(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104853778 A
(43)申请公布日 2015.08.19

(21)申请号 201380066625.1
(22)申请日 2013.10.23
(30)优先权数据
2012-234300 2012.10.24 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.06.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2013/078743 2013.10.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/065341 JA 2014.05.01
(71)申请人 第一三共株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 松尾刚 村山宣人 古谷真优美
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 温宏艳 彭昶
(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
A61K 38/04(2006.01)
A61P 21/02(2006.01)
C07K 14/46(2006.01)

权利要求书3页 说明书21页
序列表2页

(54)发明名称

用于肌萎缩性侧索硬化的治疗剂

(57)摘要

本发明解决了提供用于治疗肌萎缩性侧索硬化(一种当前不存在有效治疗剂的疾病)的药物的问题,并提供了肌萎缩性侧索硬化的治疗剂,其含有生长激素促分泌素受体(GHS-R)激动剂或其药学上可接受的盐。肌萎缩性侧索硬化的治疗剂含有GHS-R激动剂如葛瑞林并且用于施用给患有肌萎缩性侧索硬化和不表现出严重吞咽困难的个体。所述个体可以是对ALS现有治疗剂无应答或不充分应答的个体。

CN 104853778 A

1. 用于施用给具有肌萎缩性侧索硬化和不严重吞咽困难的个体的、肌萎缩性侧索硬化的治疗剂，其包含生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐作为活性成分。

2. 根据权利要求 1 所述的治疗剂，其中所述个体对肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂也无应答或不充分应答。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的治疗剂，其中所述治疗剂与肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂联合使用。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的治疗剂，其中所述肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂是利鲁唑。

5. 根据权利要求 1-4 中的任一项所述的治疗剂，其中通过皮下注射来施用所述包含生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐作为活性成分的肌萎缩性侧索硬化治疗剂。

6. 根据权利要求 1-5 中的任一项所述的治疗剂，其中所述生长激素促分泌素受体激动剂是葛瑞林、普拉莫瑞林、GHRP-6、海沙瑞林、伊莫瑞林、甲磺酸伊布莫仑、ulimorelin、阿那瑞林、马昔瑞林、卡普瑞林或 SM-130686。

7. 根据权利要求 6 所述的治疗剂，其中所述葛瑞林是 :包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，或包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其具有在 SEQ ID NO: 1 的氨基端的位置 5-28 处的一个或几个氨基酸残基的缺失、置换和 / 或添加，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，且所述葛瑞林具有通过结合生长激素促分泌素受体而升高细胞内钙离子浓度的活性。

8. 根据权利要求 7 所述的治疗剂，其中所述葛瑞林是包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链的羟基处的脂肪酸。

9. 根据权利要求 8 所述的治疗剂，其中所述葛瑞林是包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基的侧链中的羟基被正辛酰基酰化。

10. 一种用于治疗肌萎缩性侧索硬化的方法，所述方法包括 :给具有肌萎缩性侧索硬化和不严重吞咽困难的个体施用肌萎缩性侧索硬化治疗剂，所述治疗剂包含生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐作为活性成分。

11. 根据权利要求 10 所述的治疗方法，其中所述个体对肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂也无应答或不充分应答。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的治疗方法，其中所述治疗剂与肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂联合施用。

13. 根据权利要求 11 或 12 所述的治疗方法，其中所述肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂是利鲁唑。

14. 根据权利要求 10-13 中的任一项所述的治疗方法，其中通过皮下注射来施用所述包含生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐作为活性成分的肌萎缩性侧索硬化治疗剂。

15. 根据权利要求 10-14 中的任一项所述的治疗方法，其中所述生长激素促分泌

素受体激动剂是葛瑞林、普拉莫瑞林、GHRP-6、海沙瑞林、伊莫瑞林、甲磺酸伊布莫仑、ulimorelin、阿那瑞林、马昔瑞林、卡普瑞林或 SM-130686。

16. 根据权利要求 15 所述的治疗方法，其中所述葛瑞林是：包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，或包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其具有在 SEQ ID NO: 1 的氨基端的位置 5-28 处的一个或几个氨基酸残基的缺失、置换和 / 或添加，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，且所述葛瑞林具有通过结合生长激素促分泌素受体而升高细胞内钙离子浓度的活性。

17. 根据权利要求 16 所述的治疗方法，其中所述葛瑞林是包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链的羟基处的脂肪酸。

18. 根据权利要求 17 所述的治疗方法，其中所述葛瑞林是包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基的侧链中的羟基被正辛酰基酰化。

19. 通过施用给具有肌萎缩性侧索硬化和不严重吞咽困难的个体而治疗肌萎缩性侧索硬化的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐。

20. 根据权利要求 19 所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述个体对肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂也无应答或不充分应答。

21. 根据权利要求 19 或 20 所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中在所述治疗中，所述生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐与肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂联合使用。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂是利鲁唑。

23. 根据权利要求 19-22 中的任一项所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐向所述个体的施用是呈皮下注射形式的施用。

24. 根据权利要求 19-23 中的任一项所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述生长激素促分泌素受体激动剂是葛瑞林、普拉莫瑞林、GHRP-6、海沙瑞林、伊莫瑞林、甲磺酸伊布莫仑、ulimorelin、阿那瑞林、马昔瑞林、卡普瑞林或 SM-130686。

25. 根据权利要求 24 所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述葛瑞林是：包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，或包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其具有在 SEQ ID NO: 1 的氨基端的位置 5-28 处的一个或几个氨基酸残基的缺失、置换和 / 或添加，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，且所述葛瑞林具有通过结合生长激素促分泌素受体而升高细胞内钙离子浓度的活性。

26. 根据权利要求 25 所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述葛瑞林是：包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨

基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链的羟基处的脂肪酸。

27. 根据权利要求 26 所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述葛瑞林是：包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基的侧链中的羟基被正辛酰基酰化。

用于肌萎缩性侧索硬化的治疗剂

技术领域

[0001] 本发明涉及用于肌萎缩性侧索硬化的治疗剂，其包含生长激素促分泌素受体激动剂作为活性成分。

背景技术

[0002] 肌萎缩性侧索硬化（在下文中，被称作 ALS），即成年人的最常见运动神经元病，是涉及上运动神经元和下运动神经元的选择性和系统性死亡的神经变性疾病。作为运动神经元死亡的结果，发生上肢和下肢的肌萎缩和肌无力，而在大多数情况下，所述疾病的进展也涉及延髓性麻痹症状诸如言语或吞咽困难和呼吸肌麻痹。ALS 主要发生在中年人或老年人中。该疾病如此严重，以致于许多患者在发病以后 2-3 年内死于呼吸衰竭，除非使用呼吸机进行呼吸管理。尽管存在肌肉（包括呼吸肌）的系统性萎缩和无力，但高阶功能诸如智力和感觉得到维持（非专利文献 1）。

[0003] Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (SOD1) 基因被视作 ALS 的成因基因之一。在携带从 ALS 患者分离的突变体 SOD1 基因的转基因小鼠或大鼠中，已经发现，运动神经元在成熟以后选择性地死亡且骨骼肌萎缩或肌无力发生，从而导致死亡，如在人 ALS 的病理学中的那样。这些携带突变体 SOD1 基因的转基因小鼠或大鼠已经被确认为 ALS 动物模型并常规地用在 ALS 的病理学分析或该疾病的治疗剂的搜索中。具体地，使用表达通过用 Ala (A) 置换 93- 位处的 Gly (G) 而从人 SOD1 衍生出的突变蛋白的转基因小鼠（即，携带突变体 SOD1 基因 (G93A) 的转基因小鼠（在下文中，被称作 $SOD1^{G93A}$ 小鼠））的研究已经成为最先进的，并且欧洲 ALS/MND 组推荐使用这些动物的评价（非专利文献 2）。

[0004] 目前全世界被批准用于 ALS 的唯一治疗剂是利鲁唑。该药物拮抗谷氨酸盐毒性，该毒性据报道是 ALS 发病的引起因素之一。但是，该药物会产生仅几个月的生命延长作用，且因而仅仅在有限程度上是有效的（非专利文献 1）。

[0005] 葛瑞林是被发现为生长激素促分泌素受体（在下文中，被称作 GHS-R) 的内源性配体的肽激素（非专利文献 3）。葛瑞林会促进人类和动物中的生长激素（在下文中，被称作 GH) 分泌（非专利文献 4, 等）。

[0006] 已知 GH 会促进肝脏和骨骼肌中的胰岛素 - 样生长因子 -1 （在下文中，被称作 IGF-1) 产生，而 IGF-1 已知是运动神经元的营养因子。将含有 IGF-1 基因的重组 AAV4 病毒载体注射进 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的侧脑室中，会显著延长它们的存活期并显著抑制运动功能和肌肉强度的下降（专利文献 1）。尽管该报道表明这样的效应通过 IGF-1 在脑中的强迫表达而实现，但是人 IGF-1 在 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的骨骼肌中的过表达对运动神经元死亡或存活期没有影响（非专利文献 5）。当在临床试验中将 GH 或 IGF-1 施用给 ALS 患者时，GH 治疗是无效的（非专利文献 6），且 IGF-1 对 ALS 患者的肌肉强度、功能结果和存活期中的任一种没有表现出效力（非专利文献 7）。因而，周围 GH 或 IGF-1 系统的活化对于 ALS 而言是无效的。葛瑞林也会促进从脑下垂体分泌 GH 和增加血液中的 GH 浓度（例如，非专利文献 3 和 4），但是不知道具有增加脑或脊髓中的 IGF-1 的作用。因此，不确定葛瑞林是否对于 ALS 的病理学而

言是有效的。

[0007] 并且，葛瑞林是唯一已知的周围促进食欲肽，据报道其会增加人类和动物中的食物摄入（例如，非专利文献 4）。ALS 是涉及由运动神经元死亡引起的骨骼肌萎缩和肌肉强度减小的疾病，从而导致死亡。葛瑞林的施用可以增加食物摄入并由此维持体重或骨骼肌质量。但是，葛瑞林的这种作用和运动神经元死亡的抑制之间的关联是未知的。因此，不确定葛瑞林是否对于 ALS 的病理学而言是有效的。

[0008] 在 ALS 患者中，具有高血液 LDL/HDL 比率并表现出高脂血症的患者已经被报道会表现出比其它 ALS 患者长至少 12 个月的存活期，从而指示高脂血症是 ALS 患者的存活的预后因素（非专利文献 8）。同样地，具有高血液胆固醇或甘油三酯浓度的 ALS 患者已经被报道具有良好的预后（非专利文献 9）。

[0009] 根据一篇报道，葛瑞林向小鼠的施用对它们的血液甘油三酯浓度没有影响，但是会增加血液总胆固醇浓度（非专利文献 10）。根据另一篇报道，葛瑞林可用于治疗高脂血症（专利文献 2）。

[0010] 并且，给具有慢性呼吸炎症的患者重复施用葛瑞林 3- 周，会改善他们的体重或营养状态，但是对血液胆固醇浓度没有影响（非专利文献 11）。

[0011] 如上所述，关于葛瑞林对血液胆固醇或甘油三酯的影响，尚未得到明确的发现。

[0012] 据报道，当通过离子霉素治疗胎儿大鼠海马神经元来升高细胞内钙 (Ca) 水平从而诱导细胞死亡时，GHS-R 激动剂化合物大鼠葛瑞林、普拉莫瑞林（生长激素释放肽 -2（在下文中，被称作 GHRP-2））、海沙瑞林和 MK-0677 会表现出细胞死亡抑制作用。在该报道中，ALS 被称作所述化合物集合对其有效的非缺血性神经变性疾病（专利文献 3）。ALS 是涉及运动神经元的选择性死亡的成年发作疾病，其中海马细胞没有受到损伤。因此，即使 GHRP-2 或葛瑞林在体外抑制由 Ca 浓度的升高诱导的胎儿大鼠海马神经元死亡，也不确定这些化合物是否对 ALS 有效。

[0013] 已经报道葛瑞林会抑制体外大鼠器官型脊髓培养系统中由谷氨酸盐诱导的运动神经元死亡（非专利文献 12 和 13）。不幸的是，所述体外器官型脊髓培养系统可能不足以反映复杂疾病（诸如 ALS）的病理学。

[0014] 已经报道，与对照组相比，普拉莫瑞林 (GHRP-2) 会使比细胞大小大 1.5 倍的具有树突和轴突的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤衍生的 PC-12 细胞的比例增加大约 1.2 倍（专利文献 4）。由于所述细胞不是运动神经元，不可以判定 GHRP-2 是否可用于 ALS。

[0015] 根据关于 1,2- 二乙酰基苯的施用诱导的近侧轴突病变的小鼠模型的报道，GHS-R 激动剂生长激素释放肽 -6（在下文中，被称作 GHRP-6）和细胞生长因子 EGF 的同时施用会在行为方面改善小鼠的行走能力，并且也显著地改善骨骼肌的动作电位，尽管单独每种化合物的施用仅仅加速改变的步态型式的恢复（非专利文献 14）。由于在该实验中使用的动物模型具有与 ALS 相比不同的临床病理学，不可以判定 GHRP-6 是否可用于或不可用于 ALS。

[0016] 其它报道公开称，葛瑞林受体 GHS-R 拮抗剂可用于治疗 ALS （专利文献 5 和 6）。因而，不可假定 GHS-R 激动剂（包括葛瑞林）可用于治疗 ALS。

[0017] 引文列表

专利文献

专利文献 1：WO2007/146046

专利文献 2：日本专利特开号 2008-127377

专利文献 3：WO01/047558

专利文献 4：日本专利特开号 2005-239712

专利文献 5：US7829589

专利文献 6：US2012/0080747

非专利文献

非专利文献 1：Expert Opinion on Emerging Drugs (2011)，第 16 卷（第 2 期），第 537-558 页

非专利文献 2：Amyotrophic Lateral Sclerosis (2010)，第 11 卷，第 38-45 页

非专利文献 3：Nature (1999)，第 402 卷，第 656-660 页

非专利文献 4：Physiological Reviews (2005)，第 85 卷，第 495-522 页

非专利文献 5：Experimental Neurology (2007)，第 207 卷，第 52-63 页

非专利文献 6：Muscle & Nerve (1993)，第 16 卷（第 6 期），第 624-633 页

非专利文献 7：Neurology (2008)，第 71 卷，第 1770-1775 页

非专利文献 8：Neurology (2008)，第 70 卷，第 1004-1009 页

非专利文献 9：Journal of Neurology (2011)，第 258 卷（第 4 期），第 613-617 页

非专利文献 10：Nature Neuroscience (2010)，第 13 卷（第 7 期），第 877-883 页

非专利文献 11：Pulmonary Pharmacology & Therapeutics (2008)，第 21 卷（第 5 期），第 774-779 页

非专利文献 12：Experimental Neurology (2011)，第 230 卷，第 114-122 页

非专利文献 13：Korean Journal of Physiology and Pharmacology (2012)，第 16 卷（第 1 期），第 43-48 页

非专利文献 14：Neurotoxicity Research (2011)，第 19 卷，第 195-209 页。

发明内容

[0018] 技术问题

利鲁唑(一种现有的用于 ALS 的治疗剂)在临床上在有限程度上是有效的。尽管自该药物首创以来已经过去了 15 年或更多年并且同时已经在临床上开发了多种化合物，用于 ALS 的新治疗剂仍然有待开发。因而，对 ALS 有效的治疗剂的开发，存在强烈的未得到满足的医学需求。本发明的一个目的是，提供用于不存在有效药物的 ALS 的治疗剂，所述治疗剂能够抑制 ALS 的病理学进展和有效地治疗该疾病。

[0019] 问题的解决方案

本发明的发明人已经对不存在完全（或充分）有效药物(特别是与唯一存在的药物利鲁唑相比能够更有效地治疗 ALS 的药物)的 ALS 的有用治疗剂进行了勤奋研究。所以，本发明的发明人通过以下发现已经完成了本发明：GHS-R 激动剂表现出比现有药物更有效的运动神经元保护作用。具体地，本发明包括下述方面：

(1) 用于施用给具有肌萎缩性侧索硬化和不严重吞咽困难的个体的、用于肌萎缩性侧索硬化的治疗剂，其包含生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐作为活性成分。

[0020] (2) 根据 (1) 所述的治疗剂，其中所述个体对肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂也无应答或不充分应答。

[0021] (3) 根据 (1) 或 (2) 所述的治疗剂，其中所述治疗剂与肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂联合使用。

[0022] (4) 根据 (2) 或 (3) 所述的治疗剂，其中所述肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂是利鲁唑。

[0023] (5) 根据 (1) 或 (2) 所述的治疗剂，其中所述治疗剂通过皮下注射来施用。

[0024] (6) 根据 (1) 至 (5) 中的任一项所述的治疗剂，其中所述生长激素促分泌素受体激动剂是葛瑞林、普拉莫瑞林、GHRP-6、海沙瑞林、伊莫瑞林、甲磺酸伊布莫仑、ulimorelin、阿那瑞林、马昔瑞林、卡普瑞林或 SM-130686。

[0025] (7) 根据 (6) 所述的治疗剂，其中所述葛瑞林是 :包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸 ;或包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其具有在 SEQ ID NO: 1 的氨基端的位置 5-28 处的一个或几个氨基酸残基的缺失、置换和 / 或添加，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，且所述葛瑞林具有通过结合生长激素促分泌素受体而升高细胞内钙离子浓度的活性。

[0026] (8) 根据 (7) 所述的治疗剂，其中所述葛瑞林是包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链的羟基处的脂肪酸。

[0027] (9) 根据 (8) 所述的治疗剂，其中所述葛瑞林是包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基的侧链中的羟基被正辛酰基酰化。

[0028] (10) 一种用于治疗肌萎缩性侧索硬化的方法，所述方法包括 :给具有肌萎缩性侧索硬化和不严重吞咽困难的个体施用肌萎缩性侧索硬化治疗剂，所述治疗剂包含生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐作为活性成分。

[0029] (11) 根据 (10) 所述的治疗方法，其中所述个体对肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂也无应答或不充分应答。

[0030] (12) 根据 (10) 或 (11) 所述的治疗方法，其中所述治疗剂与肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂联合施用。

[0031] (13) 根据 (11) 或 (12) 所述的治疗方法，其中所述肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂是利鲁唑。

[0032] (14) 根据 (10) 至 (13) 中的任一项所述的治疗方法，其中通过皮下注射来施用所述肌萎缩性侧索硬化治疗剂，所述治疗剂包含生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐作为活性成分。

[0033] (15) 根据 (10) 至 (14) 中的任一项所述的治疗方法，其中所述生长激素促分泌素受体激动剂是葛瑞林、普拉莫瑞林、GHRP-6、海沙瑞林、伊莫瑞林、甲磺酸伊布莫仑、ulimorelin、阿那瑞林、马昔瑞林、卡普瑞林或 SM-130686。

[0034] (16) 根据 (15) 所述的治疗方法，其中所述葛瑞林是 :包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第 3 个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残

基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，或包含SEQ ID NO：1的氨基酸序列的肽化合物，其具有在SEQ ID NO：1的氨基端的位置5-28处的一个或几个氨基酸残基的缺失、置换和/或添加，其中氨基端的第3个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，且所述葛瑞林具有通过结合生长激素促分泌素受体而升高细胞内钙离子浓度的活性。

[0035] (17)根据(16)所述的治疗方法，其中所述葛瑞林是包含SEQ ID NO：1的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第3个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链的羟基处的脂肪酸。

[0036] (18)根据(17)所述的治疗方法，其中所述葛瑞林是包含SEQ ID NO：1的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第3个氨基酸残基的侧链中的羟基被正辛酰基酰化。

[0037] (19)通过施用给具有肌萎缩性侧索硬化和不严重吞咽困难的个体而治疗肌萎缩性侧索硬化的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐。

[0038] (20)根据(19)所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述个体对肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂也无应答或不充分应答。

[0039] (21)根据(19)或(20)所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中在所述治疗中，所述生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐与肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂联合使用。

[0040] (22)根据(20)或(21)所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂是利鲁唑。

[0041] (23)根据(19)至(22)中的任一项所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐向所述个体的施用是呈皮下注射形式的施用。

[0042] (24)根据(19)至(23)中的任一项所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述生长激素促分泌素受体激动剂是葛瑞林、普拉莫瑞林、GHRP-6、海沙瑞林、伊莫瑞林、甲磺酸伊布莫仑、ulimorelin、阿那瑞林、马昔瑞林、卡普瑞林或SM-130686。

[0043] (25)根据(24)所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述葛瑞林是：包含SEQ ID NO：1的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第3个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，或包含SEQ ID NO：1的氨基酸序列的肽化合物，其具有在SEQ ID NO：1的氨基端的位置5-28处的一个或几个氨基酸残基的缺失、置换和/或添加，其中氨基端的第3个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链中的脂肪酸，且所述葛瑞林具有通过结合生长激素促分泌素受体而升高细胞内钙离子浓度的活性。

[0044] (26)根据(25)所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述葛瑞林是包含SEQ ID NO：1的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第3个氨基酸残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链的羟基处的脂肪酸。

[0045] (27)根据(26)所述的生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐，其中所述葛瑞林是包含SEQ ID NO：1的氨基酸序列的肽化合物，其中氨基端的第3个氨基酸

残基的侧链中的羟基被正辛酰基酰化。

[0046] 发明的有利效果

本发明的GHS-R激动剂具有通过抑制ALS的病理学进展而延长存活期的作用，且这样，在不存在有效药物的ALS的治疗中是非常有用的。此外，本发明的GHS-R激动剂是进一步有用的，因为它具有如下抑制肌无力的作用：抑制ALS的病理学发作和进展的特征性的运动神经元的数目的减少，并由此显著地抑制细胞的死亡。本发明的GHS-R激动剂在这些作用方面优于利鲁唑(ALS的现有治疗剂)，且满足了长期未得到满足的医学需求，因为所述GHS-R激动剂可以延长存活期，即使从利鲁唑不再有效时施用。此外，本发明的GHS-R激动剂具有运动神经元保护作用并抑制肌无力，不仅导致延长的存活期，而且导致在存活期中改善的生活质量。另外，因为该运动神经元保护作用，GHS-R激动剂对除了ALS以外的运动神经元疾病或障碍(例如，脊髓性肌萎缩)是有用的。

[0047] 实施方案的描述

本领域已知的肽或非肽化合物可以用作本发明的GHS-R激动剂。肽化合物的例子包括内源性配体葛瑞林以及普拉莫瑞林(GHRP-2)、GHRP-6、海沙瑞林和伊莫瑞林。非肽化合物的例子包括甲磺酸伊布莫仑(MK-0677)、ulimorelin (TZP-101)、阿那瑞林(RC-1291)、马昔瑞林(AEZS-130)、卡普瑞林(CP-424391)和SM-130686。在这些肽化合物中，葛瑞林是特别合乎需要的。在这些非肽化合物中，阿那瑞林是特别合乎需要的。

[0048] 葛瑞林的例子可以包括人衍生的葛瑞林和从任意其它动物(诸如大鼠、小鼠、猪和牛)衍生出的葛瑞林和它们的衍生物(参见例如，国际公开号WO01/07475)。当受体个体是人时，理想地使用人衍生的葛瑞林。人衍生的葛瑞林是由28个氨基酸组成的肽化合物(SEQ ID NO: 1)，其中从氨基端计起第3个氨基酸(丝氨酸)残基的侧链中的羟基被脂肪酸(正辛酰基)酰化。

[0049] 内源性配体葛瑞林是一种在体内存在的激素，且可以充当特别高度安全的ALS治疗剂，因为它在施用给人类中的安全性已经得到证实。

[0050] 具有以下特征的肽可以用作葛瑞林衍生物：其具有通过一个或几个选自从氨基端计起第5个至第28个氨基酸残基的氨基酸的缺失、置换和/或添加而从SEQ ID NO: 1表示的氨基酸序列衍生出的氨基酸序列，其中从氨基端计起第3个氨基酸(丝氨酸)残基是经修饰的氨基酸残基，该氨基酸残基具有引入在该氨基酸残基的侧链(羟基)中的脂肪酸，且具有通过结合GHS-R而升高细胞内钙离子浓度的活性(参见国际公开号WO01/07475)。

[0051] 在该背景下，本文中使用的术语“几个”是指1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、或1或2。

[0052] 理想地，葛瑞林衍生物的氨基酸序列与天然存在的氨基酸序列具有70%、优选80%、更优选90%、特别优选95%、最优选97%同源性。这适用于由27个氨基酸组成的人衍生的葛瑞林的剪接变体(SEQ ID NO: 2)。

[0053] 关于葛瑞林衍生物的活性，在以上公开中描述的针对GHS-R的激动活性或生物活性可以用作指标。基于该指标，可以选择目标葛瑞林衍生物。例如，可以用细胞内钙离子浓度作为指标，检查针对GHS-R的激动活性。通过使用本领域已知的方法，可以测量该指标，且，例如，可以使用FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices, LLC)，其基于由钙离子浓度的变化引起的Fluo-4 AM (Molecular Probes)的荧光强度的变化。并且，通过使用本领域已知的方法，可以证实具有钙浓度升高活性的肽或非肽化合物的

体内促进食欲活性。例如，为了证实它对健康小鼠的促进食欲作用，将具有钙浓度升高活性的肽或非肽化合物皮下地或腹膜内地施用给动物，并可以将它们在施用以后 1 小时的食物摄入与媒介物施用组进行对比。

[0054] D- 丙氨酰基 -D-(2- 萘基) 丙氨酰基 -L- 丙氨酰基 -L- 色氨酰基 -D- 苯基丙氨酰基 -L- 赖氨酰胺 (美国专利号 5,663,146) 可以用作普拉莫瑞林 (GHRP-2)。

[0055] L- 组氨酰基 -D- 色氨酰基 -L- 丙氨酰基 -L- 色氨酰基 -D- 苯基丙氨酰基 -L- 赖氨酰胺 (Endocrinology (1984), 第 114 卷 (第 5 期), 第 1537-1545 页) 可以用作 GHRP-6。

[0056] L- 组氨酰基 -2- 甲基 -D- 色氨酰基 -L- 丙氨酰基 -L- 色氨酰基 -D- 苯基丙氨酰基 -L- 赖氨酰胺 (美国专利号 5,646,301) 可以用作海沙瑞林。

[0057] α - 甲基丙氨酰基 -L- 组氨酰基 -D-β -(2- 萘基)-L- 丙氨酰基 -D- 苯基丙氨酰基 -L- 赖氨酰胺 (Journal of Medicinal Chemistry (1998), 第 41 卷, 第 3699-704 页) 可以用作伊莫瑞林。

[0058] 2- 氨基 -2- 甲基 -N-[(1R)-2-(1- 甲磺酰基螺 [吲哚啉 -3,4'- 哌啶]-1'- 基)-2- 氧代 -1-(苯基甲氧基甲基) 乙基] 丙酰胺甲磺酸盐 (美国专利号 5,536,716) 可以用作甲磺酸伊布莫仑 (MK-0677)。

[0059] 5(S)- 环丙基 -11(R)-(4- 氟苄基)-2(R),7,8(R)- 三甲基 -2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,13,14,15,16- 十四氢 -1,4,7,10,13- 苯并氧杂四氮杂环十八炔 -6,9,12- 三酮 (美国专利号 7,476,653) 可以用作 ulimorelin (TZP-101)。

[0060] 2- 氨基 -N-{(1R)-2-[3- 苄基 -3-(N,N',N'- 三甲基肼基羰基) 哌啶 -1- 基]-1-((1H- 吲哚 -3- 基)-2- 氧代乙基)-2- 甲基丙酰胺 } (美国专利号 6,576,648) 可以用作阿那瑞林。

[0061] 2- 甲基丙氨酰基 -N-[1(R)- 甲酰氨基 -2-(1H- 吲哚 -3- 基) 乙基]-D- 色氨酰胺 (美国专利号 6,861,409) 可以用作马昔瑞林 (AEZS-130)。

[0062] 2- 氨基 -N-[2-[3a(R)- 苄基 -2- 甲基 -3- 氧代 -3,3a,4,5,6,7- 六氢 -2H- 吡唑并 [4,3-c] 吡啶 -5- 基]-1(R)-(苄氧基甲基)-2- 氧代乙基] 异丁酰胺 (欧洲专利号 0869968) 可以用作卡普瑞林 (CP-424391)。

[0063] (+)-3(S)-(2- 氯苯基)-1-[2-(二乙基氨基) 乙基]-3- 羟基 -2- 氧代 -4-(三氟甲基)-2,3- 脱氢 -1H- 吲哚 -6- 羧基酰胺盐酸盐 (美国专利号 6,576,656) 可以用作 SM-130686。

[0064] 可以用在本发明中的 GHR-S 激动剂的盐优选地是药学上可接受的盐。其例子包括与无机碱形成的盐、与有机碱形成的盐、与无机酸形成的盐、与有机酸形成的盐和与碱性或酸性氨基酸形成的盐。

[0065] 优选的与无机碱形成的盐的例子包括 : 碱金属盐诸如钠盐和钾盐 ; 碱土金属盐诸如钙盐和镁盐 ; 和铝盐和铵盐。

[0066] 优选的与有机碱形成的盐的例子包括三甲胺、三乙胺、吡啶、甲基吡啶、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、二环己胺和 N,N'- 二苄基乙二胺。

[0067] 优选的与无机酸形成的盐的例子包括与盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸和磷酸形成的盐。

[0068] 优选的与有机酸形成的盐的例子包括与甲酸、乙酸、三氟乙酸、富马酸、草酸、酒石

酸、马来酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、甲磺酸、苯磺酸和对甲苯磺酸形成的盐。

[0069] 优选的与碱性氨基酸形成的盐的例子包括与精氨酸、赖氨酸和鸟氨酸形成的盐。优选的与酸性氨基酸形成的盐的例子包括与天冬氨酸和谷氨酸形成的盐。

[0070] 在这些盐中，钠盐或钾盐是最优选的。

[0071] 本发明的 GHS-R 激动剂可以通过常规方法得到。例如，本发明的 GHS-R 激动剂可以从天然原料分离，或可以通过重组 DNA 技术和 / 或化学合成技术产生。

[0072] 在使用重组 DNA 技术产生本发明的肽化合物的情况下，用于引入编码根据本发明的肽化合物的目标基因的载体的例子包括：大肠杆菌（*E. coli*）载体（pBR322、pUC18、pUC19 等）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）载体（pUB110、pTP5、pC194 等）、酵母载体（YEp、YRp 和 YIp 型）和动物细胞载体（逆转录病毒、痘苗病毒等）。可以使用任意其它载体，只要所述载体可以允许宿主细胞稳定地携带目标基因。将所述载体转移至适当的宿主细胞。在例如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中描述的方法可以用作将目标基因引入质粒中的方法或将所述质粒转移至宿主细胞的方法。

[0073] 在质粒中，启动子在功能上连接至所述基因的上游，以便表达目标肽基因。

[0074] 在本发明中使用的启动子可以是适合用在用于表达目标基因的宿主细胞中的任意启动子。当要转化的宿主细胞是例如埃希氏菌属的细菌细胞时，可以使用 lac 启动子、trp 启动子、lpp 启动子、λPL 启动子、recA 启动子等。对于芽孢杆菌属的宿主细胞，可以使用 SPO1 启动子、SPO2 启动子等。对于酵母细胞，可以使用 GAP 启动子、PHO5 启动子、ADH 启动子等。对于动物细胞，可以使用 SV40 衍生的启动子、逆转录病毒衍生的启动子等。

[0075] 将如此得到的含有目标基因的载体用在宿主细胞的转化中。细菌细胞（例如，埃希氏菌属和芽孢杆菌属）、酵母细胞（例如，酵母属、毕赤酵母属和假丝酵母属）、动物细胞（例如，CHO 细胞和 COS 细胞）等可以用作宿主细胞。液体培养基适合作为培养基。特别优选地，所述培养基含有要培养的转化细胞的生长所必需的碳源、氮源等。如果需要的话，可以给所述培养基进一步补充维生素、生长刺激剂、血清等。

[0076] 培养以后，通过常规方法从培养物分离和纯化根据本发明的肽化合物。例如，为了从培养的微生物细胞或动物细胞提取目标物质，将如此培养的这些细胞收集，然后悬浮于含有蛋白变性剂（盐酸胍等）的缓冲溶液中，并超声破碎，例如，随后离心。接着，通过分离和纯化方法（诸如凝胶过滤、超滤、透析、SDS-PAGE 和考虑目标物质的分子量、溶解度、电荷（等电点）、亲和力等的各种色谱法技术）的适当组合，可以从上清液纯化目标物质。

[0077] 在使用化学合成技术产生本发明的肽化合物的情况下，例如，通过液相方法和 / 或固相方法缩合具有保护基的氨基酸以延长肽链。用酸除去所有保护基。通过本领域已知的纯化方法来纯化得到的粗产物，以得到本发明的肽化合物。

[0078] 根据本发明的葛瑞林和它的衍生物也可以通过常规方法得到。例如，根据本发明的葛瑞林和它的衍生物可以从天然原料分离或纯化，或可以通过重组 DNA 技术和 / 或化学合成技术产生。

[0079] 由于葛瑞林含有在它的侧链处被修饰（酰化）的氨基酸残基，根据本领域已知的方案通过修饰反应可以修饰（酰化）氨基酸残基。例如，在使用重组 DNA 技术的生产方法中，培养用表达载体（其含有编码葛瑞林或它的衍生物的 DNA）转化的宿主细胞，并可以从培

养物收集目标肽，以得到根据本发明的葛瑞林或它的衍生物。可以筛选宿主细胞以在细胞内得到目标肽的经修饰的（酰化的）化合物。例如，具有以下活性的细胞理想地用于直接生产脂肪酸修饰的（酰化的）肽化合物：能够在合适的位置切割所述肽的前体多肽的加工蛋白酶活性，和酰化所述肽中的丝氨酸残基的活性。可以如下选择这样的具有加工蛋白酶活性和丝氨酸酰化活性的宿主细胞：用含有编码前体多肽的 cDNA 的表达载体转化宿主细胞；和证实转化的细胞生产脂肪酸修饰的肽化合物，所述肽化合物具有钙浓度升高活性或生长激素促分泌素活性。

[0080] 在使用化学合成技术的生产方法中，例如，通过液相方法和 / 或固相方法缩合具有保护基的氨基酸以延长肽链。用酸除去所有保护基。通过以上纯化方法可以纯化得到的粗产物，以得到根据本发明的葛瑞林或它的衍生物。可以用酰化酶或酰基转移酶选择性地酰化位于目标位置处的氨基酸的侧链。

[0081] 可替换地，重组 DNA 技术和化学合成技术可以联合用在生产方法中。这样的生产方法可以包括：通过化学合成生产含有经修饰的氨基酸残基的片段，而通过重组 DNA 技术生产不含有经修饰的氨基酸残基的其它片段，然后融合这些片段（参见国际公开号 WO01/07475 和 WO03/084983）。

[0082] 可以用在本发明中的其它化合物，即，普拉莫瑞林 (GHRP-2)、GHRP-6、海沙瑞林、伊莫瑞林、甲磺酸伊布莫仑 (MK-0677)、ulimorelin、阿那瑞林、马昔瑞林、卡普瑞林和 SM-130686，也可以通过本领域已知的方法（包括以上方法）来产生。

[0083] 在受限饲喂下饲养 ALS 动物模型 ($SOD1^{G93A}$小鼠），并将 GHS-R 激动剂施用给所述动物，使得 GHS-R 激动剂不表现出促进食欲作用。在该情况下，既没有观察到肌无力抑制作用，也没有观察到运动神经元死亡抑制作用，尽管抑制了骨骼肌质量的减小。因而，在 GHS-R 激动剂在其中发挥它的促进食欲作用的个体中，GHS-R 激动剂表现出肌无力抑制作用和 / 或存活期延长作用。因此，在 ALS 影响的个体中，本发明的受体是通过施用 GHS-R 激动剂可以增强其食物摄入的个体，简言之，“具有不严重吞咽困难的个体”，其能够口服摄入与该个体所期望的一样多的食品。由于 GHS-R 激动剂可以发挥它的治疗效果（通过甚至从利鲁唑不再有效时施用），所述个体也可以“对利鲁唑无应答或不充分应答”。

[0084] (1) 具有不严重吞咽困难的个体

术语“具有不严重吞咽困难的个体”表示能够在期望摄入时口服摄入食品的个体。该个体可以进食与该个体想要的一样多。换而言之，该个体可以接受变得容易进食的饮食（呈糊状物形式的经过加工的食品等）的内容物，使用使得食品容易进食的进食工具，和接受帮助该个体进食的护理（例如，在使用进食工具中的辅助），只要所述个体的吞咽功能得到维持即可。

[0085] 根据修正的 ALS 功能评级量表（Revised ALS Functional Rating Scale）（在下文中，被称作 ALSFRS-R; Journal of the Neurological Sciences (1999), 第 169 卷（第 1-2 期），第 13-21 页），即全世界确立的临床评价指标，可以确定“不严重吞咽困难”。不严重吞咽困难对应于功能评级量表中在吞咽量度下的评分 2（饮食稠度变化）或更高，优选评分 3（早期进食问题—偶尔噎塞）或更高，更优选评分 4（正常进食习惯）。

[0086] 如在实施例中详细描述的，在使用葛瑞林作为 GHS-R 激动剂的情况下，葛瑞林表现出肌无力抑制作用和 / 或存活期延长作用，甚至在以下条件下：当小鼠难以从食物盒获

取食物时，在 18 周龄或以后通过将食物散布在地板上来辅助 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的进食。具体地，当在可以实现它的促进食欲作用的条件下施用时，葛瑞林可以抑制 ALS 动物模型的肌无力和延长它们的存活期。

[0087] (2) 对肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂无应答或不充分应答的个体

关于肌萎缩性侧索硬化的现有治疗剂 (ALS 的治疗剂) 的术语“无应答”表示：其中没有观察到以前或现在使用的 ALS 的现有治疗剂的治疗效果的状态，或其中所述效果没有维持的状态，即，其中通过 ALS 的现有治疗剂的施用没有抑制病理学进展的状态。通过检查上述 ALSFRS-R 中的一项或多项临床评价指标，评价对 ALS 的现有治疗剂的治疗的无应答性。因而，在 ALS 的治疗中熟练的临床医师可以确定对 ALS 的现有治疗剂的无应答性。例如，临床医师会每 3 个月在医学检查时根据 ALSFRS-R 评价个体的状态。当用 ALS 的现有治疗剂治疗开始以后，对于预定时段 (例如，3 个月) 在评级量表中的变化速率 (降低的评分 / 时段) 等于或大于在用 ALS 的现有治疗剂治疗开始以前对于预定时段 (例如，6 个月) 在评级量表中的变化速率时，ALS 的现有治疗剂对于所述个体而言是无效的。因而，所述个体被证实对 ALS 的现有治疗剂无应答。

[0088] 对 ALS 的现有治疗剂治疗无应答的个体也包括这样的个体：现有治疗剂在所述个体上以前已经响应于治疗产生它的治疗效果，但是现在不再通过治疗产生类似的效果。

[0089] 术语对 ALS 的现有治疗剂“不充分应答”表示这样的状态：其中由于 ALS 的现有治疗剂的不充分的治疗效果，使用 ALS 的现有治疗剂的治疗没有充分抑制病理学进展。通过检查上述 ALSFRS-R 中的一项或多项临床评价指标，评价对 ALS 的现有治疗剂治疗的不充分应答性。因而，在 ALS 的治疗中熟练的临床医师可以确定对 ALS 的现有治疗剂的不充分应答性。例如，临床医师会每 3 个月在医学检查时根据 ALSFRS-R 评价个体的状态。当用 ALS 的现有治疗剂治疗开始以后，对于预定时段 (例如，3 个月) 在评级量表中的变化速率 (降低的评分 / 时段) 与在用 ALS 的现有治疗剂治疗开始以前对于预定时段 (例如，6 个月) 在评级量表中的变化速率相比表现出小于 30% 的下降时，ALS 的现有治疗剂对于所述个体而言是不充分有效的。因而，所述个体被证实对 ALS 的现有治疗剂“不充分应答”。

[0090] 本文中使用的术语“治疗”表示控制、减轻或预防 ALS 的病理学进展。治疗包括控制、减轻或预防运动神经元的进行性变性、肌肉纤维的去神经支配、肌萎缩、肌无力、挛缩或麻痹的病理学进展，和延长存活期。

[0091] 通过本领域已知的方法，可以确定本文描述的“治疗效果”。通过评价例如以下项目，可以确定治疗效果：基于 ALSFRS-R 的功能状态，基于用力肺活量 (Forced Vital Capacity，FVC) 的呼吸功能，或基于医学研究委员会 (Medical Research Council，MRC) 量表的肌肉强度。

[0092] 可以使用任意其它方法，只要通过该方法可以确定 ALS 症状的程度即可。基于例如以下项目，可以确定治疗效果：抓握力量，背部肌肉强度，能够或不能独立走动，管饲喂的存在与否，达到管饲喂的时间段 (该时间段的开始日期可以任意设置，且可以是例如施用本发明的 ALS 治疗剂或开始 ALS 的现有治疗剂的当天，或首次观察到 ALS 症状诸如肌无力的当天)，气管切开术的存在与否，呼吸机安置的存在与否，达到插管法 (用于安置呼吸机) 或气管切开术的时间段 (该时间段的开始日期可以任意设置，且可以是例如施用本发明的 ALS 治疗剂或开始 ALS 的现有治疗剂的当天，或首次观察到 ALS 症状诸如肌无力的当天)，

或存活期（该时间段的开始日期可以任意设置，且可以是例如施用本发明的 ALS 治疗剂或开始 ALS 的现有治疗剂的当天，或首次观察到 ALS 症状诸如肌无力的当天）。

[0093] 在本发明的 ALS 治疗剂或 ALS 的现有治疗剂的给药期结束后或在其给药期过程中，使用这些方法中的任一种，可以确定药物的“治疗效果”。

[0094] 包含根据本发明的 GHS-R 激动剂作为活性成分的 ALS 治疗剂可以单独施用给受体个体，或可以与其它药物联合施用给受体个体。

[0095] 在本文中使用的术语“联合（施用）”或“联合使用”表示 2 种或更多种类型的药物向一位个体的施用。这些药物可以同时地或几乎同时地（例如，在 1 小时内）施用，或可以以几小时的间隔以错开的方式施用。例如，每天施用第一种药物，随后立即施用第二种药物。通常，在适合于这些药物发挥它们的作用的时间施用第一种和第二种药物。在例如与 ALS 现有治疗剂联合使用包含 GHS-R 激动剂葛瑞林作为活性成分的 ALS 治疗剂的情况下，在每天早晨和每天晚上在餐前施用 ALS 的现有治疗剂，随后立即施用（例如，皮下施用）包含葛瑞林作为活性成分的 ALS 治疗剂，或反之亦然。以此方式，可以联合使用这些药物。

[0096] 由于葛瑞林在 ALS 的现有治疗剂无效的条件下表现出肌无力抑制作用和 / 或存活期延长作用，该药物对于对 ALS 的现有治疗剂无应答或不充分应答的受 ALS 影响的个体而言是有效的，并且也预见到当与 ALS 的现有治疗剂联合使用时对于对 ALS 的现有治疗剂不充分应答的受 ALS 影响的个体具有效力。ALS 的现有治疗剂的例子可以包括利鲁唑。

[0097] 可以用在本发明中的 GHS-R 激动剂或其药理学上可接受的盐，可以以补充了药学上可接受的载体的固体制剂（片剂、胶囊剂、颗粒剂、细颗粒剂、粉剂等）或液体制剂（糖浆剂、注射剂等）的形式口服地或胃肠外地施用。

[0098] 常规地用作药用材料的各种有机或无机载体物质被用作药学上可接受的载体。给固体制剂补充赋形剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。给液体制剂补充溶剂、增溶剂、助悬剂、张度剂、pH 调节剂、缓冲剂、安抚剂等。如果必要的话，药用添加剂诸如杀菌剂、抗氧化剂、着色剂和甜味剂可以进一步用在这些制剂中。

[0099] 赋形剂的优选例子包括乳糖、蔗糖、D- 甘露醇、淀粉、结晶纤维素和轻质无水硅酸。润滑剂的优选例子包括硬脂酸镁、硬脂酸钙、滑石和胶态二氧化硅。

[0100] 粘合剂的优选例子包括结晶纤维素、蔗糖、D- 甘露醇、糊精、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。

[0101] 崩解剂的优选例子包括淀粉、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙、交联羧甲基纤维素钠和羧甲基淀粉钠。

[0102] 溶剂的优选例子包括注射用水、醇、丙二醇、聚乙二醇、芝麻油和玉米油。

[0103] 增溶剂的优选例子包括聚乙二醇、丙二醇、D- 甘露醇、苯甲酸苄酯、乙醇、三氨基甲烷、胆固醇、三乙醇胺、碳酸钠和柠檬酸钠。

[0104] 助悬剂的优选例子包括 ：表面活性剂诸如硬脂酰三乙醇胺、月桂基硫酸钠、月桂基氨基丙酸、卵磷脂、苯扎氯铵、苄索氯铵和单硬脂酸甘油酯 ；和亲水聚合物诸如聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟基甲基纤维素、羟乙基纤维素和羟丙基纤维素。

[0105] 张度剂的优选例子包括氯化钠、甘油和 D- 甘露醇。

[0106] 缓冲剂的优选例子包括磷酸盐、乙酸盐、碳酸盐和柠檬酸盐缓冲溶液。

[0107] 安抚剂的优选例子包括包括苯甲醇。

[0108] 杀菌剂的优选例子包括对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯甲醇、苯乙醇、脱氢乙酸和山梨酸。

[0109] 抗氧化剂的优选例子包括亚硫酸盐和抗坏血酸。

[0110] 适合于胃肠外施用的剂型的例子可以包括注射剂、滴剂、栓剂、经皮吸收制剂、透粘膜吸收制剂、以及用于静脉内施用、皮内施用、皮下施用或肌肉内施用的吸入剂。适合于口服施用的剂型的例子可以包括胶囊剂、片剂和糖浆剂。当本发明的治疗剂中的活性成分是肽化合物时，它的剂型优选地是适合于胃肠外施用的剂型，例如，注射剂、滴剂或吸入剂。各种这样的剂型是本领域技术人员已知的。本领域技术人员可以适当地选择适合于期望的施用途径的剂型，且可以在必要时使用一种或两种或更多种在本领域中可用的药用添加剂产生药物组合物形式的制剂。例如，可以如下制备注射剂或滴剂形式的治疗剂：将活性成分GHS-R激动剂与一种或两种或更多种药用添加剂(诸如张度剂、pH调节剂、安抚剂和杀菌剂)一起溶解在注射用蒸馏水中；和将该溶液灭菌。可替换地，呈注射剂或滴剂形式的治疗剂可以提供为冷冻干燥的治疗剂。这样的制剂可以在使用前通过添加注射用蒸馏水或盐水来溶解并用作注射剂或滴剂。

[0111] 由于人葛瑞林通过皮下施用在ALS动物模型中表现出肌无力抑制作用和/或存活期延长作用，葛瑞林或它的衍生物、或葛瑞林或衍生物的药理学上可接受的盐、或肽或非肽GHS-R激动剂可以以注射(诸如皮下注射)形式施用。

[0112] 当活性成分是肽化合物时，该化合物可以以不易于在胃肠道中消化的制剂的形式(例如，以包含被包封在脂质体中的活性成分肽的微胶囊的形式)口服施用。另一种可能的施用方法包括通过胃肠粘膜层以外的粘膜(诸如直肠粘膜层、鼻粘膜层或舌下粘膜层)吸收。在该情况下，可以以栓剂、鼻腔喷雾剂、吸入剂或舌下片剂的形式将所述化合物施用给个体。可替换地，在本发明中还可以使用通过采用例如控释制剂或缓释制剂而在所述肽在血液中的保留方面得到改善的制剂，所述控释制剂或缓释制剂含有多糖(诸如葡聚糖)或以多胺或PEG为代表的可生物降解的聚合物作为载体。

[0113] 如果在口服施用中使用非肽化合物作为活性成分，所述化合物可以与固体载体(诸如赋形剂、润滑剂、粘合剂和崩解剂)一起制成片剂，以粉末或丸粒的形式装入硬胶囊中，或制成糖锭形式。固体载体的量可以宽泛地变化，且通常是大约25 mg至大约1 g。在使用液体载体的情况下，可以以糖浆剂、乳剂、软胶囊剂或水性或非水性液体混悬液或溶液的形式施用由活性成分和液体载体组成的制剂。

[0114] 根据个体(患者)的年龄、体重、症状的程度和施用途径，可以适当地选择可以用作根据本发明的ALS治疗剂中的活性成分的GHS-R激动剂的剂量。在所述物质的重量的上限方面，对于作为受ALS影响的个体的成年人而言，其每日剂量的上限通常是，例如，大约100 mg/kg或更小，优选大约10 mg/kg或更小，更优选1 mg/kg或更小。其每日剂量的下限是，例如，大约0.1 μg/kg或更大，优选1 μg/kg或更大，更优选10 μg/kg或更大。由于可以用作根据本发明的药物组合物中的活性成分的物质在实现它的促进食欲作用的条件下会抑制ALS的病理学进展，当受ALS影响的个体表现出显著吞咽困难(其不再是不严重的)且需要无意识口服摄入方案(诸如管饲喂)时，它的施用期终止。可以每天大约1次或2次重复地或连续地施用所述物质持续几个月至几年直到该阶段。对于所述物质的重复施

用，理想地在每天早晨和 / 或每天晚上在餐前施用所述物质。

实施例

[0115] 在下文中，将参考实施例具体地描述本发明。但是，这些实施例仅仅为了例证本发明的实施方案之一的目的而给出，且无意限制本发明。

[0116] 在下面的实施例中，使用的 ALS 动物模型是 $SOD1^{G93A}$小鼠。首先，从 The Jackson Laboratory (ME, USA) 购买 B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J 小鼠 ($SOD1^{G93A}$小鼠）和与其相同品系的野生型小鼠，并彼此交配以得到后代。将得到的 $SOD1^{G93A}$小鼠进一步繁育成野生型同胞仔 (WT 小鼠）。将新出生的 $SOD1^{G93A}$小鼠用在实验中。在某些实施例中，也使用 WT 小鼠。

[0117] 在饲养时，$SOD1^{G93A}$小鼠和 WT 小鼠自由地接受自来水和啮齿动物标准饲料丸粒 (CRF-1，总卡路里的 13.6% 源自脂肪，3570 kcal/kg, Oriental Yeast Co., Ltd.)。当小鼠由于下肢功能的减退难以从食物盒获取食物时，在 18 周龄或以后通过将食物散布在地板上来辅助 $SOD1^{G93A}$小鼠进食。

[0118] <实施例 1> 10-周龄 $SOD1^{G93A}$小鼠和 WT小鼠之间的体重和前肢肌肉强度的对比

如在人 ALS 中一样，$SOD1^{G93A}$小鼠在成熟期具有运动神经元的选择性死亡，且表现出骨骼肌萎缩或肌肉强度损失，最终导致死亡。因而，首先将 10- 周龄 $SOD1^{G93A}$小鼠的体重和前肢肌肉强度与 WT 小鼠进行对比，以证实 ALS 在该阶段的发作。

[0119] 1. 材料和方法

在该实施例中，使用 10- 周龄 WT 和 $SOD1^{G93A}$小鼠，并测量它们的体重和前肢肌肉强度。使用大鼠 / 小鼠简单肌力计 200 g 标度 (O'HARA & CO., LTD.)，测量前肢肌肉强度。

[0120] 2. 结果

将每组的体重和前肢肌肉强度显示在表 1 中。

[0121] 与 WT 小鼠相比，$SOD1^{G93A}$小鼠表现出平均而言低至减小大约 1 g 的平均体重且显著低至降低大约 0.1 N 的前肢肌肉强度的值。这证实，$SOD1^{G93A}$小鼠在 10 周龄时已经丧失它们的肌肉强度并发展 ALS。

[0122] [表 1]

	WT 小鼠	$SOD1^{G93A}$小鼠
体重 (g)	25.2±0.7 (18)	24.1±0.7 (10)
前肢肌肉强度 (N)	1.04±0.04 (18)	0.91±0.04 (10)*

数值用平均值 ±SE （病例的数目）来指示

*: $P < 0.05$，相对于 WT 小鼠 (Student 氏 t 检验)。

[0123] <实施例 2>利鲁唑对 $SOD1^{G93A}$小鼠的影响

1. 材料和方法

已经报道，利鲁唑 (ALS 的现有治疗剂) 在从 4 周龄或 7 周龄（且在任一种情况下，在 ALS 发作之前）施用给 $SOD1^{G93A}$小鼠时会表现出寿命延长作用 (Amyotrophic Lateral Sclerosis (2009), 第 10 卷, 第 85-94 页；和 Annals of Neurology (1996), 第 39 卷, 第 147-157 页)。在实施例 1 中，证实了 $SOD1^{G93A}$小鼠在 10 周龄时表现出肌无力作为 ALS 的症状。

[0124] 在该实施例中，将 10- 周龄 $SOD1^{G93A}$小鼠分成 2 组：媒介物（盐水溶液）组和利鲁

唑组。每天 1 次给其腹膜内地施用盐水溶液或利鲁唑 (Sigma-Aldrich Corp, 16 mg/kg) 直到死亡,并分析每个个体的存活期。根据以前的报道 (Amyotrophic Lateral Sclerosis (2009), 第 10 卷, 第 85-94 页),设定利鲁唑的剂量。

[0125] 2. 结果

每个组的平均存活期显示在表 2 中。

[0126] 媒介物组和利鲁唑组具有等同的平均存活期。因而,从 10 周龄开始,利鲁唑在施用条件下没有被证实具有寿命延长作用。

[0127] [表 2]

	媒介物组	利鲁唑组
存活期 (天)	137±3 (7)	134±3 (6)

数值用平均值 ±SE (病例的数目) 来指示。

[0128] <实施例 3>人衍生的葛瑞林 (在下文中,被称作人葛瑞林) 对 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的影响 - (1):通过连续皮下施用对骨骼肌质量、肌肉强度和存活期的影响

在实施例 2 中,证实了当从 10 周龄施用给 $SOD1^{G93A}$ 小鼠时,利鲁唑没有表现出存活期延长作用。在这样的条件下检查了人葛瑞林 (SEQ ID NO: 1) 的作用 :其中 $SOD1^{G93A}$ 小鼠已经表现出肌无力作为 ALS 的症状,且利鲁唑没有有效地延长它们的存活期。

[0129] 1. 材料和方法

在该实验中,使用 10- 周龄 $SOD1^{G93A}$ 小鼠,将它们分成 2 组 :媒介物组和人葛瑞林组。将人葛瑞林 (50 μg/ 天, 大约 2 mg/kg/ 天) 溶解在媒介物 (盐水溶液) 中以制备给药溶液。将装有给药溶液或盐水溶液的渗透泵 (ALZET(R) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 1004, DURECT Corporation) 皮下地植入每只小鼠的后背中进行连续皮下施用。所述施用从 10 周龄开始,并持续至每 4 周用一个新渗透泵替换活个体的渗透泵。

[0130] 在开始施用之前和施用 8 周以后测量它们的体重和饲料重量,以计算体重和食物摄入的变化量。施用 8 周以后,使用 X- 射线 CT (Latheta LCT-200, Hitachi Aloka Medical, Ltd.) 测量小鼠的下体骨骼肌质量。使用从在施用 8 周以后从尾静脉收集的血液分离出的血浆,用 Cholesterol E - Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 测量血浆总胆固醇浓度。在第 16 周龄使用大鼠 / 小鼠简单肌力计 200 g 标度 (O'HARA & CO., LTD.) 测量前肢肌肉强度。还分析每个个体的存活期。

[0131] 2. 结果

施用 8 周以后每个组的平均体重、食物摄入和下体骨骼肌质量的变化量显示在表 3 中。

[0132] 与媒介物组相比,在人葛瑞林组中施用 8 周以后体重、食物摄入和下体骨骼肌质量的变化量显著增加。

[0133] [表 3]

	媒介物组	人葛瑞林组
体重变化量 (g)	0.4±0.4 (15)	2.6±0.4 (15)**
食物摄入 (g)	177.0±2.9 (15)	188.2±3.6 (15)*
下体骨骼肌质量 (g)	4.8±0.3 (15)	5.7±0.3 (15)*

数值用平均值 ±SE (病例的数目) 来指示

*, **: P < 0.05, 0.01,相对于媒介物组 (Student 氏 t 检验)。

[0134] 施用 8 周以后每个组的血浆总胆固醇浓度显示在表 4 中。

[0135] 在媒介物组和人葛瑞林组之间没有观察到差异。

[0136] [表 4]

	媒介物组	人葛瑞林组
血浆总胆固醇浓度 (mg/dL)	86.5±5.6 (15)	85.8±4.0 (15)

数值用平均值 ±SE (病例的数目) 来指示。

[0137] 施用 6 周以后每个组的平均前肢肌肉强度显示在表 5 中。

[0138] 人葛瑞林组具有与媒介物组相比显著更强的前肢肌肉强度,从而证实人葛瑞林会抑制肌肉强度损失。

[0139] [表 5]

	媒介物组	人葛瑞林组
前肢肌肉强度 (N)	0.74±0.05 (15)	0.96±0.05 (15)**

数值用平均值 ±SE (病例的数目) 来指示

**: P < 0.01,相对于媒介物组 (Student 氏 t 检验)。

[0140] 接着,每个组的平均存活期显示在表 6 中。

[0141] 人葛瑞林组的存活期与媒介物组相比显著延长,且平均而言比媒介物组的存活天数长 13.8%。

[0142] [表 6]

	媒介物组	人葛瑞林组
存活期 (天)	152±5 (15)	173±4 (15)**

数值用平均值 ±SE (病例的数目) 来指示

**: P < 0.01,相对于媒介物组 (对数秩检验)。

[0143] 这些结果证实,与媒介物组相比,当 $SOD1^{G93A}$小鼠已经表现出肌无力且利鲁唑不会有效地延长它们的存活期时从 10 周龄连续皮下施用的人葛瑞林会增加它们的体重和食物摄入,抑制前肢肌肉强度的损失,和延长存活期,尽管对血浆总胆固醇浓度没有影响。因而,发现人葛瑞林会抑制 ALS 症状的进展,即使在利鲁唑(ALS 的现有治疗剂)无效的条件下。

[0144] <实施例 4>人葛瑞林 对 $SOD1^{G93A}$小鼠的影响 - (2): 通过连续皮下施用实现的运动神经元保护作用

在实施例 3 中,从 10 周龄开始给 $SOD1^{G93A}$小鼠施用的人葛瑞林被证实会抑制前肢肌肉强度损失和延长它们的存活期。ALS 是涉及由运动神经元死亡引起的肌萎缩的疾病,最终导致死亡。在这方面,针对它的运动神经元保护作用检查了人葛瑞林。

[0145] 1. 材料和方法

在该实验中,使用 10- 周龄 $SOD1^{G93A}$和 WT 小鼠。将 $SOD1^{G93A}$小鼠分成 2 组 :媒介物组和人葛瑞林组。使用施用媒介物的 WT 小鼠作为对照组。将人葛瑞林 (50 μg/ 天, 大约 2 mg/kg/ 天) 溶解在媒介物 (盐水溶液) 中以制备给药溶液。将装有给药溶液或盐水溶液的渗透泵 (ALZET(R) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 1004, DURECT Corporation) 皮下地植入每只小鼠的后背中进行连续皮下施用。所述施用从 10 周龄开始,并持续至 4 周后用一个新渗透泵替换渗透泵以后。施用开始以后 7 周,解剖小鼠,并提取它们的脊髓的 T9 区域。制备 Nissl 染色的切片,并在组织学上鉴别运动神经元的数目。每个个体使用 3 个不相邻的切片,以测量存在于前角中的运动神经元的数目。当将对照组中的运动神经元的平均数目定义为 100% 时,将每个组的测量值计算为相对值。

[0146] 2. 结果

每个组中的运动神经元相对于对照组的相对数目显示在表 7 中。

[0147] 媒介物组中的运动神经元的数目显著小至对照组的数目的大约1/2。另一方面，人葛瑞林组中的运动神经元的数目显著大于媒介物组中的数目。

[0148] [表7]

	对照组	媒介物组	人葛瑞林组
小鼠基因型	WT	$SOD1^{G93A}$	$SOD1^{G93A}$
试验物	媒介物	媒介物	人葛瑞林
运动神经元的数目 (%)	100±4 (9)	51±3 (8)**	84±7 (7)*, ##

数值用平均值 ±SE（病例的数目）来指示

*, **: P < 0.05, 0.01. 相对于对照组 (Dunnett 氏多重比较检验)

##: P < 0.01 ;相对于媒介物组 (Student 氏 t 检验)。

[0149] 这些结果表明，人葛瑞林向 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的施用会抑制运动神经元的数目的减少，即，保护运动神经元。

[0150] <实施例 5> 人葛瑞林对 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的影响 - (3): 重复皮下施用对肌肉强度和存活期的影响

在实施例 3 和 4 中，从 10 周龄给 $SOD1^{G93A}$ 小鼠连续皮下施用的人葛瑞林被证实会抑制前肢肌肉强度损失，延长它们的存活期，和保护运动神经元。

[0151] 在该实施例中，检查了人葛瑞林当重复皮下施用给 10-周龄 $SOD1^{G93A}$ 小鼠时对前肢肌肉强度和存活期的影响。

[0152] 1. 材料和方法

在该实验中，使用 10-周龄 $SOD1^{G93A}$ 小鼠，将它们分成 2 组 :媒介物组和人葛瑞林组。从 10 周龄开始每天 2 次给它们皮下施用人葛瑞林 (1 mg/kg) 或媒介物 (5% 甘露醇溶液) 直到死亡。在施用开始之前和施用 8 周之后测量它们的体重和饲料重量，以计算体重和食物摄入的变化量。在施用开始之前和施用 8 周以后，使用大鼠 / 小鼠简单肌力计 200 g 标度 (O'HARA & CO., LTD.) 测量前肢肌肉强度。还分析每个个体的存活期。

[0153] 2. 结果

施用 8 周以后每个组的平均体重和食物摄入的变化量显示在表 8 中。

[0154] 与媒介物组相比，施用 8 周以后人葛瑞林组中的体重和食物摄入的变化量显著增加。

[0155] [表8]

	媒介物组	人葛瑞林组
体重变化量 (g)	0.1±0.7 (12)	2.1±0.4 (13)**
食物摄入 (g)	160.8±3.9 (12)	176.2±3.5 (13)**

数值用平均值 ±SE（病例的数目）来指示

**: P < 0.01，相对于媒介物组 (Student 氏 t 检验)。

[0156] 从 10 周龄至施用 8 周以后每个组的前肢肌肉强度的平均变化显示在表 9 中。与媒介物组相比，人葛瑞林组中的前肢肌肉强度损失被显著抑制。

[0157] [表9]

	媒介物组	人葛瑞林组
前肢肌肉强度的变化 (N)	-0.34±0.05 (12)	-0.08±0.07 (13)**

数值用平均值 ±SE（病例的数目）来指示

**: P < 0.01，相对于媒介物组 (Student 氏 t 检验)。

[0158] 接着，每个组的平均存活期显示在表 10 中。

[0159] 人葛瑞林组的存活期与媒介物组相比显著延长，且平均而言比媒介物组的存活天数长 21.8%。

[0160] [表 10]

	媒介物组	人葛瑞林组
存活期（天）	147±5 (13)	179±8 (13)**

数值用平均值 ±SE （病例的数目）来指示

**: P < 0.01 ;相对于媒介物组（对数秩检验）。

[0161] 这些结果证实，与在连续皮下施用中一样，人葛瑞林的重复皮下施用会抑制 $SOD1^{G93A}$ 小鼠中的 ALS 的病理学进展。这指示，通过重复皮下施用，人葛瑞林可以抑制人 ALS 患者的病理学进展并对其表现出治疗效果。

[0162] <实施例 6> 人葛瑞林对 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的影响 - (4)：在受限饲喂下对体重、骨骼肌质量、肌肉强度和运动神经元的数目的影响

在实施例 3 和 5 中，从 10 周龄给 $SOD1^{G93A}$ 小鼠连续皮下施用或重复施用的人葛瑞林被证实会抑制前肢肌肉强度损失和延长它们的存活期。在实施例 4 中，连续皮下施用给 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的葛瑞林被证实会保护运动神经元。

[0163] 在该实施例中，在受限饲喂下饲养 $SOD1^{G93A}$ 小鼠，由此将处于自愿摄入条件下的 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的每天食物摄入设定为大约 90%。在小鼠能够不再摄入食物(即，葛瑞林不表现出促进食欲作用)的条件下，给其连续皮下施用人葛瑞林。针对它对体重、骨骼肌质量、肌肉强度、运动神经元的数目、以及 Atrogin-1 和肌肉环指蛋白 -1 (MuRF1)(它们二者都参与骨骼肌萎缩) 的 mRNA 表达的影响，检查了施用的葛瑞林。

[0164] 1. 材料和方法

在该实验中，使用 10- 周龄 $SOD1^{G93A}$ 和 WT 小鼠。将 WT 小鼠分成 2 组，其中之一在自愿摄入条件下饲养 (WT- 对照组)，另一组施用 2.8-2.9 g/ 天，这对应于 $SOD1^{G93A}$ 小鼠在自愿摄入条件下的每天食物摄入的大约 90%(WT- 受限饲喂组)。将 $SOD1^{G93A}$ 小鼠分成 2 组 :媒介物组和人葛瑞林组，它们二者都在 2.8-2.9 g/ 天的受限饲喂条件下饲养 (G93A- 媒介物组和 G93A- 人葛瑞林组)。

[0165] 将人葛瑞林 (50 μg/ 天，大约 2 mg/kg/ 天）溶解在媒介物（盐水溶液）中以制备给药溶液。将装有给药溶液或盐水溶液的渗透泵 (ALZET(R) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 1004, DURECT Corporation) 皮下地植入每只小鼠的后背中进行连续皮下施用。所述施用从 10 周龄开始，并在 4 周后用一个新渗透泵替换渗透泵。

[0166] 在施用开始当天和 6 周以后测量它们的体重，以计算体重的变化量。

[0167] 施用开始以后 7 周，使用大鼠 / 小鼠简单肌力计 200 g 标度 (O'HARA & CO., LTD.) 测量前肢肌肉强度。

[0168] 在施用开始之前（在 10 周龄时）和 7 周以后，使用 X- 射线 CT (Latheta LCT-200, Hitachi Aloka Medical, Ltd.) 测量小鼠的下体骨骼肌质量，以确定骨骼肌质量的变化量。

[0169] 然后，将小鼠解剖，并提取它们的脊髓的 T9 区域。制备 Nissl 染色的切片，并在组织学上鉴别运动神经元的数目。每个个体使用 3 个不相邻的切片，以测量存在于前角中的运动神经元的数目。当将 WT- 对照组中的运动神经元的平均数目定义为 100% 时，将每个组

的测量值计算为相对值。

[0170] 分离腓肠肌，并在 mRNA 提取以后，通过定量 PCR 来测量 Atrogin-1 和 MuRF1 mRNA 表达水平。当将 WT- 对照组中的平均 mRNA 表达水平定义为 100% 时，将每个组的测量值计算为相对值。

[0171] 2. 结果

在受限饲喂下饲养的组中的所有小鼠在试验期中摄入了饲料的所有部分。因而，证实了食物摄入在 WT- 受限饲喂组、G93A- 媒介物组和在受限饲喂下饲养的 G93A- 人葛瑞林组之间是相同的。

[0172] 每个组中的小鼠在施用开始以后 6 周的体重变化量和在施用开始以后 7 周的下体骨骼肌质量变化量显示在表 11 中。

[0173] 在自愿摄入下饲养的 WT- 对照组的体重增加，而受限饲喂在 WT 小鼠中和在 $SOD1^{G93A}$ 小鼠中减轻体重，且特别是在 $SOD1^{G93A}$ 小鼠中显著减轻体重。与施用媒介物的 $SOD1^{G93A}$ 小鼠（G93A- 媒介物组）相比，人葛瑞林组（G93A- 人葛瑞林组）中的体重减轻显著更小。类似地，在自愿摄入下饲养的 WT 小鼠中的下体骨骼肌质量也增加，但是在受限饲喂组中减小。与 G93A- 媒介物组相比，G93A- 人葛瑞林组中的骨骼肌质量的减小显著受到抑制。如上所示，即使在葛瑞林没有表现出促进食欲作用的受限饲喂条件下，葛瑞林的施用也会抑制 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的体重或骨骼肌质量的减轻。

[0174] [表 11]

	体重变化量 (g)	下体骨骼肌变化量 (g)
WT- 对照组 (9)	3.5±1.1	0.3±0.2
WT- 受限饲喂组 (8)	$-2.5\pm0.9^{**}$	$-1.3\pm0.1^{**}$
G93A- 媒介物组 (13)	$-4.7\pm0.6^{**}$	$-1.6\pm0.2^{**}$
G93A- 人葛瑞林组 (15)	$-1.4\pm0.7^{**,\ \#\#}$	$-0.9\pm0.2^{**,\ \#}$

()：病例的数目，**：$P < 0.01$；相对于 WT- 对照组 (Dunnett 氏多重比较检验)

$^{\#,\ \#\#}$：$P < 0.05$，0.01；相对于 G93A- 媒介物组 (Student 氏 t 检验)。

[0175] 施用开始以后 7 周骨骼肌中的 Atrogin-1 和 MuRF1 的 mRNA 表达水平显示在表 12 中。

[0176] 这些基因表达水平在受限饲喂下饲养的 WT 小鼠和在自愿摄入下饲养的 WT 小鼠之间没有极大变化，但是与在自愿摄入下饲养的 WT 小鼠（对照组）相比，在受限饲喂下施用媒介物的 $SOD1^{G93A}$ 小鼠（G93A- 媒介物组）中显著升高。

[0177] 另一方面，与媒介物组相比，在受限饲喂下施用人葛瑞林的 $SOD1^{G93A}$ 小鼠 (G93A- 葛瑞林组）中的 Atrogin-1 和 MuRF1 的 mRNA 表达显著降低，从而提示，人葛瑞林组中的骨骼肌萎缩受到抑制。这些结果与表 11 的结果相一致，从而表明人葛瑞林组中的骨骼肌质量减轻更小。

[0178] [表 12]

	Atrogin 1 mRNA 表达水平 (%)	MuRF1 mRNA 表达水平 (%)
WT- 对照组 (9)	100±11	100±8
WT- 受限饲喂组 (8)	113±19	142±24
G93A- 媒介物组 (13)	$528\pm143^{**}$	$613\pm196^{*}$
G93A- 人葛瑞林组 (15)	$205\pm34^{\#\#}$	$207\pm36^{\#\#}$

()：病例的数目，*,**：$P < 0.05$，0.01；相对于 WT- 对照组 (Dunnett 氏多重比较检

验）

##: P < 0.01；相对于 G93A- 媒介物组 (Student 氏 t 检验）。

[0179] 如上所示，即使在受限饲喂下，人葛瑞林抑制 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的骨骼肌萎缩。

[0180] 接着，在这些条件下每个小鼠组的脊髓中的前肢肌肉强度和运动神经元的数目显示在表 13 中。

[0181] 在受限饲喂下饲养的 WT 小鼠表现出与 WT- 对照组（自愿摄入）等同的前肢肌肉强度或运动神经元的数目。与 WT- 对照组（自愿摄入）相比，在受限饲喂下饲养的 $SOD1^{G93A}$ 小鼠（媒介物）中的前肢肌肉强度或运动神经元的数目显著减小。这适用于人葛瑞林施用组。因而，在受限饲喂下，人葛瑞林既没有抑制运动神经元死亡也没有抑制前肢肌肉强度。

[0182] [表 13]

	运动神经元的数目 (%)	前肢肌肉强度 (N)
WT- 对照组 (9)	100±11	1.02±0.05
WT- 受限饲喂组 (8)	93±10	0.99±0.07
G93A- 媒介物组 (13)	63±4**	0.74±0.06**
G93A- 人葛瑞林组 (15)	66±5**	0.77±0.06**

()：病例的数目，**：P < 0.01；相对于 WT- 对照组 (Dunnett 氏多重比较检验）。

[0183] 如从这些结果中所见，即使在受限饲喂下，葛瑞林通过独立于它的促进食欲作用的作用，抑制 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的体重减轻或骨骼肌萎缩。

[0184] 另一方面，证实了为了抑制运动神经元死亡或肌肉强度损失，必须施用葛瑞林从而实现它的促进食欲作用，简言之，必须施用给通过施用葛瑞林可以增加其食物摄入的个体。具体地，发现葛瑞林会通过它的促进食欲作用改善全身能量状态，由此间接地抑制运动神经元死亡和抑制 ALS 的病理学进展。

[0185] <实施例 7> 16- 周龄 $SOD1^{G93A}$ 小鼠和 WT 小鼠之间的体重和前肢肌肉强度的对比

在实施例 3、4 和 5 中，从 10 周龄（此时小鼠已经表现出前肢肌无力）给 $SOD1^{G93A}$ 小鼠施用的人葛瑞林被证实会增加它们的食物摄入或体重，抑制运动神经元死亡或肌肉强度损失，和延长存活期。

[0186] 在临床场合中，仅当它发作以后临床医师已经做出该疾病的明确诊断时，才会开始 ALS 患者的治疗。由于 ALS 的明确诊断需要半年至 1 年或数年 (ALS 治疗指南， 2002，日本神经病学学会的治疗指南），可以在治疗开始之前看到症状进展。

[0187] 因而，检查了人葛瑞林当施用给处于 ALS 的病理学进展的更晚期的 $SOD1^{G93A}$ 小鼠时的影响。因此，在该实施例中，将 16- 周龄 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的体重和前肢肌肉强度与 WT 小鼠进行了对比。

[0188] 1. 材料和方法

在该实验中，使用 16- 周龄 WT 和 $SOD1^{G93A}$ 小鼠，并测量它们的体重和前肢肌肉强度。使用大鼠 / 小鼠简单肌力计 200 g 标度 (O'HARA & CO., LTD.) 测量前肢肌肉强度。

[0189] 2. 结果

每个组的体重和前肢肌肉强度显示在表 14 中。

[0190] 与 WT 小鼠相比，$SOD1^{G93A}$ 小鼠平均而言表现出小至少 2 g 的平均体重和低大约 0.5 N 的前肢肌肉强度。与 10 周龄的小鼠（表 1）相比，相对于 WT 小鼠的值的这些差异更显著。并且，16- 周龄 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的前肢肌肉强度低于在 10 周龄时 (0.91 N)（表 1）。

[0191] [表 14]

	WT 小鼠	$SOD1^{G93A}$小鼠
体重 (g)	28.0±0.5 (5)	25.3±0.9 (8)*
前肢肌肉强度	1.21±0.06(5)	0.68±0.06 (8)**

数值用平均值 ±SE (病例的数目) 来指示

*, **: P < 0.05, P < 0.01,相对于 WT 小鼠 (Student 氏 t 检验)。

[0192] 如上所示,与相同年龄的 WT 小鼠或 10- 周龄 $SOD1^{G93A}$小鼠 (表 1) 相比,16- 周龄 $SOD1^{G93A}$小鼠具有更低的前肢肌肉强度,且因此被证实处于 ALS 的病理学进展的更晚期。

[0193] <实施例 8> 人葛瑞林对 $SOD1^{G93A}$小鼠的影响 - (5): 从 16周龄连续皮下施用对存活期的影响

在该实施例中,用它们的存活期作为指标,检查了人葛瑞林对 16- 周龄 $SOD1^{G93A}$小鼠中的 ALS 的病理学进展的抑制作用,所述小鼠表现出显著肌无力且处于 ALS 的病理学进展的更晚期。

[0194] 1. 材料和方法

在该实验中,使用 16- 周龄 $SOD1^{G93A}$小鼠,将它们分成 2 组 :媒介物组和人葛瑞林组。将人葛瑞林 (50 μg/ 天, 大约 2 mg/kg/ 天) 溶解在媒介物 (盐水溶液) 中以制备给药溶液。将装有给药溶液或盐水溶液的渗透泵 (ALZET(R) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 1004, DURECT Corporation) 皮下地植入每只小鼠的后背中进行连续皮下施用。所述施用从 16 周龄开始,并持续至每 4 周用一个新渗透泵替换活个体的渗透泵。分析每个个体的存活期。

[0195] 2. 结果

每个组的平均存活期显示在表 15 中。

[0196] 人葛瑞林组的存活期与媒介物组相比显著延长,且平均而言比媒介物组的存活天数长 17.6%。

[0197] [表 15]

	媒介物组	人葛瑞林组
存活期 (天)	153±7 (9)	180±11 (9)*

数值用平均值 ±SE (病例的数目) 来指示

*: P < 0.05,相对于媒介物组 (对数秩检验)。

[0198] 如上所示,与媒介物组相比,人葛瑞林显著延长了 $SOD1^{G93A}$小鼠的存活期,即使当它的施用从 16 周龄开始,此时 $SOD1^{G93A}$小鼠表现出显著的肌无力且处于 ALS 的病理学进展的更晚期。

[0199] 如在实施例 2 中所示,利鲁唑(ALS 的现有治疗剂)通过从 10 周龄施用没有延长存活期。这些结果证实,与 ALS 的现有治疗剂相比,即使从 16 周龄施用给 $SOD1^{G93A}$小鼠的葛瑞林也表现出显著延长它们的存活期的惊人作用。

[0200] 因而,发现葛瑞林会显著地抑制 ALS 的病理学进展且具有治疗效果。

[0201] <实施例 9>生长激素促分泌素受体激动剂 GHRP-6和阿那瑞林对 $SOD1^{G93A}$小鼠的影响:通过重复皮下施用对存活期的影响

在实施例 5 中,证实了从 10 周龄重复皮下施用给 $SOD1^{G93A}$小鼠的人葛瑞林会延长它们的存活期。

[0202] 在该实施例中,检查了生长激素促分泌素受体激动剂 GHRP-6 和阿那瑞林对存活

期的影响，其中各自重复皮下施用给 10- 周龄 $SOD1^{G93A}$ 小鼠。

[0203] 1. 材料和方法

在该实验中，使用 10- 周龄 $SOD1^{G93A}$ 小鼠，将它们分成 3 组：媒介物组、GHRP-6 组和阿那瑞林组。从 10 周龄给它们每天 2 次皮下施用 GHRP-6 (1 mg/kg)、阿那瑞林 (1 mg/kg) 或媒介物 (5% 甘露醇溶液）直到死亡。在施用开始之前和施用 5 周以后，测量它们的体重和饲料重量，以计算体重和食物摄入的变化量。还分析每个个体的存活期。

[0204] 2. 结果

施用 5 周以后每个组的平均体重和食物摄入的变化量显示在表 16 中。

[0205] 与媒介物组相比，GHRP-6 组在施用 5 周以后体重和食物摄入的变化量显著增加。与媒介物组相比，阿那瑞林组在施用 5 周以后体重的变化量显著增加，且阿那瑞林组中的食物摄入也表现出递增趋势。

[0206] [表 16]

	媒介物组	GHRP-6 组	阿那瑞林组
体重变化量 (g)	0.0±0.4 (31)	1.9±0.2 (30)**	0.9±0.2 (31)*
食物摄入 (g)	132.0±2.6 (31)	142.7±2.1 (30)**	139.5±2.5 (31)†

数值用平均值 ±SE（病例的数目）来指示

†, *, **: $P < 0.1$, $P < 0.05$, $P < 0.01$，相对于媒介物组 (Dunnett 氏多重比较检验）。

[0207] 接着，每个组的平均存活期显示在表 17 中。

[0208] GHRP-6 组和阿那瑞林组的存活期与媒介物组相比显著延长。

[0209] [表 17]

	媒介物组	GHRP-6 组	阿那瑞林组
存活期（天）	130±2 (31)	138±2 (30)*	136±2 (31)*

数值用平均值 ±SE（病例的数目）来指示

*: $P < 0.05$；相对于媒介物组（威尔科克森检验）。

[0210] 这些结果证实，与在人葛瑞林中一样，重复皮下施用给 $SOD1^{G93A}$ 小鼠的生长激素促分泌素受体激动剂 GHRP-6 和阿那瑞林会抑制 ALS 的病理学进展。

[0211] 工业适用性

包含生长激素促分泌素受体激动剂或其药学上可接受的盐的药物组合物可以在具有肌萎缩性侧索硬化和不严重吞咽困难的个体中充当肌萎缩性侧索硬化的治疗剂。

[0212] 序列表的自由正文

SEQ ID NO: 1 - 人葛瑞林的氨基酸序列

SEQ ID NO: 2 - 人葛瑞林的氨基酸序列（剪接变体，27 个氨基酸）。

序列表

<110> Daiichi Sankyo Company, Limited

<120> 用于肌萎缩性侧索硬化的治疗剂

<130> DSPCT-FP1341

<150>? JP 2012-234300
<151>? 2012-10-24

<160> 2

<210> 1
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(28)
<223> 生长激素促分泌素的人内源性肽的氨基酸序列

<400> 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 2
<211> 27
<212> PRT
<213> 智人

<220>

<221> 肽

<222> (1)..(27)

<223> 生长激素促分泌素的人内源性肽(27 个氨基酸)的氨基酸序列

<400> 2

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25