함으로써 유래되고; ii- 인간 혈장 또는 혈청에서 바람직하게 60 또는 180분-배양 후 hGHRH(1-29)NH₂와 비교되는 조성의 시험관 내 단백질 분해에 대한 상대 저항성을 곱함으로써 유래되는 비교도구를 나타낸다.

여기에 사용된, "상대적으로 높은 결합 친화성"은 본 발명에 따른 GHRH 유사체가 자연적 GHRH의 결합 친화성보다 적어도 약 100배보다 높게 인간 GHRH 수용체에 대한 결합 친화성을 가진다는 것을 의미한다.

여기에 사용된, "증가된 단백질 분해에 대한 저항성"은, 인간 혈청 또는 혈장에서 시험관 배양시, 본 발명에 따른 GHRH 유사체가 실질적으로 자연적 GHRH와 비교하여, 적어도 약 50%와 같은, 평균 잔기량 비율보다 높은 것을 의미한다.

본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 본 GHRH 유사체, 유도체 또는 그의 염의 시험관 효능지수를 특징짓기 위해서 사용된 "실질적으로 높은"이라는 표현은 자연적 hGHRH(1-29)NH₂의 시험관 효능지수보다 바람직하게 적어도 500배 높은 시험관 효능지수를 지시하고, 보다 바람직하게는 1500배 높고, 심지어 2500배 높은 것을 지시한다.

여기에 사용된, "기능적 유도체"라는 용어는 일반적으로 이해되듯이, 본 발명의 GHRH 유사체의 생물학적 활성과 실질적으로 유사한 생물학적 활성을 가지는 단백질/펩티드 서열을 언급한다. 본 발명에 따른 GHRH의 기능적 유도체는 공유적으로 연결된 탄수화물과 같은 번역 후 변형을 포함하거나, 또는 특정 기능의 수행을 위해서 필요하지 않다면 불포함할 수 있다. "기능적 유도체"라는 용어는 "조각", "구역", "변형" 또는 본 발명에 의해 숙고된 바와 같은 GHRH 유사체의 "화학적 유도체"를 포함한다.

인정되듯이, 식 X는 아미노산(A) 서열이다. 일반적으로, 여기서 아미노산을 표지하기 위해서 사용된 약칭은 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회(생화학, 1972, 11 : 1726-1732)의 추천의 근거한다. 보다 구체적으로, "아미노산"이라는 용어는 펩티드 화학의 일반 교과서(키플, K.D, "펩티드와 아미노산", W.A. 벤자민, inc., 뉴욕, 1966; "펩티드", E.D. 그로스 E.와 마이엔호퍼 J., vol.1, academic press, 뉴욕, 1979), 에서 설명되고, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 히드록시리신, 히드록시프롤린, 이소루신, 루신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 피로글루탐산, 사코신, 세린, 트레오닌, 트리토판, 티로신 그리고 발린을 포함한다.

여기에 설명된 본 발명에 따른 GHRH 펩티드는 Atherton E. L. Sheppard R. C.가 설명한 고체상 펩티드 화학 t-Boc-Acid-Labile 보호 방식을 사용하여 바람직하게 합성되었다("고체상 펩티드 합성: 실용적 접근", IRL press, 옥스퍼드대학 출판, Oxford, England, 1989, pages 1-203). 본 발명에 따른 GHRH 유사체는 당업자에게 알려진 다른 방법에 의해서도 제공될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

본 발명에 따르면, 자연적 형태의 GHRH에서 다중 치환의 다른 조합이 바람직하다. 따라서, 그런 한 조합에서, 바람직한 GHRH 유사체는 다음 치환을 가지는 전술된 식 X를 포함하여 구성된다 : A2는 D-Ala, A8은 Ala, A15는 Ala, A22는 Lys 이다. A9, A10, A21 그리고 A30은 앞서 정의된 바와 같다.

본 발명에 따른 바람직한 유사체는 다음 치환을 가지는 식 X로 구성된다 : 여기서 A2 는 D-Ala, A10은 D-Tyr, 그리고 A22는 Lys이다. A8, A9, A15, A21 그리고 A30은 앞서 정의된 바와 같다.

본 발명에 따른 바람직한 또 다른 유사체에 따라, 상기 유사체는 식 X로 구성되는데, 여기서 A2 는 D-Ala, A10은 D-Tyr, 그리고 A15는 D-Ala 그리고 A22는 Lys이다. A8, A9, A21 그리고 A30은 앞서 정의된 바와 같다.

약제학적 조성

다른 측면에 따르면, 본 발명은 앞서 설명된 대로 GHRH 유사체, 기능적 유도체 또는 그 염의 약제학적으로 유효한 양으로 구성되는 약제학적 조성 및 약제학적 수용가능 운반체와 관련된다.

여기서 사용된 "조성"이라는 용어는 바람직한 양으로 본 발명의 GHRH 유사체를 구성하는 제품을 포함한다. "약제학적 수용가능"은 그 운반체가 상기 식의 GHRH 유사체와 적합해야 하고, 유효효과없이 숙주에 투여될 수 있어야 한다는 것을 의미한다. 이 분야에서 알려진 적합한 약제학적 수용가능 운반체는 무균수, 식염수, 글루코스, 텍스트로스 또는 완충액을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 운반체는 희석제, 안정제(예를들면, 설탕과 아미노산), 보존제, 습윤제, 에멀전화제, pH완

충제, 점도증진첨가제, 락토스, 착색제등을 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 의해 숙고된 바람직한 약제학적 수용가능 운반체는 0.9%에서 사용되는 염화나트륨과 같은 식염 용액과 흡입용으로 의도된 건분말 형식의 조제를 위해 사용되는 락토스이다.

사용방법

본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 GH 결핍-관련 상태의 치료제로 이용되는 제약의 조제는 물론이고, 발명에 따른 생체내 GH의 방출의 특정 자극을 위해서 동일하게 구성되는 GHRH 유사체의 용도 또는 약제학적 조성과 관련된다. "치료"는 치료적 치료와 예방 또는 방지 수단 양자를 의미한다. 치료를 필요로 하는 사람들은 GH결핍 또는 장애를 가질 경향이 있는 사람들과 GH결핍 또는 장애를 이미 가진 사람들은 물론, GH 결핍이나 장애가 예방되어야 하는 사람들을 포함한다.

본 발명에 따르면, "생체내에서의 GH방출의 특정 자극"은 혼합된 수용체들을 포함하는 샘플에서, GHRH 수용체에 직접 결합함으로써 GH방출을 활성화하나, 다른 수용체 분자에 직접 결합하여서는 GH방출을 활성화하지 않는 본 발명의 GHRH 유사체의 활성을 말한다.

본 발명에 따른 GH 결핍관련 상태는 다음을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다 : 시상하부 뇌하수체 난장이증, 화상, 골다공증, 콩팥 장애, 비접합 뼈 골절, 급/만성 쇠약 질병 또는 감염, 상처치료, 수술후 문제, 수유 실패, 여성불임, 암환자의 약액질, 동화 및/또는 이화 문제, T-세포 면역결핍, 신경퇴화상태, GHRH 수용체의존성 종양, 노화, 수면 장애, 근육소모 질병. 여기에서 사용된 근육소모질병은 다음의 하나가 될 수 있다 : 사코페니아(sacorpenia), 노인 쇠약, HIV 그리고 암. 보다 구체적으로 본 약제학적 조성의 용도는 화학요법 또는 방사능요법에 관련된 부작용을 보이는 암환자를 대상으로 하는 것일 수 있다.

또 다른 측면은, 본 발명은 포유류에서 GHRH 유도 생물학적 활성을 개시하는 방법을 제공한다. 그 방법은 여기서 정의된 포유류에 GHRH 유사체, 상기 유사체의 유도체 또는 그의 약제학적 수용가능 염 또는 위에서 정의된 약제학적 조성의 유효량을 투여하는 단계를 포함하여 구성된다.

여기서 "GHRH 유도 생물학적 활성"은 이에 한정되지 않지만 다음을 포함한다 : 수면조절, 음식 섭취 조절 그리고 단백질 합성 증가. GHRH 유사체 투여 후 본 발명에서 관측되는 단백질 합성 증가는 Lapierre H. et al. (1995). J. Dairy Sci. 78: 804-815; DUBREUIL, P. et al. (1996) Can J. Vet. Res. 60 (1) : 7-13; Lapierre H. et al. (1992) J. Anim. Sci. 70 (3): 764-772; and Farmer C. et al. (1992) BIOL. Neonate 61 (2): 110-117에서 설명된 근육 질량 증가 또는 젖 생산 증가 또는 기타 다른 것들로 해석될 수 있다.

여기서 "포유류"라는 용어는 포유류로 분류되는 사람, 가축, 그리고 개, 말, 고양이, 소, 돼지등과 같은 동물원, 운동, 애완 동물을 포함한 GHRH 수용체 활성의 조절이 요구되는 동물을 말한다. 여기서 사용된 "조절"은 에고니즘(egonism) 및/또는 부분적 에고니즘을 포함하기 위해 의도되었다.

"유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 다른 치료사에 의해 찾아지는 생물학적 또는 임상학적 조직, 계, 동물 또는 사람의 반응을 도출할 GHRH 유사체의 양을 의미한다. 즉, 특별한 질병을 치료하기 위한 조성의 유효량은 개선하기에 또는 어떤 식으로 질병과 관련된 증상을 감소시키기 위해 충분한 양이다. 그런 약은 1회 복용으로 투여되거나 효과적인 요법에 따라 투여될 수 있다. 그 양은 질병을 치료할 수 있으나, 전형적으로는 질병의 증상을 개선하기 위해서 투여된다. 조성의 "투여"과 "투여하는 것"은 본 발명의 GHRH 유사체 또는 조성을 치료를 필요로 하는 개인에게 제공하는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

본 발명의 GHRH 유사체와 조성은 다양한 투여 경로로 포유류에게 주어질 수 있다. 예를 들면, 조성은 무균 점종 수용성 또는 지용성 현탁액과 같은 제제무균 점종 제제의 형태로 투여될 수 있다. 이러한 현탁액은 적당한 분산제 또는 습윤제 그리고 현탁제를 사용하여 당업자에게 알려진 기술에 따라 형성될 수 있다. 무균 점종 조제는 무독성 비경구적 수용가능한 희석제 또는 용제를 사용하여 또한 무균점종 용액 또는 현탁액이 될 수 있다. 그들은 예를 들면 정맥내로, 또는 근육내 점종에 의해서 또는 투여에 의해서 비경구적으로 주어진다. 본 발명에 따른 GHRH 유사체와 조성은 전형적인 투여를 위하여 또한 크림, 연고, 로션, 젤, 방울, 좌약, 스프레이, 액체 또는 분말로 형성될 수 있다. 그들은 또한 압력 에어로졸 분산기, 비강 스프레이기, 연무기, 계량 분량 흡입기, 건조 분말 흡입기, 또는 캡슐을 이용하여 대상체의 기도 안으로 투여될 수 있다. 적당한 용량은 조성에서의 구성요소의 각자의 양, 원하는 효과(단기 또는 장기), 치료될 병 또는 장애, 투여 경로, 생체이용률, 그리고 치료될 포유류의 나이와 체중과 같은 요소에 따라 변할 것이다. 어떤 경우든, 본 발명에 따른 GHRH 유사체와 조성을 투여하기 위해서, 당업계에 알려진 방법들이 사용될 수 있다.

실시예들

다음 실시예들은 본 발명의 잠재적인 적용의 넓은 범위를 설명하나 그 범위를 제한하기 위해 의도된 것은 아니다. 변형과 변경이 본 발명의 범위와 사상으로 부터 벗어나지 않으면서 그 안에서 만들어질 수 있다. 여기서 설명된 그것들과 동일하거나 유사한 어떤 방법들이나 재료들이 본 발명의 시험을 위해서 실제 사용될 수 있지만, 바람직한 방법과 재료가 설명된다.

실시예 1

GHRH 수용체 결합 친화성으로부터 시험관내 데이터에 기초한 GHRH 유사체의 초기 선택

미국 특허번호 제 5,854,216 호에 설명된 최초 14 다중치환 GHRH 유사체로부터 후보의 초기 선택은 생후 2월의 수컷 스프라그 도리(Sprague Dawley) 쥐 뇌하수체 전엽 조직표본의 수용체 친화성에 대한 시험관내 데이터에 기초하였다. 본 발명은 hGHRH-R로 진행형질 전환된 BHK(새끼 햄스터 신장)세포내에서 인간 GHRH 수용체(hGHRH-R)에 대해 선택된 GHRH 유사체의 친화도와, 쥐 혈청, 인간 혈장 또는 인간 혈청에서 단백질 분해에 대한 저항성에 기초한다. 보다 정확하게,

hGHRH(1-29)-NH₂-에 대비되어, i- 시험관내에서 BHK- 표현 세포내의 hGHRH-R와 시험관 내에서 쥐 뇌하수체 전엽 hGHRH(1-44)-NH₂ 결합부들에 대한 그들의 증가된 결합 친화성; 그리고 ii- 그들의 시험관내에서 단백질 분해에 대한 상대 저항성으로 바람직한 의약 후보가 선택되었다.

아래의 표 1로부터 알 수 있듯이, 쥐 GHRH 수용체를 가진 합성 펩티드의 상대 결합 친화성은 인간 수용체를 가진 상대 결합 친화성의 예측가능한 정도가 아니다. 알 게 될 것이지만, 이 시점 이후, 표 1에 제시된 GHRH 유사체는 GHRH 유사체 #1 에서 5로 언급될 것이다.

표 1.
각각의 쥐 뇌하수체 전엽 막 표본과 쥐 혈청에서 GHRH의 전체 생물활성에 대한 수용체 친화도와 시험관내 단백질 분해 저항성, 그리고 BHK세포막 표본에서의 수용체 친화도의 예상되는 이론적 연관 효과에 기초한 초기 선택

번호	구조	쥐 뇌하수체 전엽에서 상대 결합 친화성*†	hGHRH-R BHK 표지 세포에서 상대 결합 친화성*†	시험관내 단백질 분해 상대 저항성
1	[D-Ala ² , Ala ⁸ , Ala ¹⁵ , Lys ²²] hGHRH(1-29)-NH ₂	133.33 ± 0.31	499 ± 234	1.87
2	[Ala ⁸ , Ala ⁹ , Ala ¹⁵ , Ala ²²]-NH ₂	7.74 ± 3.49	3.70 ± 0.52	1.81
3	[D-Ala ² , D-Tyr ¹⁰ , Lys ²²]-NH ₂	4.90 ± 2.70	239 ± 55	2.25
4	[D-Ala ² , Ala ⁸ , D-Tyr ¹⁰ , Ala ¹⁵ , D-Lys ²¹ , Lys ²²]-NH ₂	5.00 ± 0.91	0.05 ± 0.01	6.06
5	[D-Ala ² , D-Tyr ¹⁰ , Ala ¹⁵ , Lys ²²]-NH ₂	1.04 ± 0.40	939 ± 249	3.13

표 1에서 GHRH 유사체 번호들은 미국 특허 등록번호 제 5,854,216의 27-28페이지의 표 11에서의 번호 13, 11, 7, 14, 그리고 8에 각각 대응한다. *, 값은 hGHRH(1-29)-NH₂에 비교되었다.; †, 구조-친화성 연구에서 방사성 리간드로서 [125I-Tyr10] hGHRH(1-44)-NH₂의 사용.

실시예 2

본발명에 따른 GHRH 유사체와 자연적 GHRH의 처리 - 실험적 분석

1- 경쟁적 결합 분석

¹²⁵I-GHRH 결합 분석은 앞서 설명한대로 방사성 리간드로서 [¹²⁵I-Tyr¹⁰] hGHRH(1-44)-NH₂를 사용하여 실행되었다(Boulanger L, (1999) Neuroendocrinology 70: 117-127). 경쟁실험은 5 mM MgCl₂, 5mM EDTA 와 0.42% BSA를 포함하는 전체부피 300 μl의 50 mM 트리스-아세트레이트 버퍼(pH 7.4)에서, hGHRH(1-29)NH₂, hGHRH(1-44)NH₂ 또는 GHRH 유사체의 농도를 (0-1000nM)로 증가시키면서 BHK(새끼 햄스터 신장) 570 세포막 표본(단백질 25μg/분석튜브)에서 실시되었다. 배양은 평형상태에서 (23°C, 60 분) 수행되었고, 원심분리법(12,000 g, 5 분, 4°C)에 의해서 정지되었다. 펠렛의 방사능활성 함량은 감마 계수에 의해서 결정되었다. hGHRH(1-29)NH₂의 친화도는 분석의 유효성을 평가하고, 유사체의 상대 친화도를 결정하기 위해서 각 실험에서 시험되었다. 리간드 컴퓨터 프로그램은 표 2와 표3에 보고된 GHRH 유사체의 경쟁곡선을 분석하고 그들의 IC₅₀을 결정하기 위해서 사용되었다(Gaudreau P. et al. (1992) J Med Chem, 35: 1864-1869).

2- 시험관 내에서 혈청과 혈장내의 단백질 분석

300 mM hGHRH(1-29)NH₂ 또는 GHRH 유사체 10 μl 용액이 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해되었고 다음 조건의 하나에서 배양되었다 : a- 폴리프로필렌 튜브내에 생후 2개월된 수컷 스프라그 도리(Sprague Dawley) 쥐 190 μl 혈청(1/100 희석 피코수준순수)을 37°C에서 0, 8, 15, 30 또는 60 분동안; b- 190 μl 건강한 인간 자원공혈자 혈장(휴먼 홀 블러드 Na EDTA로부터, 남성, 약물비복용(알고리즘에 제약사); 프로젝트:MTL-P2-155; Lot:MTLP2155-01, 랩 Dev int로부터 지원); 그리고 c-190 μl 건강한 자원공혈자 혼주 혈청의 190 μl, 로트 X409(랩 Dev int로부터 지원) 폴리프로필렌 튜브내에 37°C에서 0, 60, 120, 180 또는 420분동안. 단백질 분해는 얼음 냉각 정지 버퍼(칼륨-인산염 버퍼, 삼불화아세트산(TFA)로 pH 0.8까지 산성화) 800μl를 첨가하고 5분간 끓임으로써 정지되었다(쥐 혈청만). 원심분리 후(12000g, 5분 4°C), 혈청-펩티드 혼합체는 혈청단백질로부터 자연적 GHRH 또는 GHRH 유사체 잔기 농도를 추출하기 위해서 조절된 Sep-Pak C-18 카트리지에 통과되었다. 자연적 GHRH 또는 유사체는 50% 아세토니트릴-0.01% TFA/50% 0.01% 수용성 TFA 2ml에 녹여서 분리되었다. 시간 0에서 GHRH 또는 유사체 1 μg을 나타내는 추출된 펩티드 200 μl는 1 μ-Bondapak C18 칼럼(10μm 입자 크기, 0.39×15cm)(쥐 혈청) 또는 연속되는 두개의 C18 칼럼(인간 혈청 및 혈장) 그리고 pH 2.5 0.01M NaClO₄와 아세토니트릴로 구성된 이원성 용제 시스템 분석 HPLC에 의해 측정되었다. 30에서 60% 아세토니트릴 45분이상(쥐 혈청) 또는 30에서 50%(인간 혈청 및 혈장) 선형 경사가 사용되었다. 30에서 60% 아세토니트릴 사용되었다. 무손상 펩타이드의 세척분리는 214nm에서 관측되었고 잔기 농도는 꼭지 표면 구역의 평가에 의해서 결정되었다.(Boulanger L, 등(1993) Brain Res 616:39-47; Boulanger L, 등(1992) 펩티드 13:681-689)

3- 시험관 내에서 자연적 GHRH 또는 GHRH 유사체의 투여

GH 분비를 자극하기 위한 인간 GHRH 유사체 #5(인간 [D-Ala², D-Tyr¹⁰, Ala¹⁵, Lys²²] GHRH (1-29) NH₂ 유사체)가 성인 암컷 쥐(치료의 시작에서 26-34 주) 그리고 수컷 비글 개에서 연구되었다.

i- 시험관내에서 쥐에 투여

USP 주입을 위하여 0.9 염화나트륨 내에 인간 GHRH 유사체 #5가 정맥내(IV) 또는 피하내(SC)주입으로 암컷 쥐에 한 번 투여되고 표 2에 보여진 바와 같이 14일간의 관측이 따랐다. 투여 전에, 모든 투여형식은 무균성을 보증하기 위해 0.22 µm 필터를 사용하여 여과되었다. 투여된 GHRH 유사체 #5의 실제량이 계산되었고 동물의 가장 최근 체중에 기초하여 조절되었다. 투여는 각 일자별로 대략 같은 시각에 시작되었는데, 오전9:00±30분에 시작하였다.

표 2.
시험관 내에서 GHRH 유사체 #5의 암컷 쥐에 투여

치료그룹	투여수준(mg/kg)	투여농도(mg/ml)	투여경로	동물 수
1(네거티브 조절*)	0	0	SC	4
2	0.001	.001	SC	4
3	0.01	.01	SC	4
4	0.03	.03	SC	4
5	0.1	0.1	SC	4
6	0.3	0.3	SC	4
7	1	1	SC	4
8	3	3	SC	4
9	0.001	0.001	IV	4
10	0.03	0.03	IV	4
11	3	3	IV	4
12(포지티브 조절**)	0.03	0.03	IV	4

* 네거티브 조절(1 그룹)동물은 운반체만을 받았다(NaCl)

** 포지티브 조절(12 그룹)동물은 hGHRH(1-44)만을 받았다.

약역학적 조사를 위하여, 혈액 샘플(대략 1.3ml)이 목 정맥 뚫기를 통하여 다음 시간 포인트에서 그룹마다 또한 시간 포인트마다 2 동물로부터 수집되었다.: 투여 전, 투여 후 4, 10, 15, 45분 과 5시간. 모든 혈액 샘플은 나트륨 EDTA 튜브에 수집되었고 냉장하에서 원심분리되었다(2에서 8°C, 10분동안 1500g).

ii- 쥐 성장 호르몬 결정

혈장 GH는 그들 고유의 키트를 사용하는 링크 진단 서비스에 의해 결정되었다.

린트의 쥐 성장 호르몬 방사성 면역측정법 키트(RIA)(RGH-45HK)는 혈청, 혈장, 그리고 조직배양 배지에서 쥐 성장 호르몬의 정량 결정을 위하여 의도되었다. 항체는 재조합 쥐성장 호르몬에 대비하여 성장되고 추적자와 표준 모두가 같은 재조합 쥐 성장 호르몬으로 준비되었기 때문에 완전한 상동 분석이다. 키트는 RIA를 완료하기 위해 필요한 표준, 항체, 추적자, 정량 조절, 침전 시약 그리고 버퍼를 포함한다. 이런 분석은 다음 조건하에서 이루어 졌다: 밤새도록; 실온에서 평형 배양; 샘플 부피: 100µl 혈청, 혈장, 또는 세포 배양 배지. 사용된 라벨은 ¹²⁵I-쥐 성장 호르몬(20,000 CPM/튜브)

분석의 수행은:

ED80 = 1.0 ± 0.1 ng/ml

ED50 = 4.7 ± 0.2 ng/ml

ED20 = 23.1 ± 0.7 ng/ml

마지막으로, 분석의 특이성은 다음과 같다:

쥐 성장 호르몬 100%;

쥐 프로락틴 < 0.1%

돼지 성장 호르몬 < 0.5%

인간 성장 호르몬 < 0.1%

iii- 생체내에서 수컷 비글 개에 투여

USP 주입을 위해 0.9% 염화나트륨 내의 인간 GHRH 유사체 #5가 3, 5 그리고 8일에 0.01, 0.1 그리고 1mg/체중 kg 로 각각 표 3에 보여진 바와 같이 대략 8개월된 수컷 개에 피하투여(SC)에 의해 투여되었다. 1일에, 개는 조절(운반)체를 받았고, 11일에 그 동물은 0.01mg/kg 투여 수준의 hGHRH(1-44)NH₂ 포지티브 조절을 받았다. 투여 전에, 모든 투여형식은 무균성을 보증하기 위해 0.22 μm 필터를 사용하여 여과되었다. 투여된 GHRH 유사체 #5의 실제량이 계산되었고 동물의 가장 최근 체중에 기초하여 조절되었다. 투여는 각 일자별로 대략 같은 시각에 시작되었는데, 오전 9:00±30분에 시작하였다.

표 3.
생체내에서 GHRH 유사체 #5의 수컷 비글 개에 투여

일	투여수준(mg/kg)	투여 농도(mg/ml)	투여 경로	동물 수
1(네거티브 조절)	0	0	SC	1002A
3	0.01	0.01	SC	1002A
5	0.1	0.1	SC	1002A
8	1.00	1.00	SC	1002A
11(포지티브 조절)	0.01	0.01	SC	1002A

* 네거티브 조절 : 동물은 운반체만을 받았다(NaCl)

** 포지티브 조절(1일): 동물은 HGHRH(1-44)만을 받았다.

약역학적 조사를 위하여, 혈압 샘플(대략 10ml)이 목 정맥 뚫기를 통하여 다음 시간 포인트에서 그룹마다 또한 시간 포인트마다 2 동물로부터 수집되었다.: 투여 전, 투여 후 7, 15, 22, 30, 45분 그리고 60분. 모든 혈액 샘플은 나트륨 EDTA 튜브에 수집되었고 냉장하에서 원심분리되었다(2에서 8°C, 10분동안 1500g).

iv- 송곳니 성장 호르몬 결정

혈장 GH는 그들 고유의 키트를 사용하는 링크 진단 서비스에 의해 결정되었다.

린토의 쥐 성장 호르몬 방사성 면역측정법 키트(RIA)(RGH-46HK)는 혈청, 혈장, 그리고 조직배양 배지에서 성장 호르몬의 정량하기 위하여 개발되었다. 항체는 재조합 돼지 성장 호르몬에 대비하여 성장되고 추적자와 표준 모두가 같은 재조합 돼지 성장 호르몬으로 준비되었기 때문에 완전한 상동 분석이다. 돼지 성장 호르몬과 쥐 송곳니 성장 호르몬의 아미노산 배열은 동일하기 때문에 돼지 성장 호르몬에 대해 진행된 이 분석은 동일한 효율로 송곳니 성장 호르몬 수준을 측정한다. RIA를 완료하기 위해 필요한 모든 구성요소는 포함된다(표준, 항체, 추적자, 정량 조절, 침전 시약 그리고 버퍼). 분석은 다음 조건하에서 이루어 졌다: 밤새도록; 실온에서 평형 배양; 샘플 부피: 100μl 혈청, 혈장, 또는 세포 배양 배지. 사용된 라벨은 125I-돼지/송곳니 성장 호르몬(18,000 CPM/튜브)

분석의 수행은:

ED80 = 2.3 ± 0.2 ng/ml

ED50 = 9.8 ± 0.5 ng/ml

ED20 = 41.8 ± 1.4 ng/ml

마지막으로, 분석의 특이성은 다음과 같다:

돼지 성장 호르몬 100%;

돼지 프로락틴 < 0.1%

송곳니 성장 호르몬 100%

인간 성장 호르몬 < 0.5%

실시예 3

시험관내에서 쥐 혈청 내 hGHRH(1-29)NH₂와 대비되는 유사체의 단백질 분해 저항성

표 4에서 제시된 바와 같이, 60분 배양 기간 후에, 모든 GHRH 유사체는 hGHRH(1-29)NH₂와 대비하여 현저히 더 높은 잔기 농도를 보여준다. 더욱이, GHRH 유사체 #5의 잔기 농도는 GHRH 유사체 1, 2, 또는 3중의 어느 하나의 그것보다 현저히 더 높는데, 이러한 결과는 설명된 측정법을 사용할 때 GHRH 유사체#5가 단백질 분해에 시험관내 최상의 저항성을 보여준다는 것을 지시한다.

표 4. 시험관내 쥐 혈청 내 hGHRH(1-29)NH₂와 대비되는 유사체의 단백질 분해저항성

화합물	배양 시간(분)	잔기 농도(초기 농도의 %)
인간 GHRH(1-29)NH ₂ (n=19)	0	100 ±0
	8	81 ±2
	15	66 ±3
	30	43 ±2
	60	16 ±1
GHRH 유사체 #1 (n=3)	0	100 ±0
	8	75 ±12
	15	70 ±15
	30	53 ±8
	60	30 ±6
GHRH 유사체 #2 (n=4)	0	100 ±0
	8	83 ±3
	15	73 ±5
	30	53 ±3
	60	29 ±2
GHRH 유사체 #3 (n=4)	0	100 ±0
	8	82 ±7
	15	88 ±7
	30	70 ±12
	60	36 ±4
GHRH 유사체 #4 (n=4)	0	100 ±0
	8	98 ±2
	15	100 ±0
	30	99 ±1
	60	97 ±3
GHRH 유사체 #5 (n=4)	0	100 ±0
	8	92 ±5
	15	82 ±6
	30	74 ±7
	60	50 ±3

값들은 GHRH 유사체에 대해서 3 내지 4회 실험의 평균 ± SEM과 hGHRH(1-29)NH₂에 대해서 19회 실험의 평균 ± SEM을 나타낸다.

실시예 4

시험관내에서 인간 혈장 및 혈청 내 hGHRH(1-29)NH₂와 대비되는 유사체의 단백질 분해 저항성

이제 표 5와 표 6을 참조하면, 시험관 내에서 hGHRH(1-44)NH₂, hGHRH(1-29)NH₂, 그리고 세 개의 GHRH 유사체에 대한 단백질 분해 저항성의 값을 볼 수 있다. 이러한 저항성은 인간 혈장(표 5)과 인간 혈청(표 6)내 0에서 420분간 변하는 배양시간에 대해 각 펩티드의 평균 잔기 양으로서 표현되었다. 보다 구체적으로는, 그 값은 평균, 표준 편차와 3 내지 7회의 실험평균으로부터 표준오차를 나타낸다.

표 5에서 특별히 인정되듯이, GHRH의 자연적 형태에 관하여, 180에서 420-분으로 변하는 배양 시간은 상기 펩티드의 평균 잔기량에 있어서 현저한 감소로 이끌었다. 대조적으로, 180-분 배양 후, 모든 세 개의 유사체는 여전히 상대적으로 높은 평균 잔기량(68에서 81%)를 나타낸다. 더욱이, 420-분 배양 후에도, GHRH 유사체 #5는 여전히 평균 잔기량의 75%를 제시한다. P<0.05에서 통계학적 유의성이 설립되고, 웰치 보정된 양쪽 비쌍 학생의 t-검정법을 사용할 때, 인간 GHRH(1-29)NH₂에 비교되는 유사체들의 잔기량의 사이에서 중요한 차이가 관측되었다. 심층적 통계 분석에 따르면, hGHRH(1-29)NH₂의 잔기량은 GHRH 유사체 # 1, 3, 그리고 5의 어떤 것의 그것보다 인간 혈장에서 현저히 낮다는 것이 관측되었다(P<0.01). 그러나, 이러한 유사체들의 평균 잔기량은 서로간에는 현저한 차이가 없었다.

이제 표 6을 참조하면, 420-분 배양에서, hGHRH(1-29)NH₂가 완전히 사라진 반면, GHRH 유사체 #5는 그 초기 농도의 50%가 남았다는 것을 인정할 수 있다.

따라서, 인간 혈청과 혈장모두에서 배양에서, 자연적 GHRH의 잔기량은 그 유사체의 그것보다 현저히 낮았다.

표 5.
시험관내에서 인간 혈장 내 배양시 자연적 GHRH와 GHRH 유사체의 단백질 분해 저항성

펩티드	IT(분)	평균잔기량(%)	SD	SEM	n
hGHRH(1-44)NH ₂	0	100	0	0	3
	180	31	1	1	3
	420	3	5	3	3
hGHRH(1-29)NH ₂	0	100	0	0	5
	60	53	7	4	4
	120	44	5	3	4
	180	23	15	5	8
	420	5	9	5	3
(D-Ala-2, Ala-8, Ala-15, Lys-22)hGHRH(1-29)NH ₂	0	100	0	0	4
	60	79	7	4	4
	120	63	7	4	4
	180	68	1	1	3
(D-Ala-2, D-Tyr-10, D-Ala-15, Lys-22)hGHRH(1-29)NH ₂	0	100	0	0	4
	60	87	10	5	4
	120	78	15	8	4
	180	81	11	6	4
(D-Ala-2, D-Tyr-10, D-Ala-15, Lys-22)hGHRH(1-29)NH ₂	0	100	0	0	4
	60	92	10	5	4
	120	84	12	6	4
	180	78	11	4	7
	420	75	3	2	3

IT : 배양시간; SEM : 평균으로부터 표준오차(standard error from the mean); SD :표준편차, n : 실험 횟수

표 6.
인간 혈청내 배양 직후의, 자연적 GHRH 및 GHRH 유사체의 실험상 단백질분해 저항.

펩티드	IT(분)	평균 잔류량 (%)	SD	SEM	n
hGHRH(1-29)NH ₂	0	100	0	0	3
	60	57	11	6	3
	120	37	2	1	3
	180	16	10	4	6
	420	0	0	0	3
(D-Ala-2, D-Tyr-10, D-Ala-15, Lys-22)hGHRH(1-29)NH ₂	0	100	0	0	3
	60	88	20	12	3
	120	76	8	5	3
	180	63	5	2	6
	420	50	7	4	3

IT:배양 시간 ; SEM:평균으로부터의 표준오차 ; SD:표준편차 ; n:실험횟수

실시예 5

hGHRH 에 대한, 자연적 및 유사 형태에서의 GHRH의 결합 친화성

표 7에 나타난 바와 같이, 인간 GHRH(1-44)의 IC₅₀ 및 GHRH 유사체 #5 사이에 아무런 현저한 차이도 관찰되지 않았으며(웰치(Welch) 보정된 양쪽 비쌍 학생들의 t 검정, P < 0,05 에서 확립된 통계적 의미), 이 GHRH 유사체는 최소한 인간 GHRH 수용체에 대한 인간 자연적 GHRH(1-44)NH₂ 만큼 높은 친화성을 가지고 있다는 것을 보여준다.

수치들은 유사체들에 대해 삼중적으로 행해진 3실험의 평균 ±SEM 및 GHRH(1-44)NH₂에 대해 삼중적으로 행해진 2 실험의 평균 ±SEM 을 나타낸다. IC₅₀은 경쟁곡선들의 분석을 위한 리간드 프로그램에 의해 결정된 것처럼 ¹²⁵I-GHRH 특성결합의 50%를 억제하는 펩티드의 농도(concentration)이다.

표 7.
시험관 내에서 인간 GHRH 수용체를 표현하는 BHK 세포막 표본에서의 인간 GHRH 유사체 #5 및 hGHRH(1-44)NH₂의 결합친화성

번호	화합물 명칭	IC ₅₀
	인간 GHRH(1-44)NH ₂	5.2±3.4
5	[D-Ala ² ,D-Tyr ¹⁰ ,D-Ala ¹⁵ ,Lys ²²] hGHRH(1-29)NH ₂	1.2±0.4

실시예 6

인간 GHRH 수용체를 표현하는 BHK 세포막 표본에서의 인간 hGHRH(1-29)-NH₂ 유사체와 hGHRH(1-29)-NH₂ 결합 친화성 및 유사체들의 실험상 단백질분해 저항

표 8 내지 11에 나타난 결합 분석 결과에 대하여, 수치들은 유사체들에 대해 삼중적으로 행해진 8개 독립적 실험들의 평균±SEM 및 hGHRH(1-29)NH₂에 대해 삼중적으로 행해진 4개 실험들의 평균±SEM 을 나타낸다. IC₅₀은 경쟁곡선들의 분석을 위한 리간드 프로그램에 의해 결정된 것처럼 ¹²⁵I-GHRH 특성결합의 50%를 억제하는 펩티드의 농도 (concentration)이다. 상대 친화성은 hGHRH(1-29)NH₂/IC₅₀의 IC₅₀ 비를 취해 얻어졌다.

표 9 내지 11에 나타난 단백질분해 분석 결과에 대해서, 수치들은 3 내지 5개 실험들의 평균±SEM 이다.

다음의 표 8에 나타난 바와 같이, GHRH 유사체 #1,2,3 및 5는 자신의 수용체에 대한 hGHRH(1-29)NH₂의 경우보다 현저하게 높은 결합 친화성을 보여준다. 더욱이, 인간 GHRH 수용체에 대한 GHRH 유사체 #1 및 #5의 상대 결합 친화성이 상호간 현저하게 다르지 않음에도 불구하고, GHRH 유사체 #5의 친화성은 #3의 경우보다 현저하게 크다.

표 8.
인간 GHRH 수용체를 표현하는 BHK 세포들에서의 GHRH 유사체들의 실험상 상대 결합 친화성

번호	화합물 명칭	IC ₅₀ (농도)	hGHRH를 표현하는 BHK 세포들에서의 hGHRH(1-29)NH ₂ 와 비교한 화합물의 상대 결합 친화성(R1)
1	[D-Ala ² ,Ala ⁸ ,Ala ¹⁵ ,Lys ²²]인간 GHRH(1-29)NH ₂	33 ± 12 pM	499±234
2	[D-Ala ⁸ ,Ala ⁹ Ala ¹⁵ ,Ala ²²]인간 GHRH(1-29)NH ₂	0.77 ±0.09 nM	3.70±0.52
3	[D-Ala ² ,D-Tyr ¹⁰ ,Lys ²²]인간GHRH(1-29)NH ₂	6.3 ± 1.1 pM	239±55
4	[D-Ala ² ,Ala ⁸ ,D-Tyr ¹⁰ ,Ala ¹⁵ ,D-Lys ²¹ ,Lys ²²]인간GHRH(1-29)NH ₂	37 ± 4 nM	0.05±0.01
5	[D-Ala ² ,D-Tyr ¹⁰ ,D-Ala ¹⁵ ,Lys ²²]인간GHRH(1-29)NH ₂	6.0 ± 2.4 pM	939±249

표 9.
인간 혈장에서의 60분 배양후의 GHRH 유사체들의 실험상 효능지수

번호	화합물 명칭	잔류 펩티드 농도*	R1	R2	실험상 효능지수 (R1×R2)
1	[D-Ala ² ,Ala ⁸ ,Ala ¹⁵ ,Lys ²²]인간GHRH(1-29)NH ₂	79 ± 4	499 ± 234	1.52 ± 0.18	758
2	[D-Ala ⁸ ,Ala ⁹ Ala ¹⁵ ,Ala ²²]인간GHRH(1-29)NH ₂	시험불 실시	3.70 ± 0.52	시험불 실시	시험불 실시

3	[D-Ala ² ,D-Tyr ¹⁰ ,Lys ²²] 인간GHRH(1-29)NH ₂	87 ±5	239 ±55	1.69 ±0.22	404
4	[D-Ala ² ,Ala ⁸ ,D-Tyr ¹⁰ ,Ala ¹⁵ ,D-Lys ²¹ ,Lys ²²] 인간GHRH(1-29)NH ₂	시험불 실시	0.05 ±0.01	시험불 실시	시험불 실시
5	[D-Ala ² ,D-Tyr ¹⁰ ,D-Ala ¹⁵ ,Lys ²²] 인간GHRH(1-29)NH ₂	92±5	939 ±249	1.78 ±0.22	1671

*:시간 0에서 초기 내용물의 % ; R1:hGHRH 수용체를 표현하는 BHK 세포들에서 hGHRH(1-29)NH₂ 와 비교한 화합물의 상대 결합 친화성 ; R2:hGHRH(1-29)NH₂ 와 비교한 화합물의 실험상 단백질 분해에 대한 상대 저항

표 9에서 볼 수 있는 바와 같이, GHRH 유사체 #1,3 및 5의 실험상 효능지수는 각각 758,404 및 1671의 수치에 이른다. 다시 말하면, 이러한 세개(3) 유사체들은, 자연적 hGHRH(1-29)NH₂과 비교하여, 인간 혈장에서의 60분 배양 직후의 실험상 단백질 분해 저항이 현저하게 양호할 뿐만 아니라 동시에 그것들의 수용체에 대한 현저하게 높은 결합 친화성을 갖는다. 더욱이 다음의 표 10에서 볼 수 있는 바와 같이, GHRH 유사체들의 실험상의 효능지수는 인간 혈장에서의 180분 배양 직후의 것보다 한층 더 높다.

표 10.
인간 혈장에서의 180분 배양후의 GHRH 유사체들의 실험상 효능지수

번호	화합물 명칭	잔류펩티드농도*	R1	R2	실험상 효능지수 (R1×R2)
1	[D-Ala ² ,Ala ⁸ ,Ala ¹⁵ ,Lys ²²]인간GHRH(1-29)NH ₂	68 ± 1	499 ± 234	2.96 ± 0.02	1477
2	[D-Ala ⁸ ,Ala ⁹ Ala ¹⁵ ,Ala ²²]인간GHRH(1-29)NH ₂	시험불 실시	3.70 ± 0.52	시험불 실시	시험불 실시
3	[D-Ala ² ,D-Tyr ¹⁰ ,Lys ²²] 인간GHRH(1-29)NH ₂	81 ± 1	239 ± 55	3.54 ± 0.23	846
4	[D-Ala ² ,Ala ⁸ ,D-Tyr ¹⁰ ,Ala ¹⁵ ,D-Lys ²¹ ,Lys ²²] 인간GHRH(1-29)NH ₂	시험불 실시	0.05 ± 0.01	시험불 실시	시험불 실시
5	[D-Ala ² ,D-Tyr ¹⁰ ,D-Ala ¹⁵ ,Lys ²²] 인간GHRH(1-29)NH ₂	74 ± 7	939 ± 249	3.21 ± 0.31	3014

*:시간 0에서 초기 내용물의 % ; R1:hGHRH 수용체를 표현하는 BHK 세포들에서 hGHRH(1-29)NH₂ 와 비교한 화합물의 상대 결합 친화성 ±SEM ; R2:hGHRH(1-29)NH₂ 와 비교한 화합물의 실험상 단백질 분해에 대한 상대 저항 ±SEM.

다음 단계는 동일한 관찰들이 인간 혈청에서의 배양후에 유효한지 여부를 실험하는 것이었다. GHRH 유사체 #5에 대한 결과들은 표 11에서 볼 수 있다. 다시, 인간 혈청에서의 60분 또는 180분 직후에, GHRH 유사체 #5는 여전히 자연적 H(1-29)NH₂ 와 비교할 때, 현저하게 더 높은 실험상의 효능지수를 보여주었다.

표 11.
인간 혈청에서의 60분 또는 180분 배양 후의 GHRH 유사체 #5의 실험상의 효능지수.

R1	R2 (60분)	실험상 효능지수 (R1×R2) (60분)	잔류 펩티드농도 (180분)*	R2 (180분)	실험상 효능지수 (R1×R2) (180분)
939±249	1.55±0.04	1455	62±2	2.93±0.87	2751

*:시간 0에서 초기 내용물의 % ; R1:hGHRH 수용체를 표현하는 BHK 세포들에서 hGHRH(1-29)NH₂ 와 비교한 화합물의 상대 결합 친화성 ±SEM ; R2:hGHRH(1-29)NH₂ 와 비교한 화합물의 실험상 단백질 분해에 대한 상대 저항 ±SEM.

실시예 7

생체내 GH 방출의 특정 자극에 대한 GHRH 유사체의 이용

본 발명은 생체내 GH 방출의 특정 자극에 대한 GHRH 유사체의 이용을 목적으로 한다. 그러한 이용은 다음과 같은 배경 기술에 기초를 두고 있다.

GH 합성 및 분비에 영향을 미치는 모든 요인들의 결집은 펄스형태의 방출 패턴이라는 결과를 가져오며, 따라서 혈장 GH 수치라는 하나의 측정은 해석하기 어렵다. 혈액에서의 GH 기저농도는 매우 낮다. 어린이 및 젊은 성인들에서, 성장호르몬

방출의 가장 격렬한 주기는 숙면 착수 직후이다. GH 분비 패턴은 발작적이고, 하루에 6에서 8개의 펄스들이며 펄스 사이에서는 매우 낮은 수치이고 수면 사이클의 제 3 및 4 단계와 관련이 있으나, 이러한 연관성은 연령이 증가함에 따라 덜 명백해진다. 이러한 펄스들의 일부는 식사, 스트레스, 운동, 또는 느린파(서파) 수면과 관련이 있다.

더 소수의 GH 펄스를 갖지만 더 높은 진폭을 갖는 남성들보다 여성들에게 있어서는, GH 펄스들은 더 빈번하게 발생하고 혈장 GH의 기저 수치는 더 높다. 인간에게 있어서, 주야 24시간의 기간 중에 전형적으로 하나의 높은 분비 펄스 및 소수의 낮은 분비 펄스들이 있다. 수면위상의 지연, 선행 또는 방해는 상응하여 주(main) GH 분비 펄스를 이동시킬 것이다. 적어도 인간에 있어서는, GH 분비는 또한 내인성 하루주기 리듬에 의해 제어된다. 수면 주기가 정상적인 시간에서 이동될 때, 일부 GH는 내인성 시계에 따라 분비는 이른 밤 동안에 분비된다. GH 분비는 성장기 및 성인기 초기에 가장 높다. 인간에게 있어서, 분비율은 30대 동안에 감소하기 시작한다. 나이를 먹으면서 주간 분비 펄스들이 먼저 감소하기 시작하고, 반면에 수면-관련 GH 펄스는 지속한다.

동물에 있어서는, 많은 동물 종들이 전형적으로 주야 24시간 기간동안에 가변적인 길이를 갖는 여러 개의 수면 위상들을 가지기 때문에 GH 분비와 수면 사이의 상관 관계를 찾는 것은 더 어렵다. 그러나, 수면 중 상승된 GH 수치들은 여러 포유류에서 입증되어 왔다(판 카우터, 이.(Van Cauter, E.) 등. 수면, 1998,21:553-566 에 의해 검토됨). 신경과학에서 동물 모델로 광범위하게 이용되는 박쥐에 있어서, GH 분비는 약 3.3 시간 사이클의 펄스형태이다. 이 리듬은 동일한 사이클 길이를 가진 하루이내의 수면-기상 리듬과 관련되고, 그리하여 GH 펄스들은 약 24분 최대 수면보다 선행한다(미쯔기, 엔.(Mitsugi,N.) 및 키무라, 에프.(Kimura, F.) 정신신경내분비학, 1985,41:125-130). 명위상(light phase) 동안 단주기(3 시간)의 전면적인 수면방해는 박쥐에게 있어서 수면방해 동안 GH 분비 감소라는 결과를 가져왔다(키무라, 에프.(Kimura,F.) 및 차이, 썸.-더블유(Tsai,C.-W) 생리학 저널(런던), 1984,353:305-315).

GHRH 유사체들의 그러한 이용을 평가하기 위하여, 다음 실험들이 행해졌다. 더욱 특별하게는, 그 목적이, 14일의 관찰 기간 뒤에 스프라그-도리(Sprague-Dawley) 쥐들 암컷에게 피하 또는 정맥내 투여를 1회 했을 때의 약역학 및 약동학적 프로파일 및 GHRH 유사체 #5의 급성 중독, 그리고 GHRH 유사체가 적어도 2일의 약효세척기간을 가지고 동일한 개에게 투여량을 증가하면서 피하투여되었을 때의 약역학적 프로파일을 평가하는 것이었다. 상기 GHRH 유사체는 자연적으로 발생하는 인간 성장 호르몬 방출 호르몬(GHRH)의 아미노-말단 부분과 대응하는 2, 10, 15 및 22 위치에서 4개의 아미노산 치환을 가진 아미드화 합성 29-아미노산 펩티드의 합성 아세트염의 변형이다.

실험 결과

i. 쥐에 대한 시험

각각의 샘플은 눈을 가린 채로 두번 테스트 되었으며 결과는 두개의 수학적인 평균을 의미한다. 혈장과 샘플의 출처는 분석자에게 알려지지 않았다.

쥐 GH에 대한 쥐 혈장 시험의 결과는 아래의 표 12에 표현되었다. 표 12의 각각의 값은 두 동물의 수학적인 평균을 의미한다. 피하 투여에 대해 도 1에서 그리고 정맥내 투여에 대해 도2에서 같은 데이터가 시간에 대하여 도시되었다.

다른 시간 동안 성장 호르몬의 커브 아래 면적(AUC)은 표 13에서 표현되었다.

데이터는 GHRH 유사체 #5의 피하 투여와 정맥내 투여 모두 말초의 피 안으로 GH 분비라는 1회 복용량에 의존하는 반응을 끌어내었음을 보여준다. GH 수준에 있어 동물안에서 중요한 변화가 관찰되었다. 이것은 다른 사람들의 관찰 결과를 확증하여준다.

대부분의 동물들은 순환하는 성장 호르몬의 높은 사전-투여 농도를 보였다. GH 농도는 GHRH 또는 NaCl 주입 후 약 300분(5시간)이 지나서 다시 상승하는 경향이 있었다.

표 12.
어른 암컷 쥐들에 있어서 GHRH 유사체 #5 투여에 반응하는 쥐 성장 호르몬 분비의 크기.

GHRH mg/kg BW 루트	혈장 쥐 성장 호르몬(ng/ml)								
	GHRH 투여 후 시간(분)								
	-120	4	10	15	30	45	60	120	300
NaCl	6.55	ND	ND	10.15	4.85	ND	8.55	14.65	32.79
0.001 SC	20.15	ND	ND	36.7	14.2	ND	26.85	17.8	21.85
0.01 SC	20.4	ND	ND	190.4	31.9	ND	8.5	7.6	11.95
0.03 SC	36.1	ND	ND	240.9	39.05	ND	9.5	4.6	11.25
0.1 SC	20.4	ND	ND	252.4	43.8	ND	7.65	4.45	18.7
0.3 SC	20.7	ND	ND	247.9	133.5	ND	16.75	4.00	21.8
1.00 SC	88.95	ND	ND	270.0	155.85	ND	24.35	15.85	28.85
3.00 SC	20.05	ND	ND	453.0	181.55	ND	59.4	4.45	47.9
0.001 IV	23.85	26.2	25.85	34.65	ND	21.15	ND	ND	67.15
0.03 IV	43.15	68.45	254.65	75.1	ND	33.4	ND	ND	38.75
3.0 IV	48.6	38.7	36.95	83.65	ND	41.6	ND	ND	56.7
GHRH (1-44)									

0.03 IV								
---------	--	--	--	--	--	--	--	--

BW : 체중; ND : 측정 안됨.

표 12에서 보여지는바와 같이, 쥐 성장 호르몬 (ng/mL)은 두번 측정 되었다. 값은 각 시간점에서 두 동물들의 평균을 의미한다. 루트는 피하(SC)나 정맥내(IV)인 투여 루트를 의미한다.

표 13.
GH의 커브 아래 면적(AUC)에 의하여 결정된, GHRH 유사체 #5 투여에 반응하는 어른 암놈 쥐들에 있어서 누적적인 쥐 성장 호르몬 분비의 크기

GHRH mg/kg BW SC 루트	GH AUC		GHRH mg/kg BW SC 루트	GH AUC	
	120분	300분		45분	300분
NaCl SC	1165	5434	0.001 IV	1197	12280
0.001 SC	2914	6482	0.03 IV	3407	12060
0.01 SC	5153	6913	3.0 IV	2384	14299
0.03 SC	6192	7618	GHRH (1-44) 0.03 IV	1380	5754
0.1 SC	6423	8507			
0.3 SC	8636	10958			
1.0 SC	10425	14448			
3.0 SC	15562	20273			

BW : 체중.

표 13에서 보여지는바와 같이, 루트는 피하(SC)나 정맥내(IV)인 투여 루트를 의미한다. GH AUC는 GHRH 주입 후 45, 120, 또는 300분에 측정되었다.

i. 개에 대한 시험

각각의 샘플은 눈을 가린 채로 두번 테스트 되었으며 결과는 두개의 수학적인 평균을 의미한다. 혈장과 샘플의 출처는 분석자에게 알려지지 않았다.

개 GH에 대한 개 혈장 시험의 결과는 아래의 표 14에 표현되었다. 피하 투여에 대한 도 3에서, 같은 데이터가 시간에 대하여 도시되었으며 약역학적 커브가 표현되었다.

데이터는 GHRH 유사체 #5의 피하 투여가 말초의 피 안으로 GH 분비라는 1회 복용량에 의존하는 반응을 이끌어내었음을 보여준다.

GH 농도는 주입된 1회 복용량에 의존하여 GHRH 또는 NaCl 주입 후 30 또는 50 분에 다시 상승하는 경향이 있었다.

쥐와 개의 체내로 GHRH 유사체를 투여함에 따르는 치료와 관련된 어떤 임상 신호도 관찰되지 않았다.

표 14.
생후 8개월 된 비글 개에 있어서, GHRH 유사체 #5 투여에 반응하는 여러 시간점에서의 개 성장 호르몬 분비의 크기.

GHRH mg/kg BW 루트	개 성장 호르몬(ng/ml)						
	GHRH 투여 후 시간 (분)						
	0	7	15	22	30	45	60
NaCl SC	3	1.99	1.99	1.99	5	1.99	1.99
0.01 SC	1.99	1.99	5	4	11	17	11
0.1 SC	1.99	5	9	7	6	5	1.99
1 SC	1.99	4	14	9	19	7	7
hGHRH (1-44) 0.01 SC	5	1	1.99	4	5	3	1.99

데이터 분석

상기의 데이터는 합성된 GHRH 유사체 #5가 쥐와 개 뇌하수체 안에서 GHRH 수용체를 인지하고, GH 반응과 순환계 안으로 분비를 촉발한다는 것을 명확하게 증명하여 준다. 쥐에 있어서 반응은 피크 크기의 높이와 피크 기간 동안의 AUC의 견지에서 1회 복용량에 의존한다. 1회의 피하 주사에 따르는 피크 분비는 10-15분에 있으며 정맥내 주사에 따르는 피크

분비는 4-10분에 있다. GHRH 유사체 #5에 반응하는 GH 분비는 자연의 hGHRH(1-44)에 반응하는 GH 분비보다 펄스 크기와 AUC 양자에 있어 두배 더 크다. 가장 높은 GHRH 유사체 #5 1회 IV 투여는 일시적인 스토마토그래피 디센시티제이션(desensitization)을 일으킨다.

쥐와 같이, 개에 있어서, GHRH 유사체 #5에 반응한 GH 분비는 1회 복용량에 의존한다. 피크 분비는 1회 피하 주사에 따르는 피크 분비는 5 내지 15분 사이에 존재하며, 개 혈장에서 유사체의 장기적인 안정성을 가리키는 염 또는 네거티브 GHRH와의 반응에서 관찰되지 않은 두번째 GH 피크가 존재한다. GHRH 유사체 #5에 반응한 GH는 자연의 hGHRH(1-44)NH₂ 에 반응하는 GH 분비보다 훨씬 크다(AUC는 측정되지 않음).

결론

생체내에서의 개념의 증명이 입증되었다. Ala2, Tyr10, Gly15, 그리고 Leu22가 D-Ala2, D-Tyr10, D-Ala15, 그리고 Lys22에 의하여 치환된 H-Tyr D-Ala2 Asp Als Ile Phe Thr Asn Ser D-Tyr10 Arg Lys Val Leu D-Ala15 Gln Leu Ser Ala Arg Lys Lys22 Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg-NH₂ 아미노산 서열의 GHRH(1-29)NH₂ 합성 유사체는 쥐와 개의 뇌하수체안에서 스토마토그래피상의 GHRH 수용체와 결합하고, 1회 복용량에 의존하는 방식으로 분비와 성장 호르몬의 방출을 자극한다.

GHRH 유사체 #5는 생체내에서 자연의 44 아미노산 GHRH보다 적어도 두배 더 효능이 있다.

산업상 이용 가능성

본 발명에 따른 GHRH 유사체, 기능적 유도체, 그리고 그 염은 활성이 오래 지속되고, 쉽게 분해되지 않으므로 모든 포유류의 GH 분비를 증가시킬 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

식 X :

Tyr-A2-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-A8-A9-A10-Arg-Lys-Val-Leu-A15-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-A21-A22-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-A30-NH₂ , 여기서

A2 는 Ala 또는 D-Ala ;

A8 은 Asn, D-Asn 또는 Ala ;

A9 는 Ser 또는 Ala ;

A10 은 Tyr 또는 D-Tyr ;

A15 는 Gly, Ala 또는 D-Ala ;

A21 는 Lys 또는 D-Lys ;

A22 는 Leu, D-Leu, Lys 또는 Ala ; 그리고

A30 은 결합 또는 1에서 15까지의 어떤 아미노산 서열의 잔기 ;

를 포함하는 GHRH 유사체, 상기 유사체의 기능적 유도체, 또는 그의 약제학적으로 수용가능한 염;

실질적으로 자연상 발생의 GHRH의 시험관 효능지수보다 실질적으로 높은 시험관 효능지수를 갖는 상기 GHRH 유사체, 상기 유사체의 기능적 유도체, 또는 그의 염.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 유사체는

- A2 는 D-Ala, A8은 Ala, A15는 Ala, A22는 Lys; A9, A10, A21 그리고 A30은 제 1항에서 정의됨;

- A2 는 D-Ala, A10은 D-Tyr, 그리고 A22는 Lys; A8, A9, A15, A21 그리고 A30은 제 1항에서 정의됨; 및

- A2 는 D-Ala, A10은 D-Tyr, A15는 D-Ala, 그리고 A22는 Lys; A8, A9, A21 그리고 A30은 제 1항에서 정의됨; 으
로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 GHRH 유사체, 유사체의 기능적 유도체, 또는 그 염.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 유사체는

A2는 D-Ala, A8은 Ala, A15는 Ala, A22는 Lys; A9, A10, A21 그리고 A30은 제 1항에서 정의된 것과 같음: 으
로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 GHRH 유사체, 기능적 유도체, 또는 그 염.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 유사체는

A2 는 D-Ala, A10은 D-Tyr, 그리고 A22는 Lys; A8, A9, A15, A21 그리고 A30은 제 1항에서 정의된 것과 같음: 으
로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 GHRH 유사체, 기능적 유도체, 또는 그 염.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 유사체는

A2 는 D-Ala, A10은 D-Tyr, A15는 D-Ala, 그리고 A22는 Lys; A8, A9, A21 그리고 A30은 제 1항에서 정의된 것과
같음: 으 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 GHRH 유사체, 기능적 유도체, 또는 그 염.

청구항 6.

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서,

시험관 효능지수는 자연상 발생의 GHRH의 시험관 효능지수보다 적어도 500배 높은 GHRH 유사체.

청구항 7.

제 6항에 있어서,

시험관 효능지수는 자연상 발생의 GHRH의 시험관 효능지수보다 적어도 1500배 높은 GHRH 유사체.

청구항 8.

제 7항에 있어서,

시험관 효능지수는 자연상 발생의 GHRH의 시험관 효능지수보다 적어도 2500배 높은 GHRH 유사체.

청구항 9.

- 제 1항 내지 제 8항중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 GHRH 유사체, 상기 유사체의 기능적 유도체 또는 그의 약제학적
으로 수용가능한 염의 약제학적으로 유효한 량; 그리고

- 약제학적으로 수용가능한 운반체;

를 포함하여 구성되는 약제학적 조성.

청구항 10.

제 1 항 내지 제 8 항중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 GHRH 유사체, 상기 유사체의 기능적 유도체 또는 그의 약제학적으로 수용가능한 염, 또는 제 9 항에 정의된 바와 같은 약제학적 조성의 유효량의 생체내에서의 GH 방출 특정 자극을 위한 용도.

청구항 11.

제 1 항 내지 제 8 항중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 GHRH 유사체, 상기 유사체의 기능적 유도체 또는 그의 약제학적으로 수용가능한 염, 또는 제 9 항에 정의된 바와 같은 약제학적 조성의 유효량의 GH 결핍-관련 상태의 치료제로 이용되는 제약의 조제를 위한 용도.

청구항 12.

제 11항에 있어서, 상기 상태는,

시상하부 뇌하수체 난장이증, 화상, 골다공증, 콩팥 장애, 비접합 뼈 골절, 급/만성 쇠약 질병 또는 감염, 상처치료, 수술후 문제, 수유 실패, 여성불임, 암환자의 악액질, 동화 및/또는 이화 문제, T-세포 면역결핍, 신경퇴화상태, GHRH 수용체의 존성 종양, 노화, 수면 장애, 사코페니아(sacorpenia) 환자, 쇠약한 노인, HIV 환자 그리고 화학요법 또는 방사능요법에 관련된 부작용을 보이는 암환자에 있어서 근육소모질병:으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 13.

제 12항에 있어서, 상기 근육소모질병은,

사코페니아(sacorpenia), 노인 쇠약, HIV 그리고 암:으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 14.

포유류에 제 1 항 내지 제 8 항중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 GHRH 유사체, 상기 유사체의 기능적 유도체 또는 그의 약제학적 수용가능한 염, 또는 제 9 항에 정의된 바와 같은 약제학적 조성의 유효량을 투여하는 단계를 포함하여 구성되는 포유류에서 GHRH 유도 생물학적 활성을 개시하는 방법.

청구항 15.

제 14항에 있어서, 상기한 GHRH 유도 생물학적 활성은 수면 장애 조절, 음식 섭취 장애 조절 그리고 단백질 합성 증가로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 15항에 있어서, 상기한 단백질 합성 증가는 근육 질량 증가 또는 젖 생산 증가의 결과를 가져오는 것을 특징으로 하는 방법.

요약

본 발명은 성장 호르몬-방출 호르몬(GHRH) 유사체들과 관련이 있다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 29 아미노산 등의 합성 GHRH 유사체들과 관련이 있으며, 이것들은 인간의 고유 GHRH(1-29)NH₂ 와 비교하여, 실험상의 연구에 있어서 단백질 분해에 대한 증가된 저항 및 인간 GHRH 수용체에 대한 높은 결합 친화성을 동시에 보여준다. 본 발명은 또한 상기 GHRH 유사체들 중 임의의 하나라도 포함하는 약제학적 조성과 관련이 있으며, 그리고 GH 결핍과 관련된 상태의 치료에서 약물 표본 뿐만 아니라 실험상의 GH 방출의 특정 자극에 대한 이러한 유사체들의 이용과 관련이 있다. 본 발명은 또한 포유류에 있어서 GHRH-유도 생물학적 반응을 진작시키는 방법을 제공한다.

대표도

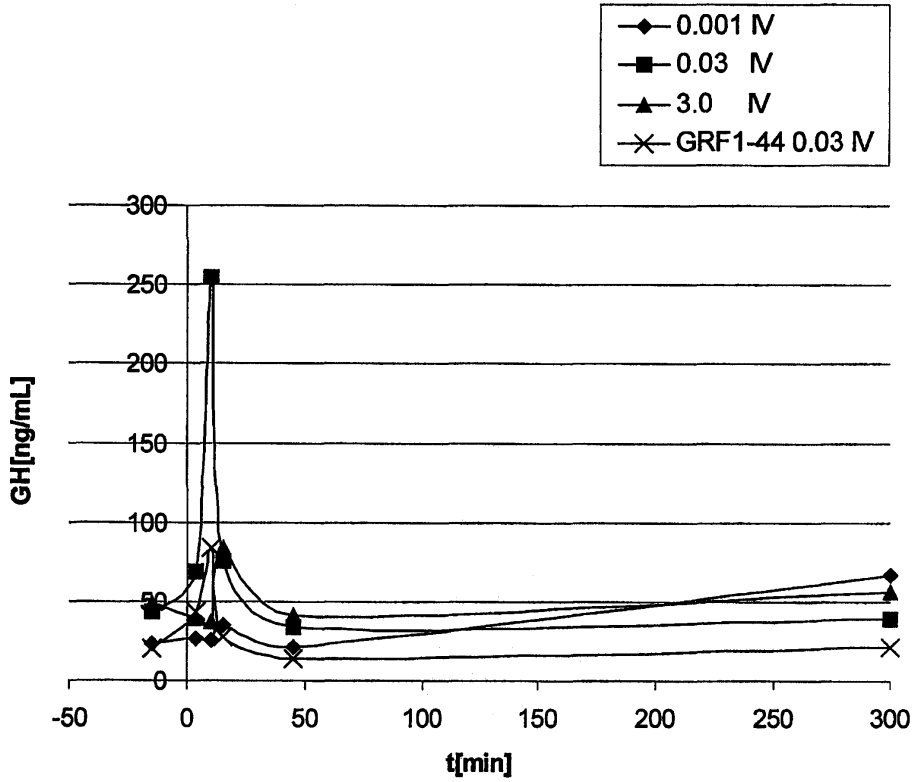
도 1

색인어

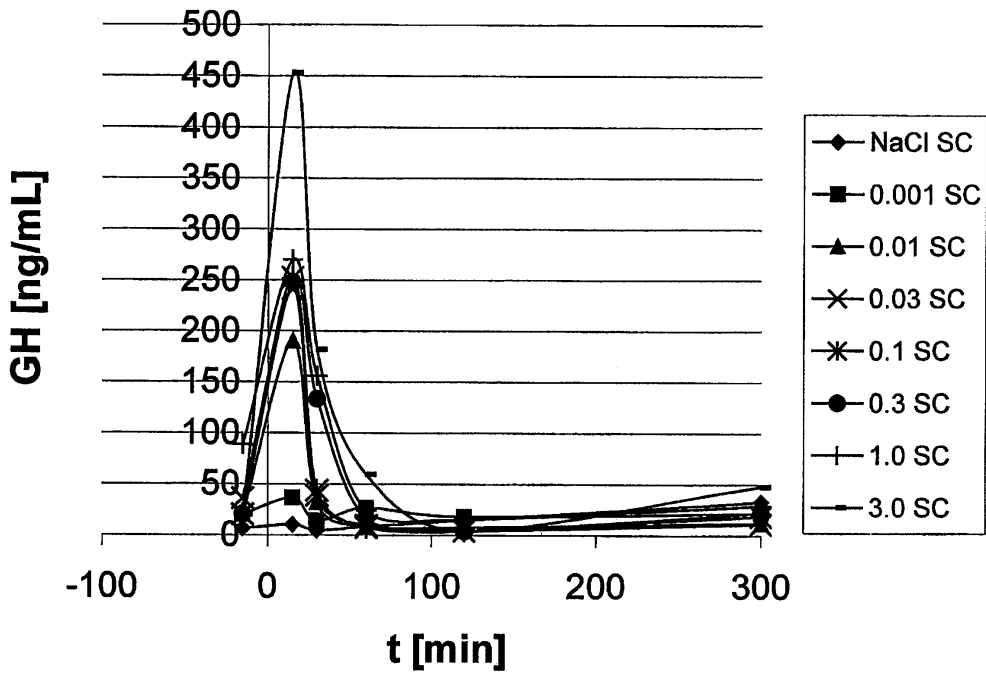
GH, GHRH, 성장호르몬, 뇌하수체,

도면

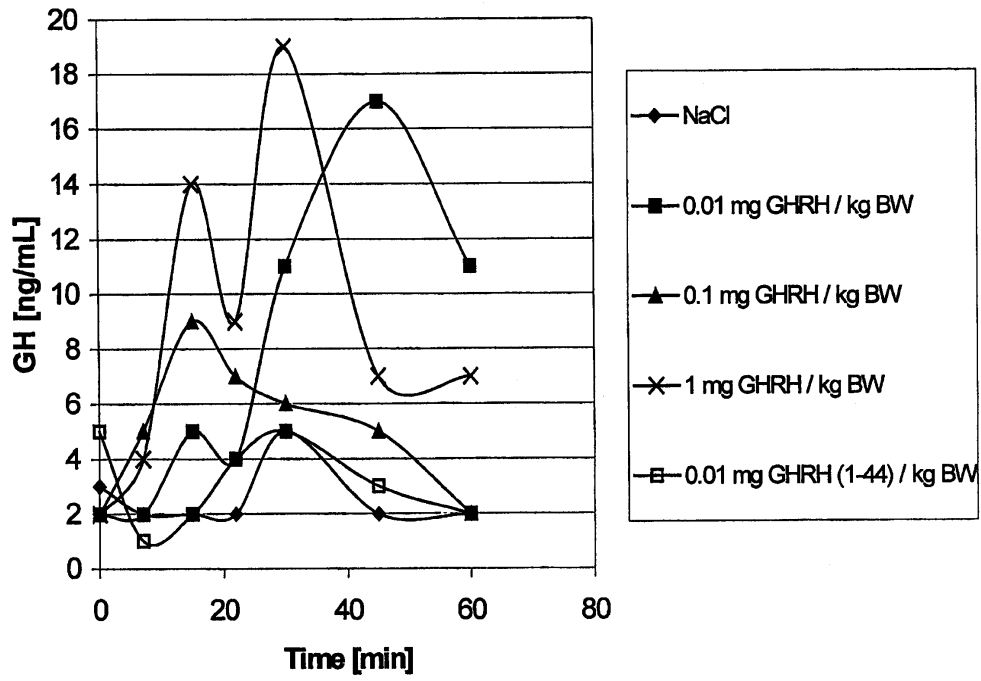
도면1



도면2



도면3



서열목록제출서에 첨부하여 제출