



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년05월21일
(11) 등록번호 10-0827973
(24) 등록일자 2008년04월30일

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7000758

(22) 출원일자 2002년01월18일

심사청구일자 2005년07월22일

번역문제출일자 2002년01월18일

(65) 공개번호 10-2002-0026543

(43) 공개일자 2002년04월10일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2000/004907

국제출원일자 2000년07월24일

(87) 국제공개번호 WO 2001/07475

국제공개일자 2001년02월01일

(30) 우선권주장

JP-P-1999-00210002 1999년07월23일 일본(JP)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO 98/42840 A1(01 October 1998)

전체 청구항 수 : 총 48 항

심사관 : 박정웅

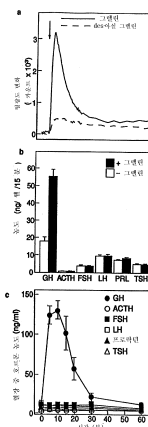
(54) 신규 펩티드

(57) 요약

성장호르몬의 분비를 유도하는 신규 펩티드계 화합물을 제공한다.

세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖고, 하나 이상의 아미노산이 수식 아미노산 및/또는 비아미노산 화합물에 의해 치환된 것을 특징으로 하는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

대표도 - 도5



(72) 발명자

호소다 히로시

일본 오사카후 도요나카시 신센리키타마치 3쵸메 10-4

마쯔오 히사유키

일본 효고켄 고베시 히가시나다쿠 니시오카모토 6 쵸메4-24 506고

미나미따케 요시하루

일본 군마켄 오라군 지요다마치 오아자 아카이와 아자구라카케 2716반치 1 아스비오파마 가부시기가 이샤바이오세이야쿠센터 나이

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 안티구와바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 도미니카, 알제리, 에스토니아, 그라나다, 그루지야, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬랜드, 일본, 키르키즈스탄, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 리투아니아, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 루마니아, 러시아, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 기니 비사우, 토고

(30) 우선권주장

JP-P-1999-00338841 1999년11월29일 일본(JP)
JP-P-2000-00126623 2000년04월26일 일본(JP)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 (a), (b), (c)를 특징으로 하는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 :

(a) 아미노 말단으로부터의 2번째 또는 3번째 아미노산 잔기가, 상기 아미노산의 α 탄소에 탄소수 1 내지 10 인 포화 또는 불포화 알킬렌기를 통하거나 통하지 않고, 에스테르, 에테르, 티오에테르, 티오에스테르, 아마이드, 카르바미드, 티오카르바미드 또는 디설피드 결합을 통하여 탄소수 1 내지 35 인 포화 또는 불포화 알킬 사슬이 도입된 수식된 아미노산이거나, 또는 상기 아미노산의 α 탄소에 탄소수 1 내지 35 인 포화 또는 불포화 알킬 사슬이 도입된 수식된 아미노산이고,

(b) 서열번호 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30 및 31 에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 하나의 아미노산 서열, 또는 하나 이상의 아미노산이 결실되거나, 8번째 위치의 글루탐산이 라이신으로 치환되거나, 8번째 위치의 글루탐산이 아르기닌으로 치환되거나, 6번째 위치의 세린이 라이신으로 치환되거나, 5번째 위치의 류신이 라이신, 메틸류신 또는 D-류신으로 치환되거나, 7번째 위치의 프롤린이 라이신으로 치환되거나, 상기 결실 및 치환 중 둘 이상이 일어난 그의 아미노산 서열로서, 아미노 말단으로부터 2번째 또는 3번째 아미노산이 상기 수식된 아미노산으로 치환되고, 아미노 말단으로부터 2번째 또는 3번째 아미노산이 상기 수식된 아미노산에 의해 치환된 것을 제외하고는 상기 결실 또는 치환이 상기 아미노산 서열의 아미노 말단으로부터 1번째 내지 4번째 아미노산에서 일어나지 않는 아미노산 서열로 이루어지고,

(c) 세포내 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 지님.

청구항 2

하기 (a), (b), (c)를 특징으로 하는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염:

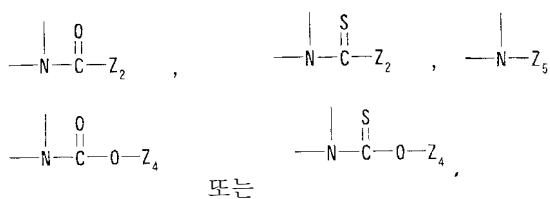
(a) 아미노 말단으로부터의 2번째 또는 3번째 아미노산 잔기가 하기 (i), (ii), (iii), (iv)로부터 선택된 수식된 아미노산임 :

(i) 측쇄 히드록시기가 $-OCO-Z_1$, $-OCS-Z_1$ 또는 $-O-Z_3$ 으로 나타나는 기로 변환된 세린, 트레오닌, 티로신 또는 옥시프롤린, 또는

(ii) 측쇄 메르캅토기가 $-SCO-Z_1$, $-SCS-Z_1$, $-S-Z_3$ 또는 $-S-S-Z_8$ 으로 변환된 시스테인, 또는

(iii) 측쇄 아미노기가 $-NH-CO-Z_2$, $-NH-CS-Z_2$, $-N(Z_5)(Z_6)$, $-NH-CO-NH-Z_7$ 또는 $-NH-CS-NH-Z_7$ 로 변환된 리신 또는 아르기닌, 또는

(iv) 측쇄 이미노기가 하기 화학식으로 나타내어진 기로 변환된 히스티딘 또는 트립토판:



[여기서 Z_1 은 수소 또는 탄소수 1 내지 50 인 포화 또는 불포화 알킬사슬이며, Z_2 , Z_3 , Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 및 Z_8 은 동일하거나 상이하며 H 또는 탄소수 1 내지 10 인 포화 또는 불포화 알킬 사슬이다];

(b) 서열번호 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30 및 31 에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 하나의 아미노산 서열, 또는 하나 이상의 아미노산이 결실되거나, 8번째 위치의 글루탐산이 라이신으로 치환되거나, 8번째 위치의 글루탐산이 아르기닌으로 치환되거나, 6번째 위치의 세린이 라이신으로 치환되거나, 5번째 위치의 류신이 라이신, 메틸류신 또는 D-류신으로 치환되거나, 7번째 위치의 프롤린이 라이신으로 치환되거나, 상기 결실 및 치환 중 둘 이상이 일어난 그의 아미노산 서열로서, 아미노 말단으로부터 2번째 또는 3번째 아미노산이 상기 수식된 아미노산으로 치환되고, 아미노 말단으로부터 2번째 또는 3번째 아미노산이 상기 수식된 아미노산에 의해 치환된 것을 제외하고는 상기 결실 또는 치환이 상기 아미노산 서

열의 아미노 말단으로부터 1번째 내지 4번째 아미노산에서 일어나지 않는 아미노산 서열로 이루어지고,

(c) 세포내 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 지님.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 수식된 아미노산이

i) 측쇄 히드록시기가 $-OCO-Z_1$, $-OCS-Z_1$ 또는 $-O-Z_3$ 에 의해 나타내어지는 기로 변환되는 세린, 또는

ii) 측쇄 메르캅토기가 $-SCO-Z_1$, $-SCS-Z_1$, $-S-Z_3$ 또는 $-S-S-Z_8$ 로 변환되는 시스테인 (여기서, Z_1 은 H 또는 탄소수 1 내지 50인 포화 또는 불포화 알킬 사슬이고, Z_3 및 Z_8 은 동일하거나 상이하며 H 또는 탄소수 1 내지 10인 포화 또는 불포화 알킬 사슬을 나타낸다)인 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 수식된 아미노산이, 측쇄 히드록시기가 $-OCO-Z_1$ (여기서, Z_1 은 H 또는 탄소수 1 내지 30인 포화 또는 불포화 알킬 사슬이다)로 나타나는 기로 변환되는 세린, 트레오닌, 트립신, 또는 옥시프롤린인 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 수식된 아미노산이, 지방산이 측쇄 히드록시기에 에스테르 결합하거나, 메르캅토기에 티오에스테르 결합하는 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 탄소수 2 내지 35인 지방산을 갖는 펩티드계 화합물, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 탄소수 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 또는 18 인 지방산에서 선택된 지방산을 갖는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 지방산이 옥탄산, 그의 모노엔 지방산 및 그의 폴리엔 지방산에서 선택된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 지방산이 데칸산, 그의 모노엔 지방산, 그의 폴리엔 지방산에서 선택된 지방산인 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 서열번호 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30 및 31에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 이루어지고, 여기서 상기 아미노산 서열에서의 아미노 말단으로부터 3번째 위치한 세린 또는 트레오닌의 측쇄 히드록실기가 탄소수 2 내지 35 인 아실기로 아실화된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 서열 번호 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 22, 25, 26, 27, 29, 30 또는 31 에 기재된 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열 내 아미노-말단으로부터 3번째 위치한 세린이 트레오닌으로 치환되고, 아미노 말단으로부터 3번째 위치한 세린 또는 트레오닌의 측쇄 히드록시기가 탄소수 2 내지 35 인 아실기로 아실화된 그의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 12

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 서열 번호 3 또는 11에 기재된 아미노산 서열(여기서, 아미노 말단으로부터 3 번째 위치한 세린의 측쇄 히드록시기가 옥타노일로 아실화함)로 이루어지는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열(여기서, 아미노 말단으로부터 3 번째 위치한 세린의 측쇄 히드록시기가 n-옥타노일로 아실화함)로 이루어지는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 14

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 아미노 말단으로부터 1 번째 내지 4 번째의 아미노산 서열에 상당하는 부분이 하기의 식으로 치환되며, 세포내 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 지닌 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염:

A-B-C-D-

[식 중,

A-B- 는 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CO}-$, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-$, $\text{NH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-$ 또는 $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CO}-$ 이며,

C 는 세린, 호모세린, 트레오닌, 시스테인, 호모시스테인, 아스파라긴산, 글루타민산, 아디프산, 라이신 또는 오르니틴이며, 그 중 임의의 것은 아실기, 알킬기, 또는 아랄킬기에 의해 수식되는 관능기를 가지고,

D 는 (a) 소수성 잔기를 가진 아미노산 또는 (b) 염기성 측쇄를 가진 아미노산이다].

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 성장 호르몬의 분비를 유도하는 활성을 추가적으로 갖는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 19

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 카르복실-말단에 결합된 염기성 아미노산을 갖는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 20

제 14 항에 있어서, 성장 호르몬의 분비를 유도하는 활성을 추가적으로 갖는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 21

제 14 항에 있어서, 카르복실-말단에 결합된 염기성 아미노산을 갖는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 22

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 아미노 말단이 포화 또는 불포화 알킬기 또는 탄소수 1 이상의 아실기로 수식되거나, 카르복실말단의 카르복실기 내 히드록시기가 OZ 이거나 또는 NR₂R₃(여기서, Z는 약학적으로 허용되는 양이온 또는 저급 분지쇄 또는 직쇄 알킬기이고, R₂ 및 R₃은 동일하거나 상이한, H 또는 저급 분지쇄 또는 직쇄 알킬기를 나타낸다)에 의해 치환되거나, 상기 수식 및 치환이 모두 일어난 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 펩티드계 화합물의 카르복실-말단 아미드 유도체로 도입된 염기성기를 갖는 펩티드계 화합물.

청구항 24

제 1 항 또는 제 2 항에서 정의된 펩티드계 화합물에 대한 항체.

청구항 25

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물에 대한 항체를 이용하여, 제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물을 검출하는 제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물의 어레이 방법.

청구항 26

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물에 대한 항체를 사용하여 제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물을 검출하는 제 1 항 또는 제 2 항에 기재된 펩티드계 화합물의 검출용 키트.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, 심장질환의 치료를 위한 의약 조성물.

청구항 31

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, 식욕증진을 위한 의약 조성물.

청구항 32

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, 위기능질환의 치료를 위한 의약 조성물.

청구항 33

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, 장관점막 보호, 또는 정맥영양시 소장점막 장애 예방을 위한 의약 조성물.

청구항 34

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, 골다공증치료를 위한 의약 조성물.

청구항 35

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, 만성질환에 의한 악액질 감소를 위한 의약 조성물.

청구항 36

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, 폐 기능부전 치료를 위한 의약 조성물.

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 포함하는, 심장질환 치료를 위한 유전자 치료용 의약 조성물.

청구항 42

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 포함하는, 식욕증진을 위한 유전자 치료용 의약 조성물.

청구항 43

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 포함하는, 위기능질환의 치료를 위한 유전자 치료용 의약 조성물.

청구항 44

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 포함하는, 장관점막 보호, 또는 정맥영양시 소장점막 장애 예방을 위한 유전자 치료용 의약 조성물.

청구항 45

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 포함하는, 골다공증 치료를 위한 유전자 치료용 의약 조성물.

청구항 46

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 포함하는, 만성 질환에 의한 악액질 감소를 위한 유전자 치료용 의약 조성물.

청구항 47

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 포함하는, 폐 기능 부전 치료를 위한 유전자 치료용 의약 조성물.

청구항 48

서열 번호 1-4, 8-13, 16-19, 22, 23 및 25-35 에서 선택된 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열의 아미노 말단으로부터 1번째부터 4번째 아미노산을 제외하고, 하나 이상의 아미노산이 결실되거나, 8번째 위치의 글루탐산이 라이신으로 치환되거나, 8번째 위치의 글루탐산이 아르기닌으로 치환되거나, 6번째 위치의 세린이 라이신으로 치환되거나, 5번째 위치의 류신이 라이신, 메틸류신 또는 D-류신으로 치환되거나, 7번째 위치의 프롤린이 라이신으로 치환되거나, 상기 결실 및 치환 중 둘 이상이 일어난 아미노산 서열을 코딩하는 DNA.

청구항 49

DNA의 인식서열(nucleotide sequence)이 서열번호 6, 7, 14, 15, 20, 21, 24, 36, 37, 38 및 39에 기재된 인식서열로 이루어진 균으로부터 선택된 하나의 인식서열인 DNA.

청구항 50

제 49 항에 있어서, 인식서열이 아미노산만을 코딩하는 인식서열로 제한되는 DNA.

청구항 51

제 48 항에 정의된 DNA를 포함하는 벡터.

청구항 52

제 51 항에 정의된 벡터를 포함하는 세포.

청구항 53

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법으로서, 제 51 항에 정의된 벡터를 상기 펩티드 내 하나 이상의 아미노산의 측쇄를 수식할 수 있는 숙주 세포에 투입하여 숙주 세포를 형질전환하고, 수득된 형질전환세포를 배양하여 배양물로부터 목적하는 제 1 항 또는 제 2 항에 기재된 펩티드계 화합물을 채취하는 것을 포함하는 제조 방법.

청구항 54

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법으로서, 제 51 항에 정의된 벡터를 숙주세포로 투입하여 숙주세포를 형질전환하고, 수득된 형질전환 세포를 배양하여 배양물로부터 목적하는 펩티드계 화합물을 채취한 후, 그의 임의의 아미노산을 수식하는 것을 포함하는 제조 방법.

청구항 55

제 1 항 또는 제 2 항에 정의된 펩티드계 화합물을 제조하는 방법으로서, 수식된 아미노산을 갖고 화학적 합성에 의해 수득된 아미노-말단 펩티드의 활성화된 에스테르를, 유전자 재조합 기술로 수득된 카르복실 말단 펩티드에 결합시키는 것을 포함하는 제조 방법.

청구항 56

제 5 항에 정의된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법으로서, 지방산을 펩티드계 화합물 내 아미노산의 측쇄의 수산기에 에스테르 결합시키거나 또는 메르캅토기에 티오에스테르 결합시키는 활성을 갖는 세포를 사용하는 것을 포함하는 제조 방법.

청구항 57

제 56 항에 있어서, 서열번호 8에 기재된 아미노산 서열 내 세린의 측쇄 수산기에 지방산을 에스테르 결합시키는 세린 아실화 활성을 갖는 세포를 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 58

제 56 항에 있어서, 서열번호 28에 기재된 아미노산 서열 내 트레오닌의 측쇄 수산기에 지방산을 에스테르결합시키는 트레오닌 아실화 활성을 갖는 세포를 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 펩티드 중의 아미노산이 수식되어 있는 것을 특징으로 하는, 세포내 칼슘 농도를 상승시키는 작용 또는 성장호르몬의 분비 유도 활성을 갖는 신규 펩티드에 관한 것이다. 본원 발명은 또한 해당 신규 펩티드의 취득 방법 및 제조 방법, 이 펩티드 및 이 펩티드 전구체를 코딩하는 유전자, 그리고 해당 유전자를 사용한 이 펩티드 및 이 펩티드 전구체의 제조 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 본원 발명에 의해 개시된 신규 수식 펩티드의 구조 유사체로, 성장호르몬 분비 유도 화합물의 리셉터에 결합하여 세포내 칼슘 농도를 상승시키는 작용 또는 성장호르몬의 분비 유도 활성을 갖는 펩티드 유도체 및 그 제조 방법에 관한 것이다. 본원 발명은 또한 이 펩티드 또는 이 펩티드 유도체를 유효 성분으로 하는 의약품 조성물, 동물용 성장촉진제, 이 펩티드의 항체 또는 그 이용 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 성장호르몬 (growth hormone, 이하 간단히 GH 라 함) 은 하수체 전엽에서 합성되는 단백질 호르몬으로, 골의 성장 및 지방세포나 연골세포의 분화를 간접적으로 촉진시키며, 그 분비는 성장호르몬 방출호르몬 (GHRH ; growth hormone-releasing hormone) 으로 촉진되고, 소마토스타틴 (somatostatin) 으로 저해된다 [J. Kendrew, et al., Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), P.462]. GH 는 단순히 성장을 촉진시킬 뿐만 아니라, 각종 조직에서의 단백질 합성의 촉진, 저장 지방 이동의 자극 및 근육내의 글리코겐 함량 상승 등의 작용에도 있어서, GH 분비의 저하는 소인증을, 과잉 분비는 거인증 또는 말단비대증을 야기시킨다 [야스기 류이찌 외저, 이와나미 생물학사전 제 4 판 (이와나미쇼텐, 도쿄, 1997), 757면].

- <3> 인간 GH 가 유전자 재조합 기술에 의해 생산되게 된 이후, GH 는 상기 소인증의 치료 [J. O. Jorgensen, Endocr. Rev. 12, 189 (1991)] 뿐만 아니라, 다른 질환의 치료에도 사용되어 여러가지 효과가 발견되었다 [J. O. Jorgensen, et al., Horm. Res. 42, 235 (1994)]. 예컨대, 정상인에서의 골아세포 및 골 재구성성의 활성화 [K. Brixen, et al., Miner. Res. 5, 609 (1990)], GH 결핍증 성인에서의 근육량 및 근력의 증강 [R. C. Cuneo, et al., J. Appl. Physiol. 70, 688 (1991)], GH 결핍증 성인에서의 운동 능력의 향상 [R. C. Cuneo, et al., J. Appl. Physiol. 70, 695 (1991)], 소아의 중도 화상 치유 [D. N. Herndon, et al., Ann. Surg. 212, 424 (1990)], 배란 유발에 있어서의 고난도트로핀과의 병용 [R. Homburg, et al., Clin. Endocrinol. (Oxf). 32, 781 (1990)], 프레도니손 투여에 의한 단백질 대사 이상의 예방 [F. F. Horber and M. W. Haymond, J. Clin. Invest. 86, 265 (1990)], 중도 면역 부전증에 있어서의 T 세포 「교육」의 촉진 [W. J. Murphy, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 4481(1992)], 노인성 체중감소, 지방 조직 확대 및 피부 위축을 억제하는 효과 [D. Rudman, et al., N. Engl. J. Med. 323, 1 (1990)] 등이 있다.
- <4> 소아 성장 촉진 및 성인의 GH 결핍에 따른 대사나 기능 결손의 정상화에 재조합 GH 의 투여가 효과적이기는 하지만, 용량 한정적인 부작용이 있는 점, 경구 투여가 불가능한 점 및 비용면에서 문제가 있다 [B. A. Lefker, et al., in Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), p.107-p.108]. 대부분의 성인 환자는 과잉 나트륨과 체액 저류(貯留)에 의한 것으로 생각되는 관절통이나 수근관증후군과 같은 부작용 때문에 GH 투여를 계속할 수 없다 [E. Corpas, et al., Endocr. Rev. 14, 20 (1993)]. 이들 부작용은 GH 투여에 의한 호르몬 분비의 비생리적인 패턴과 관계가 있어, GH 투여로는 정상 GH 분비의 박동성(pulsatility)을 모방할 수 없다 [B. A. Lefker, et al., in Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), p.107-p.108].
- <5> 생체내에서의 GH 분비의 박동성은 기본적으로는 시상하부 유래의 2 개의 제어인자의 상호작용에 의해 확립된다, 즉 GHRH 와 소마토스타틴이 하수체에 작용하여 GH 분비를 제어하고 있다 [G. S. Tannenbaum and N. Ling, Endocrinology 115, 1952 (1984), R. G. Clark and I. C. Robinson, Endocrinology 122, 2675 (1988)]. 정상 GH 분비의 패턴은 주야가 달라, 야간에 더 많은 GH 가 더욱 빈접하게 방출된다. GH 방출 펄스의 진폭은 여러가지의 스테로이드 호르몬, 신경 전달 물질, GH 와 인슐린양 성장인자에 의한 피드백, 영양상태, 수면 및 운동에 따라 다시 조절된다 [J. S. Stobl and M. J. Thomas, Pharmacol. Rev. 46, 1 (1994)].
- <6> 상술한 GH 투여에 따른 부작용을 극복하기 위해, GH 분비 유도 활성을 갖는 화합물이 많이 합성되어 GH 분비 유도 물질(GHS ; growth hormone secretagogue)로서 그 구조 활성 상관, 약리학, 임상 응용이 정력적으로 연구되었다. 먼저, GHRP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) 등의 펩티드가 합성되어, GH 의 결손 내지는 저하에 기인하는 치료약으로서 개발되었다 [C. Y. Bowers, et al., Endocrinology 114, 1537-1545 (1984)]. 그러나 이들 펩티드 화합물은 정맥주사로만 효과를 발휘할 수 있으므로, 경구투여할 수 있는 저분자량의 비펩티드계 화합물이 개발되어 [R. G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)], 제 2 상 임상시험의 단계로까지 진행된 것도 있다 [A. A. Patchett, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 7001-7005 (1995)].
- <7> 세포에 있어서, 리셉터의 시그널 수용부터 기능 발현에 이르기까지의 일련의 정보 전달을 시그널 전달(signal transduction)이라고 하는데, G 단백질과 공역된 시그널 전달계는 이하와 같은 기구로 진행된다 [야스기 류이치 외편, 이와나미 생물학사전 제 4 판 (이와나미쇼텐, 도쿄, 1997), 555-556 면]. 이 G 단백질 공역계는 세포막 7 회 관통형 리셉터를 갖고, cAMP 를 제2 메신저로서 생산하는 cAMP 계와 이노시톨-1,4,5-삼인산(IP3)이나 디아실글리세롤(DG) 이노시톨 인지질 정보전달계로 나누어진다. cAMP 는 cAMP 의존성 키나아제(A 키나아제)를 활성화시키고, 기능 단백질의 세린이나 트레오닌 잔기의 인산화를 일으켜 활성을 수식한다. 또한 IP3 는 소포체 상의 IP3 수용체와 결합하여 칼슘이온의 유리를 촉진시키고, DG 는 C 키나아제를 활성화시켜 호르몬 등의 작용 발현을 촉진시킨다.
- <8> IP3 나 DG 를 제2 메신저로 하는 시그널 전달계에서, 세포내 칼슘 이온 농도가 상승되는 기구는 이하와 같다 [J. Kendrew, et al., Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p.136-137]. 리셉터에 리간드가 결합하면, G 단백질을 통하여 포스포리파아제 C 가 활성화되어, PIP2 에서 IP3 가 생성된다. IP3 은 세포내 과립인 ER 등의 소포체에 저장되어 있는 칼슘이온을 세포질로 방출시켜, 세포질내의 칼슘이온 농도가 상승된다. IP3 또는 칼슘이온이 세포질에 더 존재하면, 칼슘은 다시 소포체에 들어가 세포질내의 칼슘이온 농도는 저하된다. 즉 리셉터로의 리간드 결합은 세포질내의 칼슘 이

온 농도의 일과성 상승을 가져온다.

<9> GHS 는 GHRH 에 의한 GH 의 분비 및 세포내 cAMP 레벨의 상승에 협조적으로 작용하는 점 [K. Cheng, et al., Endocrinology 124, 2791-2798 (1989)], 및 GHRH 의 리셉터로의 결합이 cAMP 를 세컨드 메신저로서 생산하는 것에 비해 GHS 는 세포내 칼슘 이온 농도의 상승을 가져온다는 점에서, GHS 의 작용기서가 GHRH 의 그것과는 다르다는 것이 시사되며 [J. Herrington and B. Hille, Endocrinology 135, 1100-1108 (1994).], GHS 는 GHRH 가 결합하는 GHRH 리셉터와는 다른 리셉터에 결합한다는 것이 상정되었다. 실제로 GHS 가 결합하는 리셉터 유전자가 클로닝되어, 노던 해석 결과로부터 GHS 리셉터 (GHS-R) 가 시상하부 및 뇌하수체에서 발현되고 있다는 점, 및 돼지와 인간 유래 GHS-R 의 아미노산 서열이 90% 이상의 동일성을 나타낸다는 점을 알 수 있었다 [A. D. Howard, et al., Science 273, 974-977(1996)]. 그러나 GHS-R 에 결합하는 내재성 리간드가 단리되어 있지 않아, 이 GHS-R 은 리간드가 불명확한 오편(orphan) 리셉터이었다.

<10> 단백질의 아미노 말단 또는 단백질을 구성하는 아미노산 잔기의 측쇄에 미리스틴산, 젤라닐산, 팔미토일산, 또는 파르네실산 등의 지방산이 결합되는 경우가 있으나, 이들 지방산의 역할은 이들 지방산 수식 단백질을 세포막에 앵커링 (anchoring) 시키는 것에 있다 [J. Kendrew, et al., Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p.616]. 이들 지방산 수식 단백질에 있어서, 지방산은 시스테인 잔기에 S-아실결합으로 결합되어 있고, 본원 발명에 의해 개시되는 내재성 GHS 와 같이 세린 잔기에 O-아실결합으로 지방산이 결합된 아미노산, 이 지방산 수식 아미노산을 함유하는 단백질 및 펩티드는 전혀 알려지지 않았다. 또 지방산으로 수식된 아미노산을 함유하는 펩티드가 어떤 리셉터의 리간드로서 기능한다는 것도 알려지지 않았다.

발명의 상세한 설명

- <11> 본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 용어를 다음과 같이 정의한다.
- <12> 펩티드란 복수의 아미노산이 펩티드 결합으로 이어진 화합물을 말한다. 여기에서 아미노산 (또는 아미노산 잔기라고도 함) 이란, 아미노산의 일반식 ; $\text{NH}_2\text{-CH(R')-COOH}$ 에 있어서, R' 가 천연에 존재하는 치환기를 갖는 천연 아미노산 외에, 그 D,L-광학이성체 등을 포함한다.
- <13> 천연 아미노산이 수식 아미노산 (또는 수식 아미노산 잔기라고 함) 으로 치환되어 있는 경우도 있다. 수식 아미노산은, 상기 일반식의 치환기 R' 가 추가로 수식된 아미노산 및 그 D,L-광학이성체 뿐만 아니라, 예컨대 상기 일반식의 치환기 R' 에 있어서, 에스테르, 에테르, 티오에스테르, 티오에테르, 아마이드, 카르바미드 또는 티오카르바미드 등을 통하거나 통하지 않고 여러가지 치환기가 결합된 비천연 아미노산도 포함한다. 또 아미노산의 아미노기에 저급 알킬기가 치환되어 있는 비천연 아미노산도 포함된다.
- <14> 펩티드 유연체란 펩티드에서 하나 이상의 아미노산이 비아미노산 화합물로 치환된 화합물을 말하고, 따라서 해당 치환 화합물의 펩티드 유연체의 하나 이상의 결합은 펩티드 결합이 아니다.
- <15> 또, 이들 펩티드 및 펩티드 유연체의 아미노 말단 및/또는 카르복실 말단이 수식된 화합물을 유도체라 하고, 펩티드, 펩티드 유연체 및 이들의 유도체를 총칭하여 펩티드계 화합물이라 한다.
- <16> 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열에서, 아미노 말단부터 적어도 4 번째 내지 10 번째까지의 아미노산 서열이란 다음에 드는 서열을 말한다.
- <17> Gly Ser Ser Phe,
- <18> Gly Ser Ser Phe Leu,
- <19> Gly Ser Ser Phe Leu Ser,
- <20> Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro,
- <21> Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu,
- <22> Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His, 또는
- <23> Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln.
- <24> GHS 리셉터에 결합하여 세포내 칼슘 이온 농도를 상승시키거나 GH 분비를 유도하는 활성을 갖는 내재성 리간드, 즉 내재성 GHS 의 발견 및 이용 방법이 요망되었다. 또한, 해당 내재성 GHS 의 구조 유사체로, 세포내 칼슘

이온 농도를 상승시키거나 GH 분비 유도 활성을 갖는 화합물이 요망되었다. 또, 해당 내재성 GHS 또는 그 구조 유사 화합물을 함유하고 GH 의 박동적 분비를 유도함으로써 GH 투여에 의한 부작용이 없는 의약 조성물, 또는 동물 성장을 촉진시키기 위한 조성물, 및 해당 조성물을 이용한 치료 방법이 요망되었다.

- <25> 본원 발명자들은 GHS 리셉터 (GHS-R) 로의 리간드의 결합이 이노시톨 인지질을 세컨드 메신저로 하여 세포내 칼슘 이온 농도의 일과성 상승을 가져오는 것에 착안하여, GHS-R 을 발현시킨 CHO 세포 (CHO-GHSR62) 에서 세포내 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 (Ca 상승 활성) 을 지표로, 각종 장기 또는 조직 추출물을 스크리닝하였다.
- 그 결과, 래트의 위 추출물에 강한 Ca 상승 활성이 있는 것을 발견하고, 해당 추출물에서 각종 크로마토그래피를 이용하여 Ca 상승 활성을 갖는 물질을 정제하여, 이 물질이 지방산으로 수식된 분자량 약 3,000 의 신규 펩티드인 것을 발견하였다. 또한 해당 신규 펩티드가 하수체 전엽세포로부터의 GH 특이적인 분비를 촉진시키는 것을 확인하고, 이 신규 펩티드가 GHS-R 의 내재성의 리간드, 즉 내재성 GH 분비 유도 물질 (내재성 GHS) 인 것을 발견하였다. 즉, 본원 발명의 첫번째는, 세포내 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 또는 GH 분비 유도 활성을 갖고, 구성 아미노산 잔기가 지방산으로 수식되어 있는 것을 특징으로 하는 내재성 GH 분비 유도 펩티드 및 이 펩티드의 취득 방법이다.
- <26> 본원 발명자들은 이 내재성 GH 분비 유도 펩티드의 구조를 상세하게 해석하여, 이 펩티드가 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드이고, 아미노 말단에서 3 번째 세린 측쇄의 수산기가 지방산으로 아실화되어 있는 것을 발견하였다. 또, 래트와 마찬가지로 강한 Ca 상승 활성이 존재하는 인간의 위 추출물 중에서도 래트 유래의 GH 분비 유도 펩티드와 동일한 방법으로 정제 및 구조 해석을 실행한 결과, 인간 유래의 내재성 GH 분비 유도 펩티드도 서열번호 3 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지고, 아미노 말단에서 3 번째 세린 측쇄의 수산기가 지방산으로 아실화되어 있는 것을 알 수 있었다. 래트 및 인간 유래의 내재성 GH 분비 유도 펩티드의 아미노산 서열을 비교하면 전체 89% 의 높은 동일성을 나타냈다.
- <27> 더욱 상세하게는, 래트와 인간에서는 아미노 말단에서 10 번째까지의 아미노산 서열 및 13 ~ 28 번째 아미노산 서열은 동일하지만, 11 번째와 12 번째 아미노산이 래트에서 라이신, 알라닌이고, 인간에서 이들이 각각 아르기닌, 발린으로 치환되어 있는 점에서 상이하다. 래트 유래의 내재성 GH 분비 유도 펩티드를 각종 프로테아제로 절단하고, 정제한 펩티드 단편의 Ca 상승 활성을 측정한 결과, 아미노 말단에서 7 번째까지의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드가 Ca 상승 활성을 갖는 최소 펩티드이었다.
- <28> 또한 화학합성한 펩티드의 Ca 상승 활성의 측정 등에서, Ca 상승 활성 발현에 필수인 코어 서열은 서열번호 8 에 기재된 4 아미노산으로 이루어지는 서열인 것을 알 수 있었다. 또 래트 이외의 인간, 돼지, 소에서 분리한 내재성 GH 분비 유도 펩티드 (28 아미노산) 및 이들의 펩티드에서 하나씩 글루타민이 결실된 내재성 GH 분비 유도 펩티드 (27 아미노산) 중 어느 것에서도, 서열번호 9 에 기재된 10 아미노산으로 이루어지는 서열이 보존되었다.
- <29> 즉 본원 발명의 두번째는, 서열번호 8 에 기재된 아미노산 서열, 바람직하게는 서열번호 1 에 기재된 아미노산 서열, 더욱 바람직하게는 서열번호 9 에 기재된 아미노산 서열을 Ca 상승 활성 발현에 필수인 코어 서열로 포함하는 지방산 수식 펩티드이다.
- <30> 또한 닭, 토끼, 개구리에서도 내재성 GH 분비 유도 펩티드가 단리되어, 서열번호 8 에 기재된 4 아미노산으로 이루어지는 코어 서열을 갖고 있는 것을 알 수 있었다.
- <31> 또한, 개구리에서도 래트의 내재성 GH 분비 유도 펩티드와 매우 유사성이 높은 내재성 GH 분비 유도 펩티드가 단리되었다.
- <32> 또한 아프리카산 발톱개구리, 옥새송어, 개에서도 내재성 GH 분비 유도 펩티드가 단리되었다. 또한 옥새송어에서는 23 아미노산으로 이루어지는 그렐린-23 과, 20 아미노산으로 이루어지는 그렐린-20 이 단리되었다.
- <33> 또한 토끼의 그렐린, 옥새송어의 그렐린-23 및 그렐린-20 의 카르복실기 말단의 아미노산은 아미드화되었다.
- <34> 또 아프리카산 발톱개구리의 내재성 GH 분비 유도 펩티드는 아미노 말단에서 3 번째 아미노산 잔기가 트레오닌이었던 점에서, 본 발명은 서열번호 8 에 기재된 아미노산 서열, 바람직하게는 서열번호 1 에 기재된 아미노산 서열, 더욱 바람직하게는 서열번호 9 에 기재된 아미노산 서열의 아미노 말단에서 3 번째 아미노산 잔기 세린이 트레오닌으로 변환된 펩티드를 Ca 상승 활성 발현에 필수 코어 서열로서 포함하는 지방산 수식 펩티드에도 관한 것이다.
- <35> 본원 발명에 의해 개시되는 GH 분비 유도 활성을 갖는 내재성 지방산 수식 펩티드 또는 상기 코어 서열로 이루어

어지는 지방산 수식 펩티드는, Ca 상승 활성을 갖는 화합물의 설계 지침도 제공한다.

- <36> 즉 본 발명의 세번째는, 해당 지방산 수식 펩티드의 구조 유사 화합물을 합성하고, 이 구조 유사 화합물의 Ca 상승 활성을 확인함으로써, Ca 상승 활성을 갖는 신규 화합물을 취득하는 것이다. 따라서 세포내 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 펩티드 또는 펩티드 유연체에 있어서, 구성 아미노산이 수식 아미노산 또는 비 아미노산 화합물로 치환된 화합물도 본원 발명에 속하는 것은 말할 필요도 없다.
- <37> 내재성 GH 분비 유도 펩티드를 코드하는 cDNA 를 통상적인 방법으로 취득하였다. 서열번호 4 및 5 에 기재된 아미노산 서열에 나타낸 바와 같이, 래트 및 인간의 cDNA 는 모두 117 아미노산으로 이루어지고, 아미노 말단에서 24 번째 내지 51 번째까지 28 아미노산의 서열이 래트 및 인간의 내재성 GH 분비 유도 펩티드의 아미노산 서열과 각각 일치하였다. 즉 내재성 GH 분비 유도 펩티드는 117 아미노산으로 이루어지는 전구체 펩티드로서 합성되고, 아미노 말단측의 23 아미노산으로 이루어지는 시그널 펩티드가 절단되고, 추가로 카르복실 말단측의 56 아미노산이 절단 제거되어 GH 분비 유도 활성을 갖는 지방산 수식 펩티드가 생성되는 것이 명확해졌다. 또, 돼지에서도 28 아미노산으로 이루어지는 내재성 GH 분비 유도 펩티드 전구체를 코드하는 cDNA 가 발견되었다.
- <38> 또한 돼지에서도 27 아미노산으로 이루어지는 내재성 GH 분비 유도 펩티드 전구체를 코드하는 cDNA 가 발견되었다.
- <39> 또 소에서도 27 아미노산으로 이루어지는 내재성 GH 분비 유도 펩티드 전구체를 코드하는 cDNA 가 부분적인 것이 발견되었다.
- <40> 그리고 또 토끼, 아프리카산 발톱개구리, 옥새송어에서도 내재성 GH 분비 유도 펩티드 전구체를 코드하는 cDNA 가 발견되었다. 또한 옥새송어에서는 23 아미노산으로 이루어지는 그렐린-23 의 전구체를 코드하는 cDNA 와, 20 아미노산으로 이루어지는 그렐린-20 의 전구체를 코드하는 cDNA 가 단리되었다.
- <41> 따라서 본원 발명의 네번째는, 내재성 GH 분비 유도 펩티드 전구체를 코드하는 cDNA 및 해당 cDNA 를 사용한 Ca 상승 활성을 갖는 지방산 수식 펩티드 또는 펩티드 유연체의 원료가 되는 펩티드의 제조 방법이다.
- <42> 래트의 위 추출물에서 28 아미노산으로 구성되는 내재성 GH 분비 유도 펩티드 (그렐린) 를 정제할 때에, 마이너 획분으로서 회수되는 펩티드를 해석한 결과, 그렐린의 13 번째 또는 14 번째 글루타민이 1 개 결실된 27 아미노산으로 이루어지는 펩티드 (그렐린-27) 를 발견하였다. 그렐린-27 은 28 아미노산으로 이루어지는 그렐린과 완전히 동일한 Ca 상승 활성 및 GH 분비 유도 활성을 갖고, 내재성 GH 분비 유도 펩티드인 점에서 이 그렐린-27 도 본 발명에 속한다.
- <43> 그렐린의 13 번째 및 14 번째 글루타민을 코드하는 염기 서열은 gca gca 이며 mRNA 의 스플라이싱 (splicing) 이 일어나는 엑손 말단의 서열로, 다른 스플라이싱이 일어남으로써 2 개의 글루타민 코돈 중 하나가 탈락된 cDNA 가 생성될 가능성이 시사되었다. 실제로 래트 및 인간의 cDNA 라이브러리를 탐색한 결과, 27 아미노산으로 이루어지는 그렐린-27 의 전구체 펩티드를 코드하는 cDNA 가 발견되었다.
- <44> 즉 래트 및 인간의 그렐린-27 펩티드는 서열번호 12 또는 13 에 기재된 116 아미노산으로 이루어지는 전구체 펩티드로서 합성되고, 아미노 말단측의 23 아미노산으로 이루어지는 시그널 펩티드가 절단되고, 추가로 카르복실 말단측의 56 아미노산이 절단 제거되어, 27 아미노산으로 이루어지는 GH 분비 유도 활성을 갖는 지방산 수식 펩티드로서 생성되는 것이 명확해졌다.
- <45> 또 돼지 및 소에서도 그렐린-27-펩티드 전구체를 코드하는 cDNA 가 발견되어, 이들 동물에서도 그렐린-27 및 그 전구체의 존재가 확인되었다.
- <46> 즉 서열번호 10, 11, 17 및 22 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 그렐린-27 펩티드, 및 서열번호 12, 13, 19 및 23 에 기재된 아미노산 서열을 갖는 그렐린-27 전구체 펩티드, 및 서열번호 14, 15, 21 및 24 에 기재된 염기 서열을 갖는 이 전구체 펩티드를 코드하는 cDNA 도 본 발명에 속하는 것은 말할 필요도 없다.
- <47> 본원 발명에서 개시된 Ca 상승 활성을 갖는 지방산 수식 펩티드 또는 Ca 상승 활성을 갖는 펩티드 유연체 등의 펩티드계 화합물은, GH 의 결손 또는 저하에 기인하는 질환을 치료하기 위한 의약 조성물도 제공한다. 이 의약 조성물은 GH 의 투여가 유효한 모든 질환에 사용할 수 있고, GH 투여에 의해 발생하는 여러가지 부작용을 극복할 수 있다. 또 이 의약 조성물은 동물의 성장촉진제 등의 동물용 약제로서도 사용할 수 있다.
- <48> 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물은 뇌실내투여 및 정맥내투여에 의해 식욕증진 작용이 있는 점에서, 식욕부

진이나 거식증을 치료하기 위한 식욕증진제로서 사용할 수 있다. 또 운동 및 위산분비를 촉진시키는 작용이 있는 점에서, 비궤양성 소화불량, 돌발성 경증 위아토니, 기능성 소화불량 및 역류성 식도염 등의 위기능성 질환의 치료제로 사용할 수도 있다. 또한 정맥내투여에 의해 골수, 십이지장 및 공장에서 세포증식 촉진작용을 확인할 수 있었던 점에서, 장관점막 보호제, 경정맥 영양시의 소장 점막 장해 예방제 및 골다공증 치료제로 사용할 수도 있다.

- <49> 본원 발명에서 개시된 Ca 상승 활성을 갖는 지방산 수식 펩티드를 항원으로 하여 제조된 항체, 해당 항체를 사용한 내재성 GH 분비 유도 펩티드의 측정 방법, 및 이 항체를 구비한 측정 키트도 본원 발명에 속한다.
- <50> 또 그렐린의 아미노 말단측 및 카르복실 말단측의 펩티드에 대한 항체를 작성하여, 전자가 3 위 세린을 수식하는 지방산을 특이적으로 인식하는 것을 이용하여, 지방산으로 수식된 그렐린과 지방산이 탈리된 그렐린을 분별 정량할 수 있는 어레이 방법, 및 그렐린의 아미노 말단측 펩티드에 대한 항체와 카르복실 말단측의 펩티드에 대한 항체를 조합한 검사 키트도 본원 발명에 속한다.
- <51> 즉 본원 발명은, 아실화 세린이란 신규 수식 아미노산을 갖는 신규 펩티드 호르몬을 제공하고, 또 해당 펩티드의 구조를 기본 골격으로 하는 Ca 상승 활성을 갖는 화합물의 신규 설계 지침도 제공한다.
- <52> 또한 본원 발명에 의해 개시된 지방산 수식 펩티드, GH 방출 호르몬 및 소마토스타틴에 의한 GH 분비 유도 기구의 해명은, 단순히 GH 분비 유도 기구에 한정하지 않고 다른 호르몬 분비 제어 기구에도 부연되는 것이 시사된다. 본원 발명은 지방산 수식 펩티드의 순환기계 및 대사계의 제어 인자로서의 다양한 기능을 개시하는 것으로, 본원 발명의 효과는 새로운 생체 제어 기구의 해명에도 영향을 준다.
- <53> 구체적으로는 본 발명은
- <54> (1) 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 펩티드의 하나 이상의 아미노산이 수식 아미노산 및/또는 비아미노산 화합물에 의해 치환되어 있는 것을 특징으로 하는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <55> (2) (a) 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열 또는 (b) 해당 서열에 있어서 아미노 말단에서 적어도 4 번째 내지 10 번째까지의 아미노산 서열을 갖고, 또한 이 아미노산 서열 이외의 부분에서 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 상기 (1) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <56> (3) 서열번호 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 및 23 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 상기 (2) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <57> (4) 서열번호 25, 26, 29, 30, 31, 32, 34 및 35 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 상기 (2) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <58> (5) 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 및 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드의 (a) 구성 아미노산이 수식되어 있거나 되어 있지 않고, 또한 (b) 하나 이상의 아미노산이 비아미노산 화합물에 의해 치환되어 있거나 되어 있지 않은 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <59> (6) 서열번호 27, 28 및 33 에 기재된 아미노산 서열을 갖는 상기 (1) 또는 (5) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <60> (7) (a) 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열 또는 (b) 해당 서열에 있어서 아미노 말단에서 적어도 4 번째 내지 10 번째까지의 아미노산 서열을 갖고, 또한 아미노 말단에서 4 번째 내지 10 번째까지의 아미노산 서열 이외의 부분에서, 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 상기 (5) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <61> (8) 서열번호 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 및 23 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 상기 (7) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <62> (9) 서열번호 25, 26, 29, 30, 31, 32, 34 및 35 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 상기 (7) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

- <63> (10) 아미노 말단의 1 번째에서 4 번째에 이르기까지의 아미노산 서열에 상당하는 부분이 하기의 식으로 나타나는 상기 (1) 또는 (5) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <64> A-B-C-D-
- <65> A ; 아미노산, 비아미노산 화합물, 또는 없음,
- <66> B ; 아미노산, 비아미노산 화합물, 또는 없음,
- <67> (단, A + B 의 분자사슬 길이가 펩티드 상당 길이임)
- <68> C 또는 D ; 동일하거나 달라도 되고, (a) 수식된 아미노산, 또는 (b) 소수성 측쇄를 갖는 아미노산을 나타낸다,
- <69> (11) C 가 아미노산의 α 탄소에, (a) 탄소수 1 이상의 알킬렌기를 통하거나 통하지 않고, 에스테르, 에테르, 티오에테르, 아미드 또는 디설피드 결합을 통하여 탄소수가 1 또는 복수의 포화 또는 불포화 알킬 사슬, 또는 (b) 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 사슬을 도입한 수식 아미노산이고, D 가 소수성 측쇄를 갖는 아미노산인 것을 특징으로 하는 상기 (10) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <70> (12) 서열번호 2, 3, 9, 10, 11, 16, 17, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30 및 31 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 서열에 있어서, 아미노 말단의 1 번째부터 4 번째에 이르기까지의 아미노산 서열에 상당하는 부분이 상기 (10) 또는 (11) 에 기재된 펩티드계 화합물인 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <71> (13) 수식된 아미노산이 아미노 말단에서 3 번째 아미노산인 상기 (1), (2), (3), (5), (7) 또는 (8) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <72> (14) 수식된 아미노산에서의 아미노산이 세린 또는 시스테인인 것을 특징으로 하는 상기 (13) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <73> (15) 아미노산의 α 탄소에, (a) 탄소수 1 이상의 알킬렌기를 통하거나 통하지 않고, 에스테르, 에테르, 티오에스테르, 티오에테르, 아미드 또는 카르바미드 결합을 통하여 탄소수가 1 또는 복수의 포화 또는 불포화 알킬 사슬, 또는 (b) H 또는 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 사슬을 도입한 수식 아미노산을 함유하는 상기 (1), (2), (3), (5), (7) 또는 (8) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <74> (16) 수식 아미노산이 아미노산의 α 탄소에, (a) 탄소수 1 이상의 알킬렌기를 통하거나 통하지 않고, 에스테르, 에테르, 티오에스테르, 티오에테르, 디설피드, 아미드, 카르바미드 또는 티오카르바미드 결합을 통하여 탄소수가 1 또는 복수의 포화 또는 불포화 알킬 사슬, 또는 (b) 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 사슬을 도입한 아미노산인 상기 (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10) 또는 (12) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <75> (17) 에스테르 결합에 의해 수식된 수식 아미노산을 갖는 상기 (1, 2, 3, 5, 7) 또는 (8) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <76> (18) 아미노산 측쇄의 관능기가 에스테르 결합을 형성함으로써 수식된 수식 아미노산을 갖는 상기 (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10), (11) 또는 (12) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <77> (19) 아미드산 측쇄의 수산기에 지방산이 에스테르 결합된 아미노산을 갖는 상기 (17) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <78> (20) 지방산이 아미노산 측쇄의 수산기에 에스테르 결합 또는 메르캅토기에 티오에스테르 결합된 아미노산을 갖는 상기 (18) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <79> (21) 탄소수가 2 내지 35 인 지방산이 결합된 아미노산을 갖는 상기 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <80> (22) 지방산이 탄소수 2 내지 35 인 상기 (20) 의 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <81> (23) 탄소수가 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 및 18 의 지방산으로 이루어지는 군에서 선택된 지방산이 결합된 아미노산을 갖는 상기 (21) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <82> (24) 지방산이 탄소수 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 및 18 의 지방산으로 이루어지는 군에서 선택된 지방산인 상

기 (22) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<83> (25) 결합된 지방산이 옥탄산 (octanoic acid), 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (23) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<84> (26) 지방산이 옥탄산 (octanoic acid), 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (24) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<85> (27) 결합된 지방산이 데칸산 (decanoic acid), 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (23) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<86> (28) 지방산이 데칸산 (decanoic acid), 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (24) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<87> (29) 상기 (1) 내지 (28) 에 기재된 펩티드계 화합물의 카르복실 말단에, 추가로 염기성 아미노산이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 펩티드계 화합물,

<88> (30) N 말단이 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 또는 아실기에 의해 수식되고 및/또는 C 말단의 카르복실기의 OH 가 OZ 또는 NR₂R₃ (Z 는 약학적으로 허용될 수 있는 양이온, 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기, R₂ 및 R₃ 은 H 및 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기로 이루어지는 군에서 선택되는 서로 동일하거나 다른 기를 나타냄) 인 것을 특징으로 하는 상기 (1), (2), (3), (5), (7), (8), (13), (14), (15), (17), (19), (21), (23), (25), (27) 항에 기재된 펩티드계 화합물,

<89> (31) 아미노 말단의 아미노기가 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬기 또는 아실기의 도입에 의해 수식되고 및/또는 카르복실 말단의 카르복실기의 OH 가 OZ 또는 NR₂R₃ (Z 는 약학적으로 허용될 수 있는 양이온, 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기를 나타내고, R₂ 및 R₃ 은 H 및 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기로 이루어지는 군에서 선택되는 서로 동일하거나 다른 기를 나타냄) 인 것을 특징으로 하는 상기 (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10), (11), (12), (16), (18), (20), (22), (24), (26), (28), (29) 항에 기재된 펩티드계 화합물,

<90> (32) 상기 (30) 또는 (31) 에 기재된 펩티드계 화합물의 카르복실 말단 아마이드 유도체에, 추가로 염기성기를 도입한 것을 특징으로 하는 펩티드계 화합물,

<91> (33) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 의약 조성물,

<92> (34) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환을 치료하기 위한 의약 조성물,

<93> (35) 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환에 관련되는 치료제와, 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 것으로 이루어지는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환을 치료하기 위한 의약 조성물,

<94> (36) 인간 이외의 동물에 적용하기 위한 상기 (33) 내지 (35) 에 기재된 의약 조성물,

<95> (37) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 의약 조성물을 투여하는 것으로 이루어지는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환의 치료 방법.

<96> (38) 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환에 관련되는 치료제와, 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 의약 조성물을 투여하는 것으로 이루어지는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환의 치료 방법,

<97> (39) 인간 이외의 동물에 적용하기 위한 상기 (37) 또는 (38) 에 기재된 치료 방법,

<98> (40) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 로서, 해당 DNA 가 코드하는 아미노산 서열 중에, 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식 서열(nucleotide sequence)을 갖는 펩티드를 코드하는 염기 서열을 갖는 해당 DNA,

<99> (41) 염기 서열이 서열번호 6, 7, 14, 15, 20, 21, 24, 36, 37, 38 및 39 에 기재된 염기 서열로 이루어지는 군에서 선택된 하나의 염기 서열인 상기 (40) 에 기재된 DNA,

<100> (42) 염기 서열이 서열번호 6, 7, 14, 15, 20, 21, 24, 36, 37, 38 및 39 에 기재된 염기 서열로 이루어지는

군에서 선택된 하나의 염기 서열 중, 아미노산을 코드하는 염기 서열인 상기 (40) 에 기재된 DNA,

- <101> (43) 상기 (40) 내지 (42) 에 기재된 DNA 를 갖는 벡터,
- <102> (44) 상기 (43) 에 기재된 벡터를 함유하는 세포,
- <103> (45) 상기 (40) 내지 (42) 에 기재된 DNA 를 갖는 벡터를 갖고, 또한 해당 DNA 에 코드되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드계 화합물이, 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식된 펩티드계 화합물로서 생산될 수 있는 세포,
- <104> (46) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물에 대한 항체,
- <105> (47) 상기 (46) 에 기재된 항체를 이용하여 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물을 검출하는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물의 어세이 방법,
- <106> (48) 상기 (46) 에 기재된 항체를 사용하여 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물을 검출하는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물의 검출용 키트,
- <107> (49) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 상기 (40) 내지 (42) 에 기재된 DNA 를 함유하는 벡터에 의해 해당 펩티드 중의 하나 이상의 아미노산 측쇄를 수식할 수 있는 숙주세포를 형질전환하고, 얻어진 형질전환세포를 배양하여 배양물에서 목적의 펩티드계 화합물을 채취하는 것으로 이루어지는 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <108> (50) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 상기 (40) 내지 (42) 에 기재된 DNA 를 함유하는 벡터에 의해 숙주세포를 형질전환하고, 얻어진 형질전환세포를 배양하여 배양물에서 목적 물질을 채취한 후, 임의의 아미노산을 화학적으로 수식하는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <109> (51) 상기 (19) 내지 (28) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 지방산을 아미노산 측쇄의 수산기에 에스테르 결합 또는 메르캡토기에 티오에스테르 결합시키는 활성을 갖는 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는 상기 (19) 내지 (28) 에 기재된 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <110> (52) 서열번호 8 에 기재된 아미노산 서열 중의 세린 측쇄의 수산기에 지방산을 에스테르 결합시키는 세린 아실화 활성을 갖는 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는 상기 (19) 내지 (28) 에 기재된 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <111> (53) 서열번호 28 에 기재된 아미노산 서열 중의 트레오닌 측쇄의 수산기에 지방산을 에스테르 결합시키는 아실화 활성을 갖는 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는 상기 (19) 내지 (28) 에 기재된 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <112> (54) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 를 함유하는 벡터를 생체내 세포에 투입하여, 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 하나 이상의 수식된 아미노산을 갖는 펩티드를 발현시킴으로써, 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환을 치료하기 위한 유전자 치료용 의약 조성물,
- <113> (55) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 를 갖는 벡터를, 해당 DNA 에 코드되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식서열을 갖는 펩티드로서 생산될 수 있는 생체내의 세포에 투입함으로써, 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드를 발현시키는 것을 특징으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환의 치료 방법,
- <114> (56) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 를 함유하는 벡터를 생체내 세포에 투입하고, 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 하나 이상의 수식된 아미노산을 갖는 펩티드를 발현시킴으로써 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환을 치료하기 위한 유전자 치료용 의약 조성물, 및
- <115> (57) 상기 (1) 내지 (32) 에 기재된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 를 갖는 벡터를, 해당 DNA 에 코드되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식서열을 갖는 펩티드로서 생산될 수 있는 생체내 세포에 투입함으로써, 성장호르몬의 분비를 유도하는

활성을 갖는 펩티드를 발현시키는 것을 특징으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환의 치료 방법,

<116> 에 관한 것이다.

<117> 또 구체적으로는 본 발명은,

<118> (1) 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 펩티드의 하나 이상의 아미노산이, 수식 아미노산 및/또는 비아미노산 화합물에 의해 치환되어 있는 것을 특징으로 하는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<119> (2) (a) 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열 또는 (b) 해당 서열에서 아미노 말단에서 적어도 4 번째 내지 10 번째까지의 아미노산 서열을 갖고, 또한 이 아미노산 서열 이외의 부분에 있어서, 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 상기 (1) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<120> (3) 서열번호 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 25 및 26 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 상기 (2) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<121> (4) 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 및 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드의 (a) 구성 아미노산이 수식되어 있거나 되어있지 않고, 또한 (b) 하나 이상의 아미노산이 비아미노산 화합물에 의해 치환되어 있거나 치환되어 있지 않은 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<122> (5) 서열번호 27 에 기재된 아미노산 서열을 갖는 상기 (1) 또는 (4) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<123> (6) (a) 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열 또는 (b) 해당 서열에서 아미노 말단에서 적어도 4 번째 내지 10 번째까지의 아미노산 서열을 갖고, 또한 아미노산 말단에서 4 번째 내지 10 번째까지의 아미노산 서열 이외의 부분에서 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 상기 (4) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<124> (7) 서열번호 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 25 및 26 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 상기 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<125> (8) 아미노 말단의 1 번째에서 4 번째에 이르기까지의 아미노산 서열에 상당하는 부분이 하기의 식으로 나타나는 상기 (1) 또는 (4) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<126> A-B-C-D-

<127> A ; 아미노산, 비아미노산 화합물 또는 없음,

<128> B ; 아미노산, 비아미노산 화합물 또는 없음,

<129> (단, A + B 의 분자사슬 길이가 펩티드 상당 길이임)

<130> C 또는 D ; 동일하거나 달라도 되고, (a) 수식된 아미노산, (b) 소수성 측쇄를 갖는 아미노산, 또는 (c) 염기성 측쇄를 갖는 아미노산을 나타낸다,

<131> (9) 서열번호 2, 3, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 22, 25 및 26 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 서열에 있어서, 아미노 말단의 1 번째에서 4 번째에 이르기까지의 아미노산 서열에 상당하는 부분이 상기 (8) 에 기재된 펩티드계 화합물인 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<132> (10) 수식 아미노산이 아미노산의 α 탄소에, (a) 탄소수 1 이상의 알킬렌기를 통하거나 통하지 않고, 에스테르, 에테르, 티오에스테르, 티오에테르, 디설피드, 아마이드, 카르바미드 또는 티오카르바미드 결합을 통하여 탄소수가 1 또는 복수의 포화 또는 불포화 알킬 사슬, 또는 (b) 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 사슬을 도입한 아미노산인 상기 (1) 내지 (9) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

<133> (11) 아미노산 측쇄의 관능기가 에스테르 결합을 형성함으로써 수식된 수식 아미노산을 갖는 상기 (1) 내지 (10) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

- <134> (12) 아미노산 측쇄의 수산기 또는 메르캅토기에 지방산이 에스테르 결합된 아미노산을 갖는 상기 (11) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <135> (13) 지방산이 탄소수 2 내지 35 인 상기 (12) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <136> (14) 지방산이 탄소수 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 및 18 의 지방산으로 이루어지는 군에서 선택된 지방산인 상기 (12) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <137> (15) 지방산이 옥탄산 (octanoic acid), 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (12) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <138> (16) 지방산이 데칸산 (decanoic acid), 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (12) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <139> (17) 아미노 말단의 아미노기가 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬기 또는 아실기의 도입에 의해 수식되고 및/또는 카르복실 말단의 카르복실기의 OH 가 OZ 또는 NR₂R₃ (Z 는 약학적으로 허용될 수 있는 양이온, 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기를 나타내고, R₂ 및 R₃ 은 H 및 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기로 이루어지는 군에서 선택되는 서로 동일하거나 다른 기를 나타냄) 인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물,
- <140> (18) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물의 카르복실 말단에, 추가로 염기성 아미노산이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 펩티드계 화합물,
- <141> (19) 상기 (1) 내지 (16), 또는 (18) 에 기재된 펩티드계 화합물의 카르복실 말단 아미드 유도체에, 추가로 염기성기를 도입한 것을 특징으로 하는 펩티드계 화합물,
- <142> (20) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 의약 조성물,
- <143> (21) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환을 치료하기 위한 의약 조성물,
- <144> (22) 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환에 관련되는 치료제와, 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 것으로 이루어지는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환을 치료하기 위한 의약 조성물,
- <145> (23) 인간 이외의 동물에 적용하기 위한 상기 (20) 내지 (22) 에 기재된 의약 조성물,
- <146> (24) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 의약 조성물을 투여하는 것으로 이루어지는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환의 치료 방법.
- <147> (25) 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환에 관련되는 치료제와, 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 의약 조성물을 투여하는 것으로 이루어지는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환의 치료 방법,
- <148> (26) 인간 이외의 동물에 적용하기 위한 상기 (24) 또는 (25) 에 기재된 치료 방법,
- <149> (27) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 로서, 해당 DNA 가 코드하는 아미노산 서열 중에, 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식 서열을 갖는 펩티드를 코드하는 염기 서열을 갖는 해당 DNA,
- <150> (28) 염기 서열이 서열번호 6, 7, 14, 15, 20, 21 및 24 에 기재된 염기 서열로 이루어지는 군에서 선택된 하나의 염기 서열인 상기 (27) 에 기재된 DNA,
- <151> (29) 염기 서열이 서열번호 6, 7, 14, 15, 20, 21 및 24 에 기재된 염기 서열로 이루어지는 군에서 선택된 하나의 염기 서열 중, 아미노산을 코드하는 염기 서열인 상기 (27) 에 기재된 DNA,
- <152> (30) 상기 (27) 내지 (29) 에 기재된 DNA 를 갖는 벡터,
- <153> (31) 상기 (30) 에 기재된 벡터를 함유하는 세포,
- <154> (32) 상기 (27) 내지 (29) 에 기재된 DNA 를 갖는 벡터를 갖고, 또한 해당 DNA 에 코드되는 아미노산 서열을 갖

는 펩티드계 화합물이, 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식된 펩티드계 화합물로서 생산될 수 있는 세포,

- <155> (33) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물에 대한 항체,
- <156> (34) 상기 (33) 에 기재된 항체를 이용하여 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물을 검출하는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물의 어세이 방법,
- <157> (35) 상기 (33) 에 기재된 항체를 사용하여 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물을 검출하는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물의 검출용 키트,
- <158> (36) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 상기 (27) 내지 (29) 에 기재된 DNA 를 함유하는 벡터에 의해 해당 펩티드 중의 하나 이상의 아미노산 측쇄를 수식할 수 있는 숙주세포를 형질전환하고, 얻어진 형질전환세포를 배양하여 배양물에서 목적의 펩티드계 화합물을 채취하는 것으로 이루어지는 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <159> (37) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 상기 (27) 내지 (29) 에 기재된 DNA 를 함유하는 벡터에 의해 숙주세포를 형질전환하고, 얻어진 형질전환세포를 배양하여 배양물에서 목적 물질을 채취한 후, 임의의 아미노산을 화학적으로 수식하는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <160> (38) 상기 (12) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 아미노산 측쇄의 수산기 또는 메르캅토기에 지방산을 에스테르 결합시키는 활성을 갖는 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는 상기 (12) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <161> (39) 서열번호 8 에 기재된 아미노산 서열 중의 세린 측쇄의 수산기에 지방산을 에스테르 결합시키는 세린 아실화 활성을 갖는 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는 상기 (12) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <162> (40) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 를 함유하는 벡터를 생체 내 세포에 투입하여, 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 하나 이상의 수식된 아미노산을 갖는 펩티드를 발현시킴으로써, 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환을 치료하기 위한 유전자 치료용 의약 조성물,
- <163> (41) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 를 갖는 벡터를, 해당 DNA 에 코드되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식서열을 갖는 펩티드로서 생산될 수 있는 생체내 세포에 투입함으로써, 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드를 발현시키는 것을 특징으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환의 치료 방법,
- <164> (42) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 를 함유하는 벡터를 생체 내 세포에 투입하고, 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 하나 이상의 수식된 아미노산을 갖는 펩티드를 발현시킴으로써 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환을 치료하기 위한 유전자 치료용 의약 조성물, 및
- <165> (43) 상기 (1) 내지 (19) 에 기재된 펩티드계 화합물의 아미노산 서열을 코드하는 DNA 를 갖는 벡터를, 해당 DNA 에 코드되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식서열을 갖는 펩티드로서 생산될 수 있는 생체내 세포에 투입함으로써, 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드를 발현시키는 것을 특징으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환의 치료 방법,
- <166> 예도 관한 것이다.
- <167> 또 구체적으로는 본 발명은,
- <168> (1) 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖고, 하나 이상의 아미노산이, 수식 아미노산 및/또는 비아미노산 화합물에 의해 치환된 것을 특징으로 하는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <169> (2) 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열 또는 해당 서열에서 아미노 말단에서 적어도 4 번째 내지 10 번째까지

의 아미노산 서열을 갖고, 또한 아미노 말단에서 4 번째 내지 10 번째까지의 아미노산 서열 이외의 부분에 있어서, 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 상기 (1) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,

- <170> (3) 서열번호 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 및 23 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 상기 (2) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <171> (4) 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 및 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖고, (a) 구성 아미노산이 수식되어 있거나 되어 있지 않은, 또한 (b) 하나 이상의 아미노산이 비아미노산 화합물에 의해 치환되어 있거나 치환되어 있지 않은 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <172> (5) 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열 또는 해당 서열에서 아미노 말단에서 적어도 4 번째 내지 10 번째까지의 아미노산 서열을 갖고, 또한 아미노산 말단에서 4 번째 내지 10 번째까지의 아미노산 서열 이외의 부분에서 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 상기 (4) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <173> (6) 서열번호 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 22 및 23 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 상기 (4) 내지 (5) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <174> (7) 수식된 아미노산이 아미노 말단에서 3 번째 아미노산인 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <175> (8) 수식된 아미노산에서의 아미노산이 세린 또는 시스테인 것을 특징으로 하는 상기 (7) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <176> (9) 아미노산의 α 탄소에, (a) 탄소수 1 이상의 알킬렌기를 통하거나 통하지 않고, 에스테르, 에테르, 티오에스테르, 티오에테르, 아미드 또는 카르바미드 결합을 통하여 탄소수가 1 또는 복수의 포화 또는 불포화 알킬사슬, 또는 (b) H 또는 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬쇄를 도입한 아미노산을 함유하는 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <177> (10) 에스테르 결합으로 수식된 수식 아미노산을 갖는 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <178> (11) 지방산이 결합된 아미노산을 갖는 상기 (10) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <179> (12) 탄소수 2 내지 35 인 지방산이 결합된 아미노산을 갖는 상기 (11) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <180> (13) 탄소수가 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 및 18 의 지방산으로 이루어지는 군에서 선택된 지방산이 결합된 아미노산을 갖는 상기 (12) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <181> (14) 결합된 지방산이 옥탄산 (octanoic acid), 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (13) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <182> (15) 결합된 지방산이 데칸산 (decanoic acid), 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (13) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <183> (16) 아미노 말단이 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬기 또는 아실기의 도입에 의해 수식되고 및/또는 카르복실 말단의 카르복실기의 OH 가 OZ 또는 NR₂R₃ (Z 는 약학적으로 허용될 수 있는 양이온, 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기, R₂ 및 R₃ 은 H 및 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기로 이루어지는 군에서 선택되는 서로 동일하거나 다른 기를 나타냄) 인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (15) 항에 기재된 펩티드계 화합물,
- <184> (17) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 의약 조성물,
- <185> (18) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환을 치료하기 위한 의약 조성물,

- <186> (19) 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환에 관련되는 치료제와, 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 것으로 이루어지는 해당 질환을 치료하기 위한 의약 조성물,
- <187> (20) 인간 이외의 동물에 적용하기 위한 상기 (17) 내지 (19) 에 기재된 의약 조성물,
- <188> (21) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 의약 조성물을 투여하는 것으로 이루어지는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환의 치료 방법.
- <189> (22) 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환에 관련되는 치료제와, 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 의약 조성물을 투여하는 것으로 이루어지는 해당 질환의 치료 방법,
- <190> (23) 인간 이외의 동물에 적용하기 위한 상기 (21) 내지 (22) 에 기재된 치료 방법,
- <191> (24) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물에 관련되는 DNA 로서, 해당 DNA 의 염기 서열 중에, 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식 서열을 갖는 펩티드를 코드하는 염기 서열을 갖는 해당 DNA,
- <192> (25) 서열번호 6, 7, 14, 15, 20, 21 및 24 에 기재된 염기 서열로 이루어지는 군에서 선택된 하나의 염기 서열인 상기 (24) 에 기재된 DNA,
- <193> (26) 염기 서열이 서열번호 6, 7, 14, 15, 20, 21 및 24 에 기재된 염기 서열로 이루어지는 군에서 선택된 하나의 염기 서열 중, 아미노산을 코드하는 부분의 서열을 갖는 상기 (24) 에 기재된 DNA,
- <194> (27) 상기 (24) 내지 (26) 에 기재된 DNA 를 갖는 벡터,
- <195> (28) 상기 (27) 에 기재된 벡터를 함유하는 세포,
- <196> (29) 상기 (24) 내지 (26) 에 기재된 DNA 를 갖는 벡터를 갖고, 또한 해당 DNA 에 코드되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드계 화합물이, 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식된 펩티드계 화합물로서 생산될 수 있는 세포,
- <197> (30) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물에 대한 항체,
- <198> (31) 상기 (30) 에 기재된 항체를 이용하여 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물을 동정하는 것을 특징으로 하는 해당 펩티드계 화합물의 어세이 방법,
- <199> (32) 상기 (30) 에 기재된 항체를 사용하여 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물을 검출하는 것을 특징으로 하는 해당 펩티드계 화합물의 검출용 키트,
- <200> (33) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 상기 (24) 내지 (26) 에 기재된 DNA 를 함유하는 벡터에 의해 해당 펩티드 중의 하나 이상의 아미노산 측쇄를 수식할 수 있는 숙주세포를 형질전환하고, 얻어진 형질전환세포를 배양하여 배양물에서 목적의 펩티드계 화합물을 채취하는 것으로 이루어지는 해당 방법,
- <201> (34) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 상기 (24) 내지 (26) 에 기재된 DNA 를 함유하는 벡터에 의해 숙주세포를 형질전환하고, 얻어진 형질전환세포를 배양하여 배양물에서 목적 물질을 채취한 후, 임의의 아미노산을 화학적으로 수식하는 것을 특징으로 하는 해당 방법,
- <202> (35) 상기 (11) 내지 (15) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 서열번호 8 에 기재된 아미노산 서열 중의 세린 잔기에 지방산이 결합된 펩티드로서 생산될 수 있는 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는 제조 방법,
- <203> (36) 상기 (4) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물을 코드하는 DNA 를 함유하는 벡터에 의해 숙주세포를 형질전환하고, 얻어진 형질전환세포를 배양하여 배양물에서 목적물질을 채취하는 것을 특징으로 하는, 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 및 성장호르몬 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <204> (37) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물을 코드하는 DNA 를 함유하는 벡터를 생체내 세포에 투입하여 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 하나 이상의 수식된 아미노산을 갖는 펩티드를 발현시킴으로써, 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환을 치료하기 위한 유전자 치료용 의약 조성물,

- <205> (38) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물을 코딩하는 DNA 를 갖는 벡터를, 해당 DNA 에 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식서열을 갖는 펩티드로서 생산될 수 있는 생체내의 세포에 투입함으로써, 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드를 발현시키는 것을 특징으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환의 치료 방법,
- <206> (39) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물을 코딩하는 DNA 를 함유하는 벡터를 생체내에 투입하여 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 하나 이상의 수식된 아미노산을 갖는 펩티드를 발현시킴으로써 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환을 치료하기 위한 유전자 치료용 의약 조성물, 및
- <207> (40) 상기 (1) 내지 (16) 에 기재된 펩티드계 화합물을 코딩하는 DNA 를 갖는 벡터를, 해당 DNA 에 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식서열을 갖는 펩티드로서 생산될 수 있는 생체내 세포에 투입함으로써, 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드를 발현시키는 것을 특징으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환의 치료 방법,
- <208> 에도 관한 것이다.
- <209> 또 구체적으로는 본 발명은,
- <210> (1) 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖고, 하나 이상의 아미노산이 수식 아미노산 및/또는 비아미노산 화합물에 의해 치환된 것을 특징으로 하는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <211> (2) 서열번호 1 에 기재된 아미노산 서열을 갖는 상기 (1) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <212> (3) 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열, 또는 해당 서열 중의 아미노 말단에서 7 번째 아미노산까지의 서열 이외의 부분에 있어서, 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 상기 (1) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <213> (4) 서열번호 3 에 기재된 아미노산 서열, 또는 해당 서열 중의 아미노 말단에서 7 번째 아미노산까지의 서열 이외의 부분에 있어서, 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 상기 (1) 에 기재된 펩티드 유도체 또는 이들 유도체 및 이들의 약학적으로 허용되는 염,
- <214> (5) 서열번호 4 에 기재된 아미노산 서열, 또는 해당 서열 중의 아미노 말단에서 28 번째 아미노산까지의 서열 이외의 부분에 있어서, 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 상기 (3) 에 기재된 펩티드계 화합물의 전구체 펩티드계 화합물,
- <215> (6) 서열번호 5 에 기재된 아미노산 서열, 또는 해당 서열 중의 아미노 말단에서 28 번째 아미노산까지의 아미노산 이외의 부분에 있어서, 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 상기 (4) 에 기재된 펩티드계 화합물의 전구체 펩티드계 화합물,
- <216> (7) 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 및 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <217> (8) 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 및 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖고, 하나 이상의 아미노산이 비아미노산 화합물에 의해 치환된 상기 (7) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <218> (9) 서열번호 1 에 기재된 아미노산 서열을 갖는 상기 (7) 내지 (8) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 이들의 유도체 및 이들의 약학적으로 허용되는 염,
- <219> (10) 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열 또는 해당 서열 중의 아미노 말단에서 7 번째 아미노산까지의 서열 이외의 부분에서 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 상기 (7) 내지 (8) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 이들의 유도체 및 이들의 약학적으로 허용되는 염,
- <220> (11) 서열번호 3 에 기재된 아미노산 서열 또는 해당 서열 중의 아미노 말단에서 7 번째 아미노산까지의 서열 이외의 부분에서 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 상기 (7) 내지 (8) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 이들의 유도체 및 이들의 약학적으로 허용되는 염,
- <221> (12) 서열번호 4 에 기재된 아미노산 서열 또는 해당 서열 중의 아미노 말단에서 28 번째 아미노산까지의 아미노산 이외의 부분에서 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 상기 (10) 에

기재된 펩티드계 화합물의 전구체 펩티드계 화합물,

- <222> (13) 서열번호 5 에 기재된 아미노산 서열 또는 해당 서열 중의 아미노 말단에서 28 번째 아미노산까지의 아미노산 이외의 부분에서 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 상기 (11) 에 기재된 펩티드계 화합물의 전구체 펩티드계 화합물,
- <223> (14) 수식된 아미노산이 아미노 말단에서 3 번째 아미노산인 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <224> (15) 수식된 아미노산에서의 아미노산이 세린 또는 시스테인 것을 특징으로 하는 상기 (14) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <225> (16) 수식 아미노산의 수식이 아미노산의 α 탄소에서, (a) 탄소수 1 이상의 알킬 사슬을 통하거나 통하지 않고, 에스테르, 에테르, 티오에스테르, 티오에테르, 아마이드 또는 카르바미드로 이루어지는 군에서 선택되는 결합 양식으로 결합하는 탄소수가 1 또는 복수의 포화 또는 불포화 알킬 사슬, 또는 (b) H 또는 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 사슬을 나타내는 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <226> (17) 에스테르 결합으로 수식된 수식 아미노산을 갖는 상기 (1) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <227> (18) 지방산이 결합된 아미노산을 갖는 상기 (17) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <228> (19) 탄소수 2 내지 35 인 지방산이 결합된 아미노산을 갖는 상기 (18) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <229> (20) 결합된 지방산이 카프릴산 (caprylic acid), 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (18) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <230> (21) 결합된 지방산이 카프린산 (capric acid), 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (18) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <231> (22) 결합된 지방산이 라우린산 (lauric acid), 또는 그 모노엔 지방산 또는 그 폴리엔 지방산인 상기 (18) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염,
- <232> (23) 아미노 말단이 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 또는 아실기의 도입에 의해 수식되고 및/또는 카르복실 말단이 OZ 또는 NR₂R₃ (Z 는 약학적으로 허용될 수 있는 양이온, 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기, R₂ 및 R₃ 은 H 및 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기로 이루어지는 군에서 선택되는 서로 동일하거나 다른 기를 나타냄) 에 의해 수식된 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (22) 항에 기재된 펩티드계 화합물,
- <233> (24) 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환을 치료하기 위한 의약 조성물,
- <234> (25) 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환에 관련되는 치료제와, 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 것으로 이루어지는 해당 질환을 치료하기 위한 의약 조성물,
- <235> (26) 인간 이외의 동물에 적용하기 위한 상기 (24) 내지 (25) 에 기재된 의약 조성물,
- <236> (27) 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 하는 의약 조성물을 투여하는 것으로 이루어지는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환의 치료 방법,
- <237> (28) 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환에 관련되는 치료제와, 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 의약 조성물을 투여하는 것으로 이루어지는 해당 질환의 치료 방법,
- <238> (29) 인간 이외의 동물에 적용하기 위한 상기 (27) 내지 (28) 에 기재된 치료 방법,
- <239> (30) 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물에 관련되는 DNA 로서, 해당 DNA 의 염기 서열 중에, 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식 서열을 갖는 펩티드를 코드하는 염기 서열을 갖는 해당 DNA,

- <240> (31) 서열번호 6 에 기재된 DNA 서열을 갖는 상기 (30) 에 기재된 cDNA (NCR 함유),
- <241> (32) 서열번호 6 에 기재된 DNA 서열의 31 번째에서 381 번째까지의 DNA 서열을 갖는 상기 (30) 에 기재된 cDNA (NCR 을 함유하지 않음),
- <242> (33) 서열번호 7 에 기재된 DNA 서열을 갖는 상기 (30) 에 기재된 cDNA (NCR 함유),
- <243> (34) 서열번호 7 에 기재된 DNA 서열의 34 번째에서 385 번째까지의 DNA 서열을 갖는 상기 (30) 에 기재된 cDNA (NCR 을 함유하지 않음),
- <244> (35) 상기 (30) 내지 (34) 에 기재된 DNA 를 갖는 벡터,
- <245> (36) 상기 (35) 에 기재된 벡터를 함유하는 세포,
- <246> (37) 상기 (30) 내지 (34) 에 기재된 DNA 를 갖는 벡터를 갖고, 또한 해당 DNA 에 코드되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드계 화합물이, 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식서열을 갖는 펩티드계 화합물로서 생산될 수 있는 세포,
- <247> (38) 상기 (1) 내지 (23) 에 기재된 펩티드계 화합물에 대한 항체,
- <248> (39) 상기 (38) 에 기재된 항체를 이용하여 상기 (1) 내지 (23) 에 기재된 펩티드계 화합물을 동정하는 것을 특징으로 하는 해당 펩티드계 화합물의 어세이 방법,
- <249> (40) 상기 (38) 에 기재된 항체를 사용하여 상기 (1) 내지 (23) 에 기재된 펩티드계 화합물을 검출하는 것을 특징으로 하는 해당 펩티드계 화합물의 검출용 키트,
- <250> (41) 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 상기 (30) 에 기재된 DNA 를 함유하는 벡터에 의해 해당 펩티드 중의 하나 이상의 아미노산 측쇄를 수식할 수 있는 숙주세포를 형질전환하고, 얻어진 형질전환세포를 배양하여 배양물에서 목적의 펩티드계 화합물을 채취하는 것으로 이루어지는 해당 방법,
- <251> (42) 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 상기 (30) 에 기재된 DNA 를 함유하는 벡터에 의해 숙주세포를 형질전환하고, 얻어진 형질전환세포를 배양하여 배양물에서 목적 물질을 채취한 후, 임의의 아미노산을 화학적으로 수식하는 것을 특징으로 하는 해당 방법,
- <252> (43) 상기 (18) 내지 (22) 에 기재된 펩티드계 화합물을 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 방법에 있어서, 서열번호 1 에 기재된 아미노산 서열 중의 세린 잔기에 지방산이 결합된 펩티드로서 생산될 수 있는 세포를 사용하는 것을 특징으로 하는 제조 방법,
- <253> (44) 상기 (7) 내지 (13) 에 기재된 펩티드계 화합물을 코드하는 DNA 를 함유하는 벡터에 의해 숙주세포를 형질전환하고, 얻어진 형질전환세포를 배양하여 배양물에서 목적물질을 채취할 수 있는 것을 특징으로 하는, 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 및 성장호르몬 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드계 화합물의 제조 방법,
- <254> (45) 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물을 코드하는 DNA 를 함유하는 벡터를 생체내 세포에 투입하여 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 하나 이상의 수식된 아미노산을 갖는 펩티드를 발현시킴으로써, 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환을 치료하기 위한 유전자 치료용 의약 조성물,
- <255> (46) 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물을 코드하는 DNA 를 갖는 벡터를, 해당 DNA 에 코드되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식서열을 갖는 펩티드로서 생산될 수 있는 생체내의 세포에 투입함으로써, 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드를 발현시키는 것을 특징으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하는 질환의 치료 방법,
- <256> (47) 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물을 코드하는 DNA 를 함유하는 벡터를 생체내에 투입하여 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 하나 이상의 수식된 아미노산을 갖는 펩티드를 발현시킴으로써 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환을 치료하기 위한 유전자 치료용 의약 조성물, 및
- <257> (48) 상기 (1) 내지 (6) 에 기재된 펩티드계 화합물을 코드하는 DNA 를 갖는 벡터를, 해당 DNA 에 코드되는 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 해당 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산이 수식될 수 있는 인식서열을 갖는 펩티드로서 생산될 수 있는 생체내 세포에 투입함으로써, 성장호르몬의 분비를 유도하는 활성을 갖는 펩티드

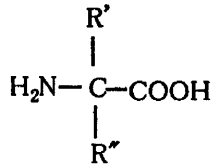
를 발현시키는 것을 특징으로 하는 성장호르몬의 결손 또는 감소에 기인하지 않는 질환의 치료 방법,

<258> 에도 관한 것이다.

<259> 본 발명에서 아미노산이란 L-아미노산, D-아미노산, α-아미노산, β-아미노산, γ-아미노산, 천연 아미노산, 합성 아미노산 등 모든 아미노산을 포함한다.

<260> 본 발명에서 수식 아미노산이란 상기 아미노산의 임의의 기가 화학수식되어 있는 아미노산을 의미한다. 특히 α-아미노산에서의 α 탄소가 화학수식되어 있는 수식 아미노산이 바람직하다. 즉, 수식 아미노산은 α-아미노산을 하기 화학식 1

화학식 1



<261> 로 나타냈을 때, R', R'' 는 H 또는 임의의 치환기이어도 되고, 요컨대 천연 아미노산을 화학수식한 것이라면 어떠한 것이어도 된다. 또한 R', R'' 중 어느 한쪽은 H 이어도 된다.

<263> R', R'' 로 표시되는 치환기로서, 천연 아미노산에 존재하는 치환기를 천연 아미노산 또는 그것에 대응하는 D-아미노산에 존재하지 않는 치환분으로 치환한 아미노산을 수식 아미노산이라 칭한다.

<264> 이와 같은 치환분으로 예컨대 천연에 존재하는 아미노산이 측쇄에 -OH, -SH, -NH- 또는 -NH₂ 를 함유하는 경우, 이들을 아실화하여 형성되는 기를 바람직한 예로 들 수 있다.

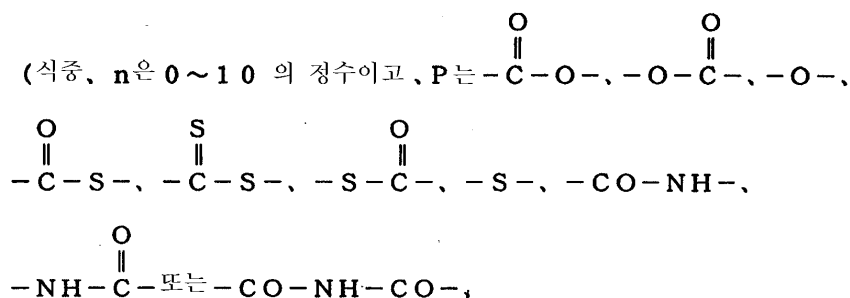
<265> 이를 위한 아실기로서는, 예컨대 유기 카르복실산, 유기 술폰산, 유기 인산 화합물에서 수산기를 제거하여 형성되는 기를 들 수 있다.

<266> 유기 카르복실산으로서의 더욱 구체적으로는 지방산을 들 수 있고, 그 탄소수는 바람직하게는 2 ~ 35, 더욱 바람직하게는 6 ~ 18, 가장 바람직하게는 8 ~ 16 이다. 그와 같은 지방산으로서, 구체적으로는 옥탄산 (바람직하게는 카프릴산), 데칸산 (바람직하게는 카프린산), 도데칸산 (바람직하게는 라우릴산), 이들의 모노엔 또는 폴리엔 지방산 등을 들 수 있다.

<267> 유기 술폰산 또는 유기 인산 화합물에 대해서도, 그 탄소수는 2 ~ 35 인 것이 바람직하다.

<268> 또한 추가로 수식 아미노산은 상기 R' 또는/및 R'' 로 나타내는 기를 예컨대 하기식

<269> -(CH₂)_n-P-Q

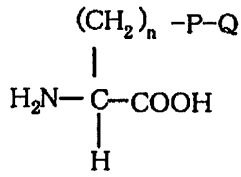


<270> 이고, Q 는 H 또는 C₁₋₃₅, 바람직하게는 C₁₋₂₀ 의 알킬이다)

<271> 로 치환한 아미노산이어도 된다. 또한 P 는 -CO- 이어도 된다.

<272> 또한 P 는 -S-S-, 또는 -NH-CS- 이어도 된다. 또한 상기 모든 -NH- 에 있어서, H 가 C₁₋₃₅ 의 포화 또는 불포화 알킬기, C₆₋₂₀ 의 아릴기, C₇₋₁₃ 의 아랄킬기로 치환되어 있어도 된다.

<274> α-아미노산을 상기 화학식 1 로 나타내는 경우에, R' 또는 R" 를 상기 $-(CH_2)_n-P-Q$ 로 치환한 수식 아미노산은 바람직한 실시 태양이다. 특히 아미노산은, 세린의 α 탄소에 상기 화학식 $-(CH_2)_n-P-Q$ 로 나타낸 치환기가 결합된 하기 화학식



<275>

<276> (식중, n, P 또는 Q 는 상기 정의와 동일하다)

<277> 으로 나타내는 수식 세린이 바람직하다.

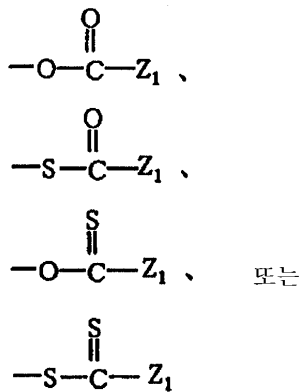
<278> 탄소수 1 이상의 알킬기를 통하거나 통하지 않고 에스테르, 에테르, 티오에스테르, 티오에테르, 아미드 또는 카르바미드로 이루어지는 군에서 결합 양식에 대해 추가 설명한다.

<279> 예컨대 아미노산이 세린, 트레오닌, 티로신 또는 옥시프롤린인 경우에는, 그 아미노산은 측쇄에 수산기를 갖는다. 아미노산이 시스테인인 경우에는, 그 아미노산은 측쇄에 메르캅토기를 갖는다. 아미노산이 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 트립토판, 프롤린 또는 옥시프롤린인 경우에는, 측쇄에 아미노기 또는 이미노기를 갖는다.

<280> 이들의 수산기, 메르캅토기, 아미노기, 이미노기는 화학수식되어 있어도 된다. 즉 수산기 또는 메르캅토기는 에테르화, 에스테르화, 티오에테르화 또는 티오에스테르화되어 있어도 된다. 이미노기는 이미노에테르화, 이미노티오에테르화, 알킬화되어 있어도 된다. 아미노기는 아미드화, 티오아미드화 또는 카르바미드화되어 있어도 된다.

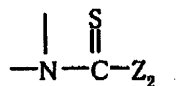
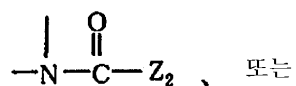
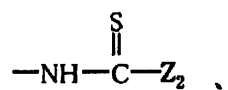
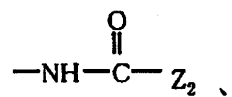
<281> 또 메르캅토기는 디설피드화되어 있어도 되고, 이미노기는 아미드화, 또는 티오아미드화되어 있어도 되며, 아미노기는 알킬화 또는 티오카르바미드화되어 있어도 된다.

<282> 이와 같이 화학수식된 수산기 또는 메르캅토기는 예컨대 하기 화학식



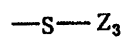
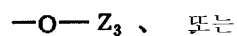
<283>

<284> 로 나타낼 수 있고, 아미드화 또는 티오아미드화된 아미노기 또는 이미노기는



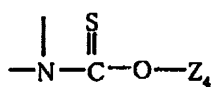
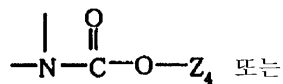
<285>

<286> 로 나타낼 수 있고, 에테르화된 수산기 또는 메르캅토기는 하기 화학식



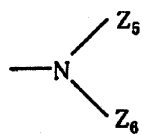
<287>

<288> 로 나타낼 수 있고, 이미노에테르화 또는 이미노티오에테르화된 이미노기는 하기 화학식



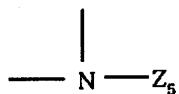
<289>

<290> 로 나타낼 수 있고, 알킬화된 아미노기는 하기 화학식



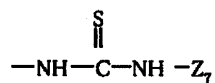
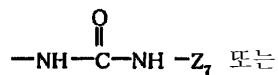
<291>

<292> 로 나타낼 수 있고, 알킬화된 이미노기로서 하기 화학식



<293>

<294> 로 나타낼 수 있고, 카르바미드화 또는 티오카르바미드화된 이미노기로서 하기 화학식



<295>

<296> 로 나타낼 수 있고, 디설피드화된 메르캅토기는 하기 화학식

<297>



<298>

로 나타낼 수 있다.

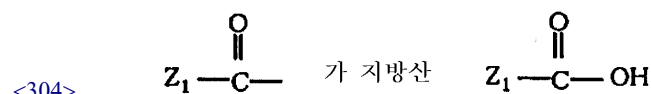
<299> 상기식 중, $Z_1, Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6, Z_7$ 및 Z_8 는 본 발명의 정신에 위반되지 않는 한, 어떠한 화학수식을 위한 치환기이어도 되지만, 의약품 분야에서 통상 사용되거나 펩티드를 위한 화학수식을 위한 치환기가 특히 문헌상 또는 학술 문헌상에도 잘 알려져 있으므로, 본 발명에서도 그와 같은 자체 공지의 수식을 위한 치환기를 채용할 수 있고, 또한 화학수식은 그와 같은 종래 공지의 방법에 따라 실행되어도 된다.

<300> 상기식에 있어서, Z_1 은 수소 원자 또는 직쇄상, 분지상 또는 환상의 알킬기이어도 되고, 이와 같은 알킬기는 포화이어도 되고 불포화이어도 된다. 탄소수는 통상적으로는 C_{1-50} , 바람직하게는 C_{6-20} 이다.

<301> $Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6, Z_7$ 및 Z_8 는 수소 원자 또는 직쇄상, 분지상 또는 환상의 알킬기이어도 되고, 이와 같은 알킬기는 포화 또는 불포화이어도 된다. 탄소수는 통상적으로는 C_{1-10} , 바람직하게는 C_{1-6} 이다.

<302> 이와 같이, $Z_1, Z_2, Z_3, Z_4, Z_5, Z_6, Z_7$ 또는 Z_8 로 나타내는 알킬기는 예컨대 수산기, 아미노기, 할로젠, 니트로, C_{1-3} 의 알콕시기 등 통상 펩티드의 화학수식에 사용되는 치환기로 치환되어 있어도 된다.

<303> 상기에 있어서,



<305> 의 잔기인 경우에는, 지방산이 결합된 아미노산의 일레이다. 이 경우의 지방산으로는 예컨대 카프릴산, 카르린산, 라우린산, 부티르산, 카프론산, 운데실산, 팔미틴산, 데칸산, 노나데칸산, 베헨산, 몬탄산, 또는 락센산 등의 포화 지방산, 예컨대 아크릴산, 올레인산, 리놀산, 리놀렌산, 또는 아테아롤산 등의 불포화 지방산을 들 수 있다. 불포화 지방산은 모노엔이어도 되고 폴리엔이어도 된다.

<306> 그리고 또 수식 아미노산은 α -아미노산의 탄소에, α 탄소에 결합하는 펩티드 결합을 구성하는 카르복실기와 아미노기 이외의 기를 수소 원자 또는 포화 또는 불포화 알킬기로 치환함으로써 형성되는 α -아미노산이어도 된다.

<307> 또한 본 발명에서 수식 아미노산은, 아미노산의 아미노기를 탄소수 1 내지 6 의 포화 또는 불포화 알킬기로 치환함으로써 형성되는 아미노산이어도 된다.

<308> 본 발명의 비천연 아미노산은 아미노기와 카르복실기를 분자의 양단에 갖는 것으로서, 예컨대 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{COOH}$, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$, $\text{NH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ 또는 $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH}$ 등을 들 수 있다. 이들은 모두 분자사슬 길이가 디펩티드 상당 길이이지만, 분자사슬 길이가 펩티드 상당 길이인 것도 당연히 포함된다.

<309> 또 본 발명의 비아미노산 화합물로는 예컨대 $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CH}_3$, $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH}$, $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{R})-\text{CH}_3$ (모두 분자사슬 길이가 펩티드 상당 길이임), 또는 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CH}_3$, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{R})-\text{CH}_3$ (모두 분자사슬 길이가 디펩티드 상당 길이임) 등도 포함된다.

<310> 여기에서 R 은 천연 아미노산의 측쇄 또는 상술한 수식 아미노산의 α 탄소의 치환기를 나타낸다.

<311> 도면의 간단한 설명

<312> 도 1 은 그렐린의 래트 위 추출물에서의 정제를 도시한 도면이고, CHO-GHSR62 세포에서의 세포내 칼슘 이온 농도의 상승에 의한 형광 광도의 변화는 검은색 막대로 나타낸다. a 는 40g 의 래트 위에서 제조한 SP-III 희분의 Sephadex G-50 (fine) 에 의한 겔 여과의 결과를 나타낸 도면으로, 활성획분이 분자량 약 3,000 달톤인 것을 나타낸다. b 는 2 회째의 CM-이온 교환 HPLC 의 결과를 나타낸 도면으로, 55 ~ 56 분에 용출되는 활성 희분은 역상 HPLC 로 더욱 정제하였다.

<313> 도 2 는 그렐린에서의 n-옥타노일 수식을 동정한 것을 나타낸다. a 는 천연형 그렐린 (상단) 및 합성 그렐린과 합성 탈아실화 그렐린 (하단), 각각 2 μg 을 역상 HPLC 로 분석한 결과를 나타낸 도면이다. b 는 천연형 그렐린 (실선), 합성 그렐린 (작은 파선) 및 합성 탈아실화 그렐린 (큰 파선) 에 의한 CHO-GHSR62 세포에서의 세포내 칼슘 이온 농도의 변화를 나타낸 도면이다.

- <314> 도 3 은 그렐린의 CHO-GHSR62 세포에 대한 특이적인 상호작용을 도시한 도면이고, 도면 중 화살표로 나타낸 점에서 시료를 첨가하였다. a 는 그렐린, GHRP-6 및 GRF (GHRH) 에 의한 CHO-GHSR62 세포에서의 세포내 칼슘 이온 농도의 변화를 나타낸 도면이다. b 는 GHS-R 의 특이적 저해제인 [D-Lys-3]-GRP-6 을 첨가 (○) 또는 비첨가 (●) 시의, 그렐린에 의한 CHO-GHSR62 세포에서의 세포내 칼슘 이온 농도의 변화를 나타낸 도면이고, GRF (GHRH) 에 의한 세포내 칼슘 이온 농도의 변화 (▲) 도 나타내고 있다.
- <315> 도 4 는 래트 및 인간 유래의 그렐린 전구체의 아미노산 서열, 및 이들 전구체의 각종 조직에서의 발현을 조사한 결과를 나타내는 도면이다. a 는 래트 및 인간 유래의 그렐린 전구체의 아미노산 서열을 비교한 도면으로, 도면 중, 동일 아미노산은 그물망, 점선은 시그널 펩티드, 검은 삼각은 시그널 펩티드의 절단점, 삼각은 카르복실 말단측의 절단점, 박스는 성숙형 그렐린 부분, * 는 n-옥탄산에 의한 수식을 나타낸다. b 는 래트 각종 조직에서의 그렐린의 발현을 노던 블롯에 의해 해석한 결과를 나타낸 도면이다.
- <316> 도 5 는 in vitro 및 in vivo 에서 그렐린이 하수체 호르몬 분비에 미치는 효과를 나타낸 도면이다. a 는 래트 하수체 초기 배양세포에서의 세포내 칼슘 이온 농도의 변화에 의한 형광 강도의 변화를 나타낸 도면으로, 실선은 그렐린, 파선은 탈아실화 그렐린을 첨가한 경우를 나타낸다. b 는 그렐린에 의한 하수체 호르몬의 분비를 나타낸 도면이고, 도면 중, 검은색 막대는 그렐린 첨가시, 흰색 막대는 그렐린 비첨가시의 하수체 호르몬 농도를 나타낸다. c 는 웅성 래트에 그렐린을 정맥주사한 후의 혈장중의 하수체 호르몬 농도의 경시 변화를 나타낸 도면이다. 도 b 및 도 c 중에서, GH 는 성장호르몬, ACTH 는 아드레노코르티코트로핀, FSH 는 폴리클, LH 는 루테나이징 호르몬, PRL 은 프로락틴, TSH 는 티로이드 촉진 호르몬을 나타낸다.
- <317> 도 6 은 그렐린을 뇌실내 투여했을 때의 식용증진을 나타낸 도면으로, 그렐린 투여 후 2 시간의 섭취량 (평균값 ± 표준오차) 으로 나타낸다. a 는 그렐린의 효과에 대한 오차범위가 0.0001 미만인 것을 나타낸다.
- <318> 도 7 은 우레탄 마취 래트에서의 약제 투여에 의한 위산 분비 효과를 나타낸 도면으로, A 는 래트 그렐린 (rGhrelin), B 는 히스타민 (Histamine) 을 투여한 경우의 결과이다. 각 심볼은 4 마리 래트에서의 평균값을 나타내고, 표준오차를 에리바로 나타냈다. 대조로서 생리식염수 (Saline) 를 투여하였다. 화살표의 시점에서 약제 (Drug) 를 투여하였다.
- <319> 도 8 은 우레탄 마취 래트에서의 위운동에 미치는 래트 그렐린의 작용을 나타낸 도면으로, A 는 생리식염수 (Saline) 및 래트 그렐린 (rGhrelin) 을 투여했을 때의 전형적인 위운동 파형을 나타내고, B 는 4 마리 래트의 평균값을 표준오차값과 함께 나타낸 도면이다. 화살표의 시점에서 약제 (Drug) 를 투여하였다.
- <320> 도 9 는 라디오이뮤노어세이의 표준곡선 및 항체의 교차반응성을 나타낸 도면으로, a 는 ¹²⁵I 로 표식한 래트 그렐린의 N 단측 항체에 대한 결합의 각종 그렐린에 의한 저해를 나타낸 도면이고, b 는 ¹²⁵I 로 표식한 래트 그렐린의 C 단측 항체에 대한 결합의 각종 그렐린에 의한 저해를 나타낸 도면이다. 그래프의 가로축은 각종 그렐린의 반응 튜브당의 첨가량을 나타내고, 세로축은 각종 그렐린 비존재하에서의 래트 그렐린의 결합량 (B₀) 에 대한 각종 그렐린 존재하에서의 결합량 (B) 의 백분율 (%) 을 나타냈다. 도면 중의 심볼은 래트 그렐린 (○), 인간 그렐린 (●), 래트 그렐린-27 (□), [Ser3(데카노일)]-래트 그렐린 (◇), [Ser3(헥사노일)]-래트 그렐린 (△) 및 탈지방산 래트 그렐린 (▼) 을 나타낸다.
- <321> 발명을 실시하기 위한 최량의 형태
- <322> GHS 리셉터 (GHS-R) 의 내재성 리간드가 되는 펩티드에 대해서는, GHS-R 을 발현하고 있는 세포에 각종 장기 또는 조직의 추출물을 첨가하여, 세포내 칼슘 이온 농도를 측정함으로써, 해당 내재성 리간드의 장기·조직 사이에서의 분포를 알 수 있다.
- <323> GHS-R 을 발현하는 세포로는 항상적으로 GHS-R 을 발현하는 것이 알려져 있는 시상하부와 뇌하수체 및 이들 조직유래의 세포주가 있으나, GHS-R 유전자를 적당한 세포, 예컨대 CHO 세포에 도입·발현시킨 형질전환세포가 바람직하다.
- <324> 본원 발명의 내재성 GHS 펩티드에 있어서는, 이 펩티드가 발현되고 있는 시상하부 및 뇌하수체가 아니라, 소화기관의 장기인 위 추출물에서 강한 Ca 상승 활성이 확인되었다. 따라서 목적의 오피온·리셉터의 내재성 리간드를 발견하기 위해서는, 이 리셉터가 발현되고 있는 조직·장기 뿐만 아니라, 다른 조직·장기도 폭넓게 탐색하는 것이 필요하다.
- <325> 세포내 칼슘 이온 농도의 측정법은 공지된 방법을 이용할 수 있으나, 바람직하게는, 칼슘 이온 농도 변화에 의

한 Fluo-4 AM (Molecular Probe 사) 의, 형광강도의 변화를 이용한 FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices 사) 가 좋다.

- <326> Ca 상승 활성이 확인된 조직·장기의 추출물에서 목적의 내재성 GHS 펩티드를 생성하기 위해서는, 공지된 정제 방법을 이용할 수 있다.
- <327> 펩티드의 정제법으로는 각종 분획법에 의한 분획후, 겔 여과, 이온 교환 및 역상 크로마토그래피를 단독 또는 조합하여 이용하는 것이 유효하지만, 반드시 이 크로마토그래피에 의한 정제에 구애될 필요는 없고, 펩티드의 정제에 유효한 수단은 어느 것이나 이용할 수 있다.
- <328> 또 조직·장기에서 펩티드를 분리·정제할 때에는, 조직·장기에 존재하는 프로테아제의 작용에 의한 목적 펩티드의 분해를 방지하기 위해, 조직·장기를 비등수 중에서 열처리함으로써 프로테아제를 실효시키는 것이 바람직하다. 열처리하여 조직·장기를 냉각 제거하는 것도, 목적 펩티드의 추출·정제에 효과가 있다.
- <329> 정제된 Ca 상승 활성을 갖는 펩티드는 in vitro 및 in vivo 에서의 GH 분비 유도 활성을 확인하기 위해서는 공지된 방법을 이용할 수 있다.
- <330> 예컨대 in vitro 에서는, GH 를 분비하여 GHS-R 의 발현도 확인되고 있는 뇌하수체 세포에 첨가하여, 세포배양액 중에 분비되는 GH 를, 항 GH 항체를 이용한 라디오이뮤노어세이에 의해 측정함으로써 측정할 수 있다. 또 상기 라디오이뮤노어세이법에 있어서, 항 GH 항체 대신에 다른 호르몬에 대한 항체를 이용하면, 이 호르몬의 분비량도 측정할 수 있다.
- <331> in vivo 에서의 GH 분비 유도 활성을 확인하기 위해서는, Ca 상승 활성을 갖는 펩티드를 동물의 말초정맥에 주사한 후의 혈청 중의 GH 농도를 측정하면 된다.
- <332> 정제된 펩티드의 구조 해석에는 공지된 방법을 사용할 수 있다.
- <333> 펩티드의 아미노산 서열을 결정하기 위해서는, 에드만 분석법으로 카르복실 말단에서부터 순차적으로 아미노산 잔기를 유리시켜 이 유리 아미노산을 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC) 에 의해 아미노산을 동정하는 방법, 및 이 방법을 자동화한 아미노산 시퀀서에 의한 방법이 있다.
- <334> 또 GC-MASS 에 의해 이온화된 프래그먼트의 분자량을 측정함으로써, 아미노산 서열을 결정하는 방법도 있다.
- <335> 본원 발명의 하나인 수식 아미노산을 함유하는 펩티드의 경우에는, 상기 아미노산 서열을 결정할 때에 수식 아미노산이 「미지 아미노산」으로 동정된다.
- <336> 이 경우, 해당 수식 펩티드를 아미노산 단위로 분해한 후, 수식 아미노산을 분리·정제시켜, 통상 사용되는 화합물 구조 결정법에 의해 수식 아미노산을 구조 결정하여, 펩티드 전체의 구조를 알 수 있다. 또 수식 펩티드를 코드하는 cDNA 에서 얻어지는 이 펩티드의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 화학합성하고, 해당 합성 비수식 펩티드와 수식 펩티드의 분자량이나 물성 등에서 수식기의 구조를 추정하는 방법도 있다.
- <337> 구조 결정된 펩티드 중에서의, Ca 상승 활성에 필요한 부분의 아미노산 서열 (코어 서열) 은, 이 펩티드를 프로테아제로 절단하여 생성되는 펩티드 단편의 Ca 상승 활성을 측정함으로써 명확해진다.
- <338> 사용되는 프로테아제는 절단하는 펩티드의 아미노산 서열에 특이성이 높은 프로테아제를 사용하여도 되지만, 특이성이 낮아도 부분 분해의 조건에서 반응시킴으로써 이 펩티드에서 여러가지 펩티드 단편을 제조할 수 있다.
- <339> 이와 같이 하여 제조된 펩티드 단편의 Ca 상승 활성을 측정함으로써, Ca 상승 활성에 필수인 코어 서열을 알 수 있다.
- <340> 내재성 GH 분비 유도 펩티드는, 아미노 말단에서 3 번째 세린이 지방산에 의해 아실화되어 있으나, 내재성 GH 분비 유도 펩티드의 아미노산 서열의 일부를 가진 펩티드 단편 및 해당 펩티드 단편의 세린 측쇄에 지방산이 에스테르 결합된 지방산 수식 펩티드는 화학적으로 합성할 수도 있다.
- <341> 이 합성 펩티드 단편에 의해 내재성 GH 분비 유도 펩티드에 대하여 상세하게 해석할 수 있다. 동시에 여러가지의 지방산으로 수식한 펩티드 단편을 비교함으로써, Ca 상승 활성에 필요한 지방산의 종류를 결정할 수 있다.
- <342> 예컨대 아프리카산 발톱개구리 등에 따라서는, 내재성 GH 분비 유도 펩티드는, 아미노 말단에서 3 번째 아미노산 잔기가 세린이 아니라 트레오닌이고, 이와 같은 트레오닌이 지방산에 의해 아실화되어 있으나, 이와 같은 펩

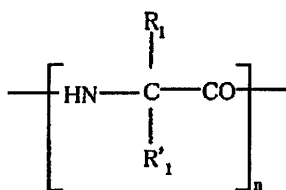
티드계 화합물에 대해서도 합성할 수도 있고, 이 화합물을 상세하게 해석할 수 있다.

- <343> 또, 척추동물에서의 GH 분비 유도 활성을 갖는 펩티드의 아미노산 서열을 비교함으로써, 척추동물에 넓게 보존되어 있는 영역을 발견하고, 이 영역의 아미노산 서열에서 GH 분비 유도 활성에 필수인 코어 서열을 발견할 수 있다.
- <344> 내재성 GH 분비 유도 펩티드의 아미노산 서열에서 추정되는 염기 서열을 갖는 DNA 를 화학합성하고, 이 DNA 를 프로브로서 이 펩티드가 발현되고 있는 세포의 mRNA 에서 제작한 cDNA 라이브러리를 스크리닝하여, 해당 펩티드를 코드하는 cDNA 를 취득할 수 있다.
- <345> 그러나 아미노산에 대응하는 코돈은 축중되어 있고, 펩티드의 아미노산 서열에서 추정되는 염기 서열이 많아져, 이와 같은 다중류의 염기 서열로 이루어지는 합성 DNA 를 프로브로 한 스크리닝이 곤란해지는 일이 있다.
- <346> 이와 같은 경우에서, 해당 펩티드의 아미노산 서열과 일치하는 서열이, 서열 데이터 베이스에서 공개된 발현 DNA 단편 (EST ; Expressed Sequence Tag) 의 염기 서열로부터 상정되는 아미노산 서열에 있는 경우에는, 이 EST 의 염기 서열의 일부로 이루어지는 DNA 를 합성하여, 상기 cDNA 라이브러리의 스크리닝에 사용할 수도 있다.
- <347> 또 cDNA 로부터 게놈 DNA 를 취득하는 것은, 통상 사용되는 방법으로 실행할 수 있다.
- <348> 이와 같이 하여 취득된 cDNA 의 염기 서열로부터, 내재성 GH 분비 유도 펩티드 전구체 폴리펩티드의 아미노산 서열이 명확해진다.
- <349> 해당 아미노산 서열을 해석함으로써, 시그널 펩티드, 내재성 GH 분비 유도 펩티드 및 그 외의 펩티드 부분, 및 이들의 펩티드의 절단점이 명확해져, 내재성 GH 분비 유도 펩티드의 생성 구조가 명확해진다.
- <350> 또한 본원 발명의 하나인 내재성 GH 분비 유도 펩티드의 일부의 아미노산 서열, 해당 펩티드 전구체 폴리펩티드의 아미노산 서열 및 이 폴리펩티드를 코드하는 DNA 의 염기 서열이, 국제출원공개 WO 98/42840 에 개시되어 있으나, 이 출원에서 개시된 펩티드는 모틸린 (motilin) 양 활성을 갖는 14 아미노산으로 이루어지는 펩티드이고, 본원 발명에서 개시된 Ca 농도 상승 활성이나 GH 분비 유도 활성에 대해서는 기재되어 있지 않다.
- <351> 본원 발명에 관련되는 펩티드계 화합물이란, 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖고, 하기 화학식 2 로 나타내는 구조에 있어서, 하나 이상의 아미노산이 수식 아미노산으로 치환되어 있는 펩티드, 또는 하나 이상의 아미노산이 비아미노산으로 치환된 펩티드 유도체, 및 이들 아미노 말단 및/또는 카르복실 말단이 수식된 펩티드 유도체를 말한다.
- <352> 본 발명에서 상기의 펩티드, 펩티드 유도체 및 펩티드 유도체를 펩티드계 화합물로 총칭한다.
- <353> 또 해당 펩티드계 화합물에 있어서, 복수의 아미노산이 수식 아미노산 및/또는 비아미노산으로 치환되어도 된다. 본 발명에서는, 서열번호 2 로 나타내는 아미노산 서열에 있어서, 통상 아미노 말단에서 1 ~ 10 번째, 바람직하게는 아미노 말단에서 1 ~ 4 또는 1 ~ 5 번째 아미노산의 1 또는 복수가 수식 아미노산 및/또는 비아미노산으로 치환되어 있는 것이 바람직하다. 그 중에서도, 1 ~ 5 번째 아미노산이 수식 아미노산 및/또는 비아미노산으로 치환되어 있는 것이 바람직하다.
- <354> 또 서열번호 2 로 나타내는 아미노산 서열에 있어서, 아미노 말단에서 1 ~ 4 번째 이외의 부분에서, 바람직하게는 1 ~ 6 번째 이외의 부분에서, 더욱 바람직하게는 1 ~ 10 번째 이외의 부분에서의 아미노산의 1 또는 복수가 결실 또는 부가되어 있어도 된다.
- <355> 본 발명의 펩티드계 화합물은 바람직하게는 세포내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 및 생체내에서 성장호르몬의 분비를 유도하는 펩티드로서, 하나 이상의 아미노산이 수식 아미노산 및/또는 비아미노산 화합물에 의해 치환된 화합물이다.
- <356> 즉 본 발명에서의 펩티드계 화합물은 세포내 칼슘 이온 농도 상승 활성 또는/및 생체내 성장호르몬 분비 유도 작용을 갖고, 펩티드 사슬에 있어서 아미노산이 수식 아미노산 또는/및 비아미노산 화합물로 치환된 펩티드계 화합물이다.
- <357> 이와 같은 화합물의 구체예로서 서열번호 1, 2 또는 3 이 나타내는 펩티드에 있어서, 3 번째 아미노산 Ser 의 수산기가 아실화된 화합물, 서열번호 4 또는 5 가 나타내는 펩티드에서 25 번째 아미노산 Ser 의 수산기가 아실화된 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 들 수 있다.

- <358> 또 다른 구체예로서는 서열번호 10, 11, 16 또는 17 이 나타내는 펩티드에 있어서, 3 번째 아미노산 Ser 의 수산기가 아실화된 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 들 수 있다.
- <359> 또한 다른 구체예로서는 서열번호 22, 25, 26 또는 27 이 나타내는 펩티드에 있어서, 3 번째 아미노산 Ser 의 수산기가 아실화된 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 들 수 있다.
- <360> 그리고 또 다른 구체예로서는 서열번호 29, 30 또는 31 이 나타내는 펩티드에 있어서, 3 번째 아미노산 Ser 의 수산기가 아실화된 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 들 수 있다.
- <361> 또 서열번호 28 이 나타내는 펩티드에 있어서, 3 번째 아미노산 Thr 의 수산기가 아실화된 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 들 수 있다.
- <362> 본 발명에서의 아실화에 의해 수산기에 도입되는 아실기는, 예컨대 유기 카르복실산, 유기 술폰산, 유기 인산 화합물에서 수산기를 제거하여 형성되는 기이다.
- <363> 유기 카르복실산으로는 더욱 구체적으로는 지방산을 들 수 있고, 그 탄소수는 바람직하게는 2 ~ 35 정도, 더욱 바람직하게는 6 ~ 18 정도, 가장 바람직하게는 8 ~ 16 정도이다. 이와 같은 지방산으로서, 구체적으로는 옥탄산 (바람직하게는 카프릴산), 데칸산 (바람직하게는 카프린산), 도데칸산 (바람직하게는 라우릴산), 이들 모노엔 또는 폴리엔 지방산 등을 들 수 있다.
- <364> 유기 술폰산, 유기 인산 화합물로서 그 탄소수가 2 ~ 35 정도인 것이 바람직하다.
- <365> 3 번째 Ser 의 수산기가 아실화되어 있는 서열번호 1 의 아미노산 서열을 포함하는, 임의의 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염도 본 발명의 바람직한 실시 태양이다.
- <366> 즉 본원 발명의 두번째에서, 서열번호 8 에 기재된 아미노산 서열, 바람직하게는 서열번호 1 에 기재된 아미노산 서열, 더욱 바람직하게는 서열번호 9 에 기재된 아미노산 서열에서 3 번째 Ser 의 수산기가 아실화되어 있는 지방산 수식 펩티드를 포함하는, 임의의 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염도 본 발명의 바람직한 실시 태양이다.
- <367> 또 서열번호 8 에 기재된 아미노산 서열, 바람직하게는 서열번호 1 에 기재된 아미노산 서열, 더욱 바람직하게는 서열번호 9 에 기재된 아미노산 서열의 아미노 말단의 3 번째 아미노산 잔기 세린을 트레오닌으로 변환시킨 아미노산 서열에서, 3 번째 Thr 의 수산기가 아실화되어 있는 지방산 수식 펩티드를 포함하는, 임의의 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염도 본 발명의 바람직한 실시 태양이다.
- <368> 그리고 또, 본 발명의 바람직한 실시 태양은 하기 일반식 2 로 나타내는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염이다.

[일반식 2]

- <369> X-AA1-AA2-AA3-Y
- <370> [식중, X 는 아미노 말단 아미노산에서 아미노기의 수소 원자에 상당하는 부분이고, H 또는 탄소수가 1 또는 복수의 포화 또는 불포화 알킬 또는 아실기를 나타낸다. Y 는 카르복실기 말단 아미노산에서 α-카르복실기의 수산기에 상당하는 부분이고, OH, OZ 또는 NR6R7 (Z 는 약학적으로 허용될 수 있는 양이온 또는 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기를 나타내고, R6 또는 R7 은 H, 저급 분지쇄 또는 비분지쇄 알킬기를 나타내고, R6 과 R7 은 동일하거나 달라도 됨) 을 나타낸다].
- <371> 여기에서, AA1 은 하기 화학식



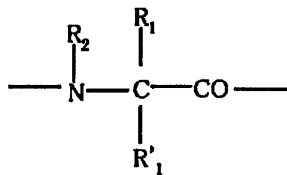
- <372>
- <373> (식중, n 은 1 또는 2 를 나타내고, R₁ 과 R₁' 는 동일하거나 달라도 되고, 수소 또는 치환기를 나타낸다)
- <374> 로 나타낸다.

<375> 단, n 이 2 일 때에는, 그 2 개의 치환기 R_1 은 동일하여도 되고 달라도 된다. 또 R_1' 에 대해서도 동일하다.

<376> 치환기의 구체예로서는 (1) 탄소수 1 이상의 알킬 사슬을 통하거나 통하지 않고, 에스테르, 에테르, 티오에스테르, 티오에테르, 아마이드 또는 카르바미드로 이루어지는 군에서 선택되는 결합양식으로 결합되는 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 사슬, (2) H 또는 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 사슬, 또는 (3) 천연 아미노산 측쇄 등을 들 수 있다.

<377> 또 탄소수 1 이상의 알킬 사슬을 통하거나 통하지 않고, 디설피드 또는 티오카르바미드 결합으로 결합되는 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 사슬이어도 된다.

<378> AA2 는 하기 화학식

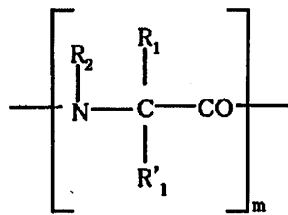


<379>

<380> (식중, R_1 과 R_1' 은 상기와 동일한 의미이다. R_2 는 H 또는 탄소수 1 내지 6 의 포화 또는 불포화 알킬기를 나타낸다),

<381> 또는 $-CH_2-CH(R_1)-CH_2-$, 또는 $-CH_2-CH(R_1)-CO-$ (R_1 은 상기와 동일한 의미임) 을 나타낸다.

<382> AA3 은 하기 화학식이다,



<383>

<384> (식중, m 은 1 이상의 정수를 나타내고, R_1 , R_1' 또는 R_2 은 상기와 동일한 의미임)

<385> 단, m 이 2 이상의 정수일 때에는, 그 2 개의 치환기, R_1 은 동일하여도 되고 달라도 된다. 또는 R_1' , R_2 에 대해서도 동일하다.

<386> X 로 나타내는 탄소수가 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬로서는, 구체적으로는 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, s-부틸, t-부틸, n-헵틸, n-옥틸, n-데실, 비닐, 프로파닐 또는 헥세닐 등의 C_{1-20} 의 알킬이 바람직하다.

<387> X 로 나타내는 아실로서는 포르밀, 아세틸, 프로피오닐, 또는 벤조일 등의 C_{1-10} 카르복실산아실 ; 또는 벤젠설포닐 또는 나프탈렌설포닐 등의 C_{7-13} 의 술폰산아실을 들 수 있다.

<388> R_1 또는 R_1' 로 나타내는 기는 예컨대 하기 화학식 2

화학식 2

<389> $-(CH_2)_n-P-Q$

(식중, n 은 0~10의 정수이고, P는 $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-$, $-O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-$, $-O-$,

$-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-S-$, $-\overset{\overset{S}{\parallel}}{C}-S-$, $-S-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-$, $-S-$, $-CO-NH-$,

<390>

<391> $-NH-CO-$ 또는 $-CO-NH-CO-$ 를 나타내고, Q는 H 또는 상기의 X로 나타내는 C_{1-20} 알킬기를 나타낸다)

<392> 로 나타나는 기가 바람직하다. 또한 P는 $-CO-$ 이어도 된다.

<393> 또한 P는 $-S-S-$, 또는 $-NH-CS-$ 이어도 된다. 또, 상기 모든 $-NH-$ 에서, H가 C_{1-35} 의 포화 또는 불포화 알킬기, C_{6-20} 의 아릴기, C_{7-13} 의 아랄킬기로 치환되어 있어도 된다.

<394> 더욱 바람직하게는, P는

$-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-$, $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-S-$,

$-CO-NH-$, $-NH-CO-$ 또는 $-NH-\overset{\overset{S}{\parallel}}{C}-$ 이다

<395>

<396> 또 R_1 또는 R_1' 로 나타내는 기는, P를 통하지 않고 $-(CH_2)_n$ 에 Q가 결합되어 있는 기이어도 된다.

<397> Z, R6 또는 R7로 나타내는 저급 알킬기로서는, 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, s-부틸, t-부틸, i-부틸, n-펜틸 또는 n-헥실 등의 C_{1-6} 알킬이 바람직하다.

<398> 다음으로 본원 발명에 관련되는 펩티드계 화합물의 바람직한 태양을 이하에 나타낸다.

<399> (1) AA1의 바람직한 태양 ; (가) 아미노산 또는 펩티드. 예컨대 Ser, Gly-Ser 또는 $-NH-(CH_2)_3CH(CH_2OH)CO-$ (2 아미노산 잔기 사이의 펩티드 결합 부분이 $-(CH_2)_2-$ 인 경우) 등을 들 수 있다. (나) 1급 아민. 예컨대 $-NH-(CH_2)_3CH(CH_2OH)CH_2-$ (2 아미노산 잔기 사이의 펩티드 결합 부분이 $-(CH_2)_2-$ 인 경우, $-NH-(CH_2)_3CH(R_1)CH_2-$ (2 아미노산 잔기 사이의 펩티드 결합 부분이 $-(CH_2)_2-$ 인 경우) [R_1 은 상기와 동일한 의미를 나타냄], $-NH-CH(CH_2OH)CH_2-$ 등을 들 수 있다.

<400> 또 (가) 아미노산 또는 펩티드로서, $NH_2-(CH_2)_4-COOH$, $NH_2-C(CH_3)_2-(CH_2)_3-COOH$ 또는 $NH_2-CH(CH_3)-(CH_2)_2-CH(CH_3)-COOH$ 도 들 수 있다.

<401> (2) AA2의 바람직한 태양 ; (가) 아미노산. 예컨대, Ser, homoSer, Cys, homoCys, Asp, Glu, Lys, Ala, Val, Leu, homoLeu, Ile, homoIle, 오르니틴, 아미노아디프산, 메티오닌, 에티오닌, 부티오닌, 또는 S-메틸시스테인 등을 들 수 있으나, 특히 Ser이 바람직하다.

<402> (나) 아미노산 잔기 이외의 구조 ; $-CH_2-CH(R_1)-CO-$, $-CH_2-CH(R_1)-CH_2-$ 등을 들 수 있다 (R_1 은 상기와 동일한 의미를 나타냄).

<403> 특히 (a) 소수성 측쇄를 갖는 류신, 발린, 노르류신, 호모류신, 호모이소류신, 나프틸알라닌류, 트립토판, 페닐알라닌, 시클로헥실알라닌 등, 또는 이들의 N-메틸아미노산이 바람직하다. 또 (b) 측쇄에 아실기, 알킬기, 알케닐기 또는 아랄킬기로 수식할 수 있는 관능기를 갖는, 세린, 호모세린, 트레오닌, 시스테인, 호모시스테인, 아스파라긴산, 글루타민산, 아디프산, 라이신, 오르니틴 등, 및 이들의 N-메틸아미노산이 바람직하다.

<404> 이들 (b)의 아미노산 측쇄에, 에스테르, 아마이드, 디설피드, 에테르, 티오에테르, 티오에스테르, 카르바미드 또는 티오카르바미드 결합을 통하여 아실기, 알킬기, 알케닐기 또는 아랄킬기가 결합된다. 또 아미노산의 α 탄소에 알킬, 아랄킬기가 결합되어도 된다.

<405> (3) AA3 의 바람직한 태양 ; 아미노산 또는 펩티드. 예컨대 Phe 또는 서열번호 2 또는 3 에 기재된 아미노산 서열에 있어서, 아미노 말단에서 4 번째 Phe 부터 28 번째 Arg 까지의 아미노산 서열을 갖는 펩티드, 또는 해당 서열의 카르복실 말단측의 아미노산이, 서열번호 2 또는 3 에 기재된 아미노산 서열에 있어서 아미노 말단에서 5 번째 Leu 까지 하나씩 결실된 펩티드.

<406> 예컨대,

Phe Leu,

Phe Leu Ser,

Phe Leu Ser Pro,

Phe Leu Ser Pro Glu,

Phe Leu Ser Pro Glu His,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg,

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys,

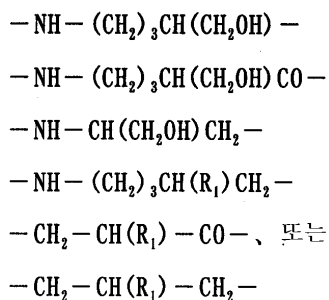
<407>

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
Pro,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
Pro Ala,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
Pro Ala Lys,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
Pro Ala Lys Leu,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
Pro Ala Lys Leu Gln,
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro
Pro Ala Lys Leu Gln Pro, 또는
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys
Pro

<408>

<409> Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg 를 AA3 의 예로서 들 수 있다.

<410> 그리고 또 AA3 의 예시에서, 아미노산은 L-아미노산이어도 되고 D-아미노산이어도 되는 것은 말할 필요도 없다.
또 AA3 의 상기 예시에 있어서, 예컨대 1 ~ 여러 개의 아미노산 (바람직하게는 아미노산 서열의 약 3 분의 1 정도까지) 은, 비천연 아미노산 또는 비아미노산 단위, 예컨대



<411>

- <412> (상기식 중, R_1 은 상기와 동일한 의미를 나타냄)
- <413> 으로 치환되어도 된다. 상기식으로 나타내는 기가 AA3 에 복수 개 있고, 또한 R_1 으로 나타나는 기가 복수 개 있을 때, 이들은 동일하거나 다르다.
- <414> 그리고 또 AA3 의 예시에서, 각 아미노산의 어느 것이나 상기 R_1 으로 나타내는 치환기를 가져도 된다. AA3 으로 나타내는 기에 있어서, R_1 이 복수 개 존재할 때에는, 이들은 동일하거나 달라도 된다.
- <415> 이하에 펩티드를 구성하는 아미노산이 측쇄에 수산기, 메르캅토기, 이미노기 또는 아미노기를 갖는 경우의 해당 측쇄의 바람직한 예를 나타낸다. 또한, 이하의 R_8 은 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 사슬을 나타낸다. 이와 같은 알킬 사슬은 X 로 나타내는 상기의 알킬 사슬과 동일한 의미이어도 된다.
- <416> 가) Ser 측쇄 ; $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}_8$ 또는 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_8$,
- <417> 나) homoSer 측쇄 ; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}_8$ 또는 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_8$,
- <418> 다) Cys 측쇄 ; $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-\text{R}_8$ 또는 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}_8$,
- <419> 라) homoCys 측쇄 ; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-\text{R}_8$ 또는 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}_8$,
- <420> 마) Asp 측쇄 ; $-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{R}_8$ 또는 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}_8$,
- <421> 바) Glu 측쇄 ; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{R}_8$ 또는 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}_8$,
- <422> 사) Lys 측쇄 ; $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CO}-\text{R}_8$,
- <423> 아) 아미노아디프산 측쇄 ; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{R}_8$ 또는 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}_8$,
- <424> 자) 오르니틴 측쇄 ; $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{R}_8$,
- <425> 차) 측쇄가 알킬 사슬의 아미노산인 Ala, Val, Leu, 호모류신, Ile, 호모이소류신, S-메틸시스테인, 메티오닌, 에티오닌, 또는 부티오닌 등에 대해서도, 동일하게 알킬기가 상기와 같이 화학식 2 로 나타내는 수식된 알킬기 이어도 된다.
- <426> 그리고 또 본 발명은 서열번호 2 또는 3 의 아미노산 서열에 있어서, 아미드 말단에서 13, 14 또는 15 번째까지의 아미노산으로 이루어지는 부분 펩티드를 함유하는 세포내 칼슘 이온 농도 상승제 또는 GH 분비 유도제도, 바람직한 실시 태양으로 포함하는 것이다. 이와 같은 경우, 부분 펩티드를 구성하는 각 아미노산 단위는 반드시 화학수식되어 있을 필요는 없다.
- <427> 그리고 또 본 발명의 바람직한 실시 태양은 하기의 펩티드계 화합물이다.
- <428> 또한 그렐린 유도체란 천연형 그렐린의 화학구조를 일부 개변시킨 펩티드계 화합물을 말하고, 단쇄 그렐린이란 27 내지 28 아미노산으로 이루어지는 천연형 그렐린의 일부 아미노산이 결실되어, 27 내지 28 보다 적은 아미노산으로 이루어지는 펩티드를 말한다. 또 n 위의 아미노산 잔기란 아미노 말단에서 n 번째 아미노산 잔기를 말한다,
- <429> 그렐린, 또는 그 단쇄 그렐린 유도체의 아미노 말단 아미노산은, 이 아미노산의 α 아미노기가 보호되어 있지 않으면, 임의 아미노산 (천연형 그렐린에서는 아미노 말단 아미노산은 글리신) 이어도 되고, 또 D-체, L-체 중 어느 것이어도 되지만, 바람직하게는 알라닌, 발린, 아미노이소부탄산 등이 바람직하다.
- <430> 2 위 잔기는 임의 아미노산 (천연형 그렐린에서는 세린) 이어도 되지만, 바람직하게는 작은 측쇄를 갖는 알라닌, 세린, 히스티딘, 노르발린 또는 비아미노산 화합물 등이 바람직하다.
- <431> 1 위와 2 위 잔기는, 아미노산 2 잔기에 해당하는 δ -아미노산, 예컨대 실시예에서 나타난 5-아미노펜탄산이나, 5-아미노-5-디메틸펜탄산, 2,5-디아미노펜탄산 등이어도 된다.
- <432> 3 위와 4 위에 선택되는 아미노산 잔기는, D-체, L-체 어느 것이어도 되고, D- 또는 L-N-메틸아미노산이어도 되고, 이들의 임의 조합이어도 된다. 그 중에서도 3 위가 L-체, 또는 3 위, 4 위 모두 L-체의 조합이 바람직

하다.

- <433> 3 위와 4 위에 선택되는 아미노산 잔기의 입체 배치는, 1 위 및 2 위의 아미노산 서열에 의해 적당히 선택할 수 있다. 즉, 천연 그렐린의 1 위와 2 위의 아미노산 서열, Gly-Ser 은 3 위와 4 위 모두 L-체인 것이 바람직하지만, 다른 아미노산 서열, 예컨대, Aib-His 등의 경우에는 3, 4 위 모두 D-체이어도 된다. 또 1, 2 위가 2 잔기 상당 길이의 δ-아미노산, 예컨대 아미노펜탄산인 경우에는 3,4 위는 L-체, D-체 중 어느 것이어도 된다.
- <434> 3 위와 4 위에 선택되는 아미노산 잔기는, 바람직하게는 D-체 또는 L-체의 류신, 발린, 노르류신, 호모류신, 호모이소류신, 나프틸알라닌류, 트립토판, 페닐알라닌, 시클로헥실알라닌 및 이들의 D-, 또는 L-N-메틸아미노산이 바람직하다.
- <435> 특히 3 위와 4 위에 선택되는 아미노산 잔기는 상기 소수성 아미노산 중에서도, 예컨대 나프틸알라닌류, 트립토판, 페닐알라닌, 시클로헥실알라닌 등의 방향족 소수성 아미노산이 더욱 바람직하다.
- <436> 또 3 위와 4 위에 선택되는 아미노산 잔기로서는, 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘 등의 염기성 아미노산도 바람직하다. 그 중에서도 라이신이 바람직하다.
- <437> 이들 염기성 아미노산에 의해, 그렐린 분자가 염기성으로 되어, Ca 상승 활성이 더욱 향상된다.
- <438> 3 위와 4 위에 선택되는 아미노산 잔기는, 측쇄에 아실기 (알카닐기, 알케노닐기 또는 아릴알카닐기 등), 알킬기, 또는 아랄킬기로 수식이 가능한 관능기를 갖는, 세린, 호모세린, 트레오닌, 시스테인, 호모시스테인, 아스파라긴산, 글루타민산, 아디프산, 라이신, 오르니틴 등이 바람직하다.
- <439> 이들의 측쇄에 반응성을 갖는 아미노산은, D-체 또는 L-체 중 어느 것이어도 되고, 대응하는 D- 또는 L-N-메틸아미노산이어도 되지만, 그 중에서도 3 위가 L-체, 또는 3 위, 4 위 모두 L-체의 조합이 바람직하다.
- <440> 또 아미노산 측쇄에, 카르바메이트, 티오키타르바메이트, 에스테르, 아마이드, 디설피드, 에테르, 티오에테르 또는 티오에스테르 결합 등을 통하여, 아실기, 예컨대 아랄카닐기 (탄소수가 2 ~ 35, 바람직하게는 6 ~ 18, 더욱 바람직하게는 8 ~ 12), 알케노닐기 (탄소수가 2 ~ 35, 바람직하게는 6 ~ 18, 더욱 바람직하게는 8 ~ 12), 아릴알카닐기 (벤조일, 페나세틸, 페닐부틸, 나프토일, 나프틸아세틸 또는 나프틸프로피오닐기 등); 알킬기 (탄소수가 2 ~ 35, 바람직하게는 6 ~ 18, 더욱 바람직하게는 8 ~ 12); 또는 아랄킬기 (벤질, 페네틸, 페닐프로필, 페닐부틸, 페닐펜틸, 나프틸메틸기 등) 가 결합되어 있어도 된다. 또 결합을 통하지 않고 3 위와 4 위의 α 탄소에 상기의 알킬기, 아랄킬기가 결합되어도 된다.
- <441> 3 위와 4 위에 선택되는 아미노산 잔기의 조합으로, 3 위의 아미노산 잔기가 소수성의 측쇄를 갖고, 4 위의 아미노산잔가 소수성 아미노산인 것이 바람직하다.
- <442> 소수성 측쇄를 갖는 3 위의 아미노산 잔기로서는, 아미노산의 α 탄소에 (a) 탄소수 1 이상의 알킬렌기를 통하거나 통하지 않고, 에스테르, 에테르, 티오에테르, 아마이드 또는 디설피드 결합을 통하여 탄소수가 1 또는 복수의 포화 또는 불포화 알킬 사슬, 또는 (b) 탄소수 1 이상의 포화 또는 불포화 알킬 사슬을 도입한 수식 아미노산이 바람직하다. 특히 아미노산의 α 탄소에 탄소수 1 이상의 포화알킬 사슬을 도입한 수식 아미노산이 더욱 바람직하다.
- <443> 4 위 아미노산의 카르복실기가 아마이드, 메틸아מיד 또는 에틸아מיד 등의 알킬아מיד, 또는 벤질아מיד, 아다만탄아מיד 또는 아다만탄알킬아מיד 등의 아랄킬아מיד이어도 된다.
- <444> 또 알킬아מיד, 또는 아랄킬아מיד에 아미노기 또는 구아니지드기 등의 염기성기를 결합하여도 된다. 이와 같은 염기성기로서는, 예컨대 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$, $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$, $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$, $-\text{CONHCH}_2\text{Ph}-\text{NH}_2$ 등을 들 수 있다.
- <445> 4 위 아미노산의 카르복실기에 아르기닌, 라이신, 히스티딘 등의 염기성 아미노산을 부가하여도 되고, 이들 염기성 아미노산은 D-체, L-체 또는 라세미체, 또는 D- 또는 L-N-메틸아민산중 어느 것이어도 된다.
- <446> 이들 아미노산의 카르복실기는 상술한 바와 같이, 알킬아מיד 또는 아랄킬아מיד이어도 된다. 또한, 알킬아מיד 또는 아랄킬아מיד에 아미노기, 구아니지드기 등의 염기성기를 결합하여도 된다. 이와 같은 염기성기로서는 상술한 것 등을 들 수 있다.
- <447> 5 위 이후의 아미노산 서열은 인간 그렐린, 래트 그렐린의 5 위 류신을 기점으로 28 위까지, 임의 길이의 서열

이 4 위의 아미노산에 부가되어도 된다.

- <448> 바람직하게는 그렐린 (1-5), 그렐린 (1-6), 그렐린 (1-7), 그렐린 (1-8), 그렐린 (1-9), 그렐린 (1-10), 그렐린 (1-11) 을 들 수 있다. 또한 그렐린 (m-n) 이란, 그렐린의 아미노 말단에서 m 번째부터 n 번째까지의 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 말한다. 특히 그렐린 (1-5) 이 더욱 바람직하다.
- <449> 이 카르복실 말단은 상술한 바와 같은 알킬아미드, 또는 아랄킬아미드인 것이 바람직하다.
- <450> 또 알킬아미드 또는 아랄킬아미드에, 추가로 아미노기 또는 구아니지드기 등의 염기성기를 결합시켜도 된다. 이와 같은 염기성기로서는 상술한 것 등을 들 수 있다.
- <451> 또 5 위 이후에서 28 위까지의 어느 하나의 아미노산 서열을 그렐린 (1-4) 카르복실 말단부에 부가한 카르복실 말단부 결손 그렐린 유도체의 카르복실 말단 아미노산에 아르기닌, 라이신, 히스티딘 등의 염기성 아미노산을 부가하여도 된다.
- <452> 이들 염기성 아미노산은 D-체, L-체 또는 라세미체, 또는 D- 또는 L-N-메틸아미노산이어도 된다.
- <453> 또 이들의 염기성 아미노산의 카르복실기가 상술한 바와 같이 알킬아미드, 또는 아랄킬아미드이어도 된다. 알킬아미드 또는 아랄킬아미드는 추가로 아미노기 또는 구아니지드기 등의 염기성기를 결합하여도 된다. 이와 같은 염기성기로서는 상술한 것 등을 들 수 있다.
- <454> 특히 바람직한 태양으로서, 그렐린 (1-5), 그렐린 (1-6), 그렐린 (1-7) 의 카르복실 말단 아미노산이, D-체, L-체, 또는 대응하는 D-체 또는 L-N-메틸아미노산인 경우를 들 수 있다.
- <455> 또 5, 6, 7 위의 잔기에 아르기닌, 라이신, 히스티딘 등의 염기성 아미노산을 부가하여도 되고, 이들 아미노산은 D-체, L-체 또는 라세미체, 또는 D-, 또는 L-N-메틸아미노산이어도 된다.
- <456> 또 이들의 염기성 아미노산의 카르복실기가 상술한 바와 같은 알킬아미드, 또는 아랄킬아미드이어도 된다. 알킬아미드 또는 아랄킬아미드에 추가로 아미노기 또는 구아니지드기 등의 염기성기를 결합하여도 된다. 이와 같은 염기성기로서는 예컨대 상술한 것 등을 들 수 있다.
- <457> 본 발명에 관련된 펩티드계 화합물은 상기한 바와 같이 카르복실 말단이 알킬아미드 또는 아랄킬아미드인 경우, 이 알킬기 또는 알킬기에 추가로 아미노기가 결합되어 있는 아미드 유도체이어도 되고, 본 발명의 바람직한 태양의 하나이다. 구체적으로는 예컨대 카르복실 말단이 아미노에틸아미드인 경우를 들 수 있다.
- <458> 상기한 바와 같이 카르복실 말단이 아미드체 또는 아미드 유도체인 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물은, 생체내에서 카르복시펩티다아제류에 의한 효소분해에 저항하는 점에서도 유용한 화합물이다.
- <459> 동일하게 N-메틸아미노산을 함유하는 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물도 효소 저항성을 갖는 점에서 유용한 화합물이다.
- <460> 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물은 통상적인 방법으로 얻을 수 있다. 예컨대 이미 상술한 바와 같이 천연 원료에서 단리되거나, 또는 재조합 DNA 기술 및/또는 화학적 합성에 의해 제조할 수 있다. 또한 아미노산 잔기에 수식 (예컨대 아실화)이 필요한 경우에는 자체 공지된 수단에 따라 수식 반응을 실시할 수 있다.
- <461> 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물은, 더욱 구체적으로는 본원 발명에 관련되는 펩티드를 코딩하는 DNA 를 갖는 발현 벡터에 의해 형질전환된 숙주세포를 배양하고, 해당 배양물에서 목적의 펩티드를 채취함으로써 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물을 얻을 수도 있다.
- <462> 해당 숙주세포를 선택함으로써, 해당 세포내에서 목적의 펩티드에 아실화 등이 수식된 화합물을 얻을 수 있다. 또 해당 펩티드가 수식되어 있지 않은 경우에는, 원하면 공지된 수단에 따라 아실화 등의 수식 반응을 실행하면 된다. 아실화 반응에 의해 리파아제 등의 효소를 사용할 수도 있다.
- <463> 유전자를 삽입하는 벡터로는 예컨대 대장균 벡터 (pBR322, pUC18, pUC19 등), 길초균 벡터 (pUB110, pTP5, pC194 등), 효모 벡터 (YEpl형, YRp형, YIp 형) 또는 동물세포 벡터 (레트로 바이러스, 백시니아 바이러스 등) 등을 들 수 있으나, 그 이외의 것이더라도 숙주세포 내에서 안정적으로 목적 유전자를 보존할 수 있는 것이면, 어느 것이나 사용할 수 있다. 해당 벡터는 적당한 숙주세포에 도입된다. 목적 유전자를 플라스미드에 삽입하는 방법이나 숙주세포로의 도입 방법으로는 예컨대 Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) 에 기재된 방법을 이용할 수 있다.
- <464> 상기 플라스미드에서 목적 펩티드 유전자를 발현시키기 위해, 해당 유전자의 상류에 프로모터를 기능하도록 접

속시킨다.

- <465> 본원 발명에서 사용되는 프로모터로는 목적 유전자의 발현에 사용하는 숙주세포에 대응하는 적절한 프로모터이면 어떤 것이어도 된다. 예컨대 형질전환되는 숙주세포가 *Escherichia* 속인 경우에는 lac 프로모터, trp 프로모터, lpp 프로모터, λ PL 프로모터, recA 프로모터 등을 사용할 수 있고, *Bacillus* 속인 경우에는 SP01 프로모터, SP02 프로모터 등을 사용할 수 있고, 효모인 경우에는 GAP 프로모터, PH05 프로모터, ADH 프로모터 등을 사용할 수 있고, 동물세포의 경우에는 SV40 유래 프로모터, 레트로 바이러스 유래 프로모터 등을 사용할 수 있다.
- <466> 상기와 같이 하여 얻어진 목적 유전자를 함유하는 벡터를 사용하여 숙주세포를 형질전환한다. 숙주세포로서는 세균(예컨대, *Escherichia* 속, *Bacillus* 속 등), 효모(*Saccharomyces* 속, *Pichia* 속, *Candida* 속 등), 동물세포(CHO 세포, COS 세포 등) 등을 사용할 수 있다. 배양시의 배지로는 액체 배지가 적당하고, 해당 배지 중에는 배양하는 형질전환세포의 생육에 필요한 탄소원, 질소원 등이 포함되는 것이 특히 바람직하다. 원하면 비타민류, 성장촉진인자, 혈청 등을 첨가할 수 있다.
- <467> 지방산 수식 펩티드를 직접 제조하기 위해서는, 이 펩티드 전구체 폴리펩티드를 적절한 위치에서 절단할 수 있는 프로세싱·프로테아제 활성을 갖고, 해당 펩티드 중의 세린 잔기를 아실화할 수 있는 활성을 갖는 세포가 바람직하다. 이와 같은 프로세싱·프로테아제 활성 및 세린 아실화 활성을 갖는 숙주세포는, 해당 전구체 폴리펩티드를 코드하는 cDNA 를 포함하는 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환하고, 이 형질전환세포가 Ca 상승 활성 또는 GH 분비 유도 활성을 갖는 지방산 수식 펩티드를 생산하는 것을 확인함으로써 선발할 수 있다.
- <468> 배양 후, 배양물에서 본 발명에 관련되는 펩티드를 통상적인 방법으로 분리 정제한다. 예컨대 배양균체 또는 세포에서 목적 물질을 추출하기 위해서는, 배양 후, 균체 또는 세포를 모아, 이것을 단백질 변성제(염산구아니딘 등)를 함유하는 완충액에 현탁하고, 초음파 등으로 균체 또는 세포를 파쇄한 후, 원심분리를 한다. 다음에 상등액에서 목적 물질을 정제하기 위해서, 목적 물질의 분자량, 용해도, 하전(등전점), 친화성 등을 고려하여, 겔 여과, 한외 여과, 투석, SDS-PAGE, 각종 크로마토그래피 등의 분리 정제 방법을 적당히 조합하여 실행할 수 있다.
- <469> 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물은 통상적인 방법으로 화학 합성할 수 있다. 예컨대 보호기를 가진 아미노산을 액상법 및/또는 고상법으로 축합, 펩티드 사슬을 연장시켜, 산으로 모든 보호기를 제거하고, 얻어진 조생성물을 상기 정제 방법으로 정제함으로써 얻어진다. 아실화 효소 또는 아실기 전이효소로 선택적으로 목적 위치에 있는 아미노산 측쇄를 아실화할 수도 있다.
- <470> 펩티드의 제조법은 종래에 이미 여러가지 방법이 충분히 확립되어 있어, 본 발명의 펩티드계 화합물의 제조도 그와 같은 자체 공지된 방법에 따라 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대 고전적인 펩티드 합성법에 따라도 되고, 고상법에 따라도 된다.
- <471> 이하에 재조합 DNA 기술과 화학 합성을 병용한 본 발명에 관련되는 펩티드 화합물의 제법에 대하여 예를 들어 서술한다.
- <472> 아미노 말단부 펩티드의 활성 에스테르, 예컨대 (1) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Osu, (2) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Osu, 또는 (3) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Leu-Osu 를 화학 합성하고, 각각 재조합 DNA 기술에 의해 생산된 카르복실 말단부의 펩티드인 (4) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR, (5) LSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR, 또는 (6) SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR 을 결합, 즉 (1) 과 (4), (2) 와 (5) 및 (3) 과 (6) 을 결합시켜, 28 개의 아미노산으로 이루어지는 펩티드 화합물을 얻는다. 더욱 구체적으로는 XXXXZSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR 을 대장균에서 발현시켜, Boc2(O) 로 아미노기를 보호하여, Boc-XXXXZSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR 을 얻는다. 다음에 아미노산 Z 의 카르복실 말단에 선택적인 효소로 잘라, NH_2 -SPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR 로 변환시킨다. 이 화합물과 Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Leu-Osu 를 중성 내지 약알칼리 수용액 중에서 혼합하고, 얻어지는 BocGlySer(Bu)Ser(R10)FLSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR 을 트리플루오로아세트산 처리하면 목적물이 얻어진다.
- <473> 상기 아미노산의 한글자 표기는 1997 년 12 월 10 일, 주식회사 뉴튼프레스 발행의 「세포 분자생물학 제 3 판」 기재에 따른 것이다.
- <474> 또 Boc 는 t-부틸옥시카르보닐을 나타내고, Osu 는 N-히드록시숙신이미드의 수산기에서 수소가 탈리된 것을 나

타내고, Bu 는 부틸기를 나타내고, R10 은 상술한 본 발명에 관련되는 수식 아미노산의 치환기를 나타낸다.

- <475> 본원 발명의 펩티드계 화합물의 염으로는 약학적으로 허용되는 염이 바람직하고, 예컨대 무기염기와 염, 유기염기와 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성아미노산과의 염 등을 들 수 있다.
- <476> 무기염기와 염의 바람직한 예로는, 예컨대 나트륨염, 칼륨염 등의 알칼리 금속염 ; 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리토금속염 ; 및 알루미늄염, 암모늄염 등을 들 수 있다.
- <477> 유기염기와 염의 바람직한 예로는, 예컨대 트리메틸아민, 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 디시클로헥실아민, N,N'-디벤질에틸렌아민 등과의 염을 들 수 있다.
- <478> 무기산과의 염의 바람직한 예로는, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염을 들 수 있다.
- <479> 유기산과의 염의 바람직한 예로는, 예컨대 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 푸말산, 옥살산, 타르타르산, 말레산, 시트르산, 숙신산, 말산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염을 들 수 있다.
- <480> 염기성아미노산과의 염의 바람직한 예로는, 예컨대 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염을 들 수 있고, 산성아미노산과의 염의 바람직한 예로는, 예컨대 아스파라긴산, 글루타민산 등과의 염을 들 수 있다.
- <481> 이들 염 중에서도 나트륨염, 칼륨염이 가장 바람직하다.
- <482> 본원 발명의 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 독성이 낮고, GH 분비 유도 작용을 갖고, 그 자체로 또는 자체 공지된 약학적으로 허용될 수 있는 담체, 부형제, 증량제 등과 혼합하여 포유동물 (예, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 원숭이 등) 에 대하여 사용할 수 있다. 투여량은 성인에 정맥주사할 경우 1 일 0.01 ~ 5mg/kg 이고, 바람직하게는 0.04 ~ 1.5mg/kg 이다. 이 양을 1 일 1 회 ~ 3 회 투여하는 것이 바람직하다. 본원 발명의 펩티드계 화합물은 약학적으로 허용되는 담체와 배합하여, 정제, 캡슐제, 과립제, 산제 등의 고형 제제 ; 또는 시럽제, 주사제 등의 액상 제제로 하여 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다.
- <483> 약학적으로 허용되는 담체로는, 제제 소재로서 관용의 각종 유기 또는 무기 담체물질이 사용되고, 고형 제제의 부형제, 활택제, 결합제, 붕괴제 ; 액상 제제의 용제, 용해보조제, 현탁화제, 등장화제, 완충제, 무통화제 등으로 배합된다.
- <484> 또 필요에 따라 방부제, 항산화제, 착색제, 감미제 등의 제제첨가물을 사용할 수도 있다.
- <485> 부형제의 바람직한 예로는, 예컨대 젓당, 백당, D-만니톨, 전분, 결정 셀룰로오스, 경질 무수규산 등을 들 수 있다. 활택제의 바람직한 예로는, 예컨대 스테아린산마그네슘, 스테아린산칼슘, 톨크, 콜로이드실리카 등을 들 수 있다.
- <486> 결합제의 바람직한 예로는, 예컨대 결정 셀룰로오스, 백당, D-만니톨, 텍스트린, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈 등을 들 수 있다.
- <487> 붕괴제의 바람직한 예로는, 예컨대 전분, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 크로스카르멜로오스나트륨, 카르복시메틸스타치나트륨 등을 들 수 있다.
- <488> 용제의 바람직한 예로는, 예컨대 주사용수, 알코올, 프로필렌글리콜, 마크로골, 참기름, 옥수수기름 등을 들 수 있다.
- <489> 용해보조제의 바람직한 예로는, 예컨대 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, D-만니톨, 벤조산벤질, 에탄올, 트리스아미노메탄, 콜레스테롤, 트리에탄올아민, 탄산나트륨, 시트르산나트륨 등을 들 수 있다.
- <490> 현탁화제의 바람직한 예로는, 예컨대 스테아릴트리에탄올아민, 라우릴황산나트륨, 라우릴아미노프로피온산, 레시틴, 염화벤잘코늄, 염화벤제토늄, 모노스테아린산글리세린 등의 계면활성제 ; 예컨대 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등의 친수성 고분자 등을 들 수 있다.
- <491> 등장화제의 바람직한 예로는, 예컨대 염화나트륨, 글리세린, D-만니톨 등을 들 수 있다.
- <492> 완충제의 바람직한 예로는, 예컨대 인산염, 아세트산염, 탄산염, 시트르산염 등의 완충액 등을 들 수 있다.
- <493> 무통화제의 바람직한 예로는, 예컨대 벤질알코올 등을 들 수 있다.

- <494> 방부제의 바람직한 예로는, 예컨대 파라옥시벤조산에스테르류, 클로로부탄올, 벤질알코올, 페네틸알코올, 데히드로아세트산, 솔빈산 등을 들 수 있다.
- <495> 항산화제의 바람직한 예로는, 예컨대 아황산염, 아스코르빈산 등을 들 수 있다.
- <496> 상기 의약 조성물은 GH 투여에 의한 효과와 동등 이상의 효과를 가져와, GH 투여에 의해 일어나는 여러가지 부작용도 저감시킬 수 있다.
- <497> 해당 의약 조성물을 적용할 수 있는 질환 또는 그 효과는, GH 결손 또는 저하가 관계되는 것으로서, 예컨대 소인증, 정상인에서의 골아세포 및 골 재구성의 활성화, GH 결핍증 성인에서의 근육량 및 근력의 증강, GH 결핍증 성인에서의 운동능력의 향상, 소아의 중도 화상 치유, 배란유발에서의 고난도트롬핀과의 병용, 프레도니손 투여에 의한 단백질 대사 이상의 예방, 중도 면역 부전증의 T 세포 「교육」의 촉진, 노인성 체중감소, 지방 조직 확대 및 피부 위축을 억제하는 효과 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- <498> 또 GH 결손 또는 저하와 직접 관계되지 않는 질환 또는 효과로서는, 예컨대 실시예 7에 기재된 바와 같이, 해당 의약 조성물은 박동량의 증가 효과가 있기 때문에, 심부전 등의 심질환의 치료에 효과가 있다.
- <499> 해당 의약 조성물의 효과는 인간에게만 한정되지 않는다. 즉, 동물의 성장촉진, 식욕 증진, 비계의 저감 등, GH 투여와 동등 이상의 효과가 있다.
- <500> 또, 예컨대 실시예 13에 기재된 바와 같이, 본 발명에 관련되는 의약 조성물은 뇌실내투여 및 정맥내투여에 의해 식욕 증진 작용이 있는 점에서, 식욕부진이나 거식증을 치료하기 위한 식욕증진제로 사용할 수도 있다.
- <501> 또한, 예컨대 실시예 14에 기재된 바와 같이, 본 발명에 관련되는 의약 조성물은 위운동 및 위산분비를 촉진시키는 작용이 있는 점에서, 비례양성 소화불량, 돌발성 경증 위아토니, 기능성 소화불량 및 역류성 식도염 등의 위 기능성 질환의 치료제로서 사용할 수도 있다.
- <502> 또한, 예컨대 실시예 15에 기재된 바와 같이, 본 발명에 관련되는 의약 조성물은 정맥내투여에 의해 골수, 십이지장 및 공장에서 세포 증식 촉진 작용이 확인된 점에서, 장관점막 보호제, 경정맥 영양시의 소장점막 장해 예방제 및 골다공증 치료제로서 사용할 수 있다.
- <503> 또 상기 의약 조성물은 이하와 같은 질환의 치료 또는 신체 상태의 개선에 효과가 있다.
- <504> 예컨대, 고령자의 성장호르몬 방출의 자극처리, 당질 코르티코이드의 이화부작용의 예방, 오스테오포로시스(osteoporosis)의 예방과 치료, 면역계의 자극, 손상치유의 촉진, 골절 수복의 촉진, 성장지체의 치료, 성장지체에 기인하는 신부전 또는 기능부전의 치료, 성장호르몬 결손 아동을 포함하는 생리학적 부족 상태 및 만성 질환에 관련된 부족 상태의 치료, 비만 및 비만에 관련된 성장 지체의 치료, 프래더윌리 증후군 및 터너 증후군에 관련된 성장 지체의 치료, 화상 환자의 회복 촉진 및 입원 삭감, 자궁내 발육 지체, 골격 형성 이상, 고 코르티코이드증 및 쿠싱 증후군의 치료, 박동성 성장호르몬 방출의 유도, 스트레스 환자의 성장호르몬의 대용, 골연골 형성 이상, 누난 증후군, 정신분열증, 우울증, 알츠하이머병, 지연 손상 치유 및 심리사회적 박탈의 치료, 폐 기능부전 및 호흡기 의존증의 치료, 대수술 후의 단백질 이화 반응의 감소, 암이나 에이즈(AIDS)와 같은 만성 질환에 의한 단백질 손실 및 약액질의 감소, 체도 세포증을 포함하는 고인슐린 혈증의 치료, 배란 유발을 위한 에슈버트 요법, 흉선의 발육을 자극하기 위해 그리고 연령 증가에 따른 흉선 기능의 쇠퇴를 방지하기 위해, 면역 억제 환자의 치료, 근육 강도, 운동성의 향상, 고령자에서의 피부 두께, 대사항상성, 신항상성의 유지, 골아세포, 골 재조형 및 연골성장의 자극 등을 들 수 있다.
- <505> 또 동물에서도 이하와 같은 효과가 기대된다. 예컨대 동물 성장의 속도 증가, 동물의 젖 생산 또는 수모 생산 증가, 애완 동물의 면역계의 자극, 애완 동물의 고령질환의 치료, 가축의 성장촉진 및 양의 증모 등을 들 수 있다.
- <506> 본원 발명에 의한 Ca 상승 활성 또는 GH 분비 유도 활성을 갖는 지방산 수식 펩티드를 항원으로 하는 항체는, 공지된 방법으로 취득할 수 있다. 해당 항체는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체 중 어느 것이어도 되고, 이들 취득에 대해서도 공지된 방법을 이용할 수 있다. 또 이들의 항체를 사용한 지방산 수식 펩티드의 측정 방법 및 해당 측정법을 이용한 측정 키트의 작성도 공지된 방법을 이용할 수 있다.
- <507> 또 실시예 17에 기재된 바와 같이, 그렐린의 아미노 말단측 및 카르복실 말단측의 펩티드에 대한 항체를 작성하고, 전자가 3 위 세린을 수식하고 있는 지방산을 특이적으로 인식하는 것을 이용하여, 지방산으로 수식된 그렐린과 지방산이 탈리된 그렐린을 분별 정량하는 것에 이용할 수도 있다.

- <508> 이 그랜린의 아미노 말단측에 대한 항체 또는 카르복실 말단측의 펩티드에 대한 항체는, 공지된 방법으로 취득할 수 있고, 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체 중 어느 것이어도 된다.
- <509> 동일하게 하여, 아미노 말단의 3 번째에 수식 아미노산을 갖는 본 발명에 관련된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염에 있어서, 3 위 아미노산 잔기의 측쇄, 바람직하게는 지방산을 특이적으로 인식하고, 아미노 말단측의 펩티드에 결합하는 항체를 만들 수 있다. 또한 동일하게 하여, 본 발명에 관련된 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염에서 수식 아미노산을 갖는 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 만들 수도 있다.
- <510> 상기와 같이, 수식 아미노산 측쇄를 특이적으로 인식하는 항체와, 수식 아미노산 또는/및 비아미노산 화합물 이외의 아미노산 또는 이들을 함유하지 않는 펩티드를 인식하는 항체, 바람직하게는 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염의 카르복실 말단측의 펩티드에 대한 항체를 조합하여 이루어지는 검사 키트도 본 발명에 포함된다.
- <511> 또 이 검사 키트를 이용하여, 수식 아미노산, 바람직하게는 아실화된 아미노산을 갖는 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염과, 수식 아미노산을 갖지 않는 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물 또는 그 약리학적으로 허용되는 염을 분리 검출하는 어세이 방법도 본 발명에 포함된다.
- <512> 상기 어세이 방법 또는 검사 키트에 대하여, 구체적 태양을 이하에 서술한다. 단, 본 발명은 이하의 태양에 한정되지 않는다.
- <513> 즉, 상기 어세이 방법으로는, 예컨대 (i) 본 발명의 펩티드계 화합물 등에 대한 항체와, 피검액 중의 피검물질과 표식화된 본 발명의 펩티드계 화합물 등을 경합적으로 반응시켜, 이 항체에 결합된 표식화된 본 발명의 펩티드계 화합물 등의 비율을 측정하는 것을 특징으로 하는 피검액 중의 본 발명에 관련되는 펩티드계 화합물 등의 정량법, 및 (ii) 피검액과 담체 상에 불용화된 본 발명의 항체 및 표식화된 다른 본 발명의 항체를 동시 또는 연속적으로 반응시킨 후, 불용화 담체 상 표식제의 활성 또는/및 불용화 담체상에 포착되지 않았던 표식제의 활성을 측정하는 것을 특징으로 하는 피검액 중의 본 발명의 단백질 등의 정량법을 들 수 있다. 상기 (i) 및 (ii)의 정량법에 있어서는, 한쪽의 항체가 본 발명의 단백질 등의 아미노 말단측을 인식하는 항체이고, 다른 한쪽의 항체가 본 발명의 단백질 등의 카르복실 말단측에 반응하는 항체인 것이 바람직하다.
- <514> 또, 본 발명의 펩티드계 화합물 등의 어세이 방법으로서, 이 화합물에 대한 모노클로날 항체 (이하 항단백질항체로 칭하는 경우가 있음)를 사용하여 본 발명의 단백질 등의 정량을 실행할 수 있는 것 외에, 조직 염색 등에 의한 검출을 실행할 수도 있다.
- <515> 이들 목적에는 항체 분자 그 자체를 사용하여도 되고, 또 항체 분자의 $F(ab')_2$, Fab' 또는 Fab 획분을 사용하여도 된다.
- <516> 상기 항체를 사용하는 본 발명의 펩티드계 화합물 등의 정량법은, 특별히 제한되지 않고, 피측정액 중의 항원량 (예컨대 단백질량)에 대응한 항체, 항원 또는 항체-항원 복합체의 양을 화학적 또는 물리적 수단으로 검출하고, 이것을 이미 알려진 양의 항원을 함유하는 표준액을 사용하여 제작한 표준곡선에서 산출하는 측정법이면, 어느 측정법을 사용하여도 된다. 예컨대, 네프로메트리, 경합법, 이뮤노메트릭법 및 샌드위치법이 바람직하게 사용되지만, 감도, 특이성의 점에서 후술하는 샌드위치법을 이용하는 것이 특히 바람직하다.
- <517> 본 발명에 관련되는 어세이 방법 중 표식물질을 사용하는 측정법에 사용되는 표식제로서는, 예컨대, 방사성 동위원소, 효소, 형광물질, 발광물질 등이 사용된다.
- <518> 방사성 동위원소로는, 예컨대 ^{125}I , ^{131}I , 3H 또는 ^{14}C 등을 사용할 수 있다.
- <519> 상기 효소로서는, 안정적이고 비활성(比活性)이 큰 것이 바람직하고, 예컨대 β -갈락토시다아제, β -글루코시다아제, 알칼리포스파타아제, 퍼옥시다아제, 말산탈수효소 등이 사용된다.
- <520> 형광물질로는, 예컨대 플루오레스카민, 플루오렛센이소티오시아네이트 등이 사용된다.
- <521> 발광물질로는, 예컨대 루미놀, 루미놀 유도체, 루시페린, 루시게닌 등이 사용된다.
- <522> 또한 항체 또는 항원과 표식제의 결합에 비오틴-아비딘계를 사용할 수도 있다.
- <523> 이하 실시예에 따라 발명의 상세한 설명을 서술한다. 분자생물학적 수법은 특별히 언급이 없는 한, Molecular

Cloning (Sambrook et al., 1989) 에 따른다.

실시예

<524> 실시예 1 GHS-R 발현세포주의 제작과 Ca 상승 활성의 측정

<525> GH 분비 유도 인자 (GHS) 가 GHS 리셉터 (GHS-R) 에 결합함으로써 발생하는 세포내 칼슘 이온 농도의 상승 (Ca 상승 활성) 을 어세이하기 위해, 이하와 같은 방법으로 래트 GHS-R 을 발현하고 있는 세포주를 제작하였다. 래트 GHS-R 의 전장 cDNA 는 래트 뇌유래의 cDNA 를 주형으로 하여, RT-PCR (역전사효소-폴리머라아제 체인 리액션) 에 의해 취득하였다. 공지된 래트 GHS-R 의 염기 서열 [K. K. McKee, et al, Molecular Endocrinology 11, 415-423 (1997).] 에서 이하의 염기 서열로 이루어지는 센스 및 안티센스 프라이머를 합성하였다.

<526> 센스 프라이머 : 5'-ATGTGGAACGCGACCCCCAGCGA-3'

<527> 안티센스 프라이머 : 5'-ACCCCCAATTGTTTCCAGACCCAT-3'

<528> 증폭된 cDNA 를 벡터 pcDNAIII (Invitrogen 사) 에 연결하여, 발현 벡터 GHSR-pcDNAIII 를 제작하였다. 해당 발현 벡터로 CHO 세포를 형질전환하고, GHS-R 을 안정적으로 발현하는 형질전환세포를 1μg/ml 의 G418 을 함유하는 배지에서 선택하였다. 선택된 세포주 CHO-GHSR62 는 10^{-10} ~ 10^{-9} M 의 GHRP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) 에 응답하였다. 세포내 칼슘 이온 농도의 변화 (Ca 상승 활성) 는, FLIPR 시스템 (Molecular Device 사) 으로 측정하였다. 측정전에 4×10^4 의 CHO-GHSR62 세포를 벽면이 검은 색인 96 구멍 마이크로 플레이트 (Corning 사) 에 심어 12 ~ 15 시간 배양하였다. 세포를 4μm 의 형광색소 Fluo4 (Molecular Probe 사) 에 1 시간 보존하여, 20mM Hepes ([N-2-hydroxyethyl]-piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid]) 와 2.5 mM 프로베네시드를 함유하는 Hank's BSS (Hank's Balanced Salt Solution) 로 4 회 세정하고, 시료를 첨가하여 형광의 변화를 측정함으로써 Ca 상승 활성을 어세이하였다.

<529> 실시예 2 내재성 GH 분비 유도 펩티드의 정제

<530> 실시예 1 에 기재된 CHO-GHSR62 세포를 이용하여, 래트 유래의 각종 조직·장기에 대하여, Ca 상승 활성을 조사한 결과, 래트 위 유래의 펩티드 추출물이 0.5mg 상당에서도 강한 Ca 상승 활성을 갖는 것을 알 수 있었다. 따라서, 여러 종류의 크로마토그래피를 사용하여 래트 위 추출물에서 이하의 방법으로 Ca 상승 활성을 갖는 펩티드를 정제하였다.

<531> 신선한 래트의 위 40g 을, 혼재하는 프로테아제를 실험시키기 위해, 5 배량의 비등수 중에서 5 분간 끓였다. 냉각 후, 끓인 시료를 1M AcOH-20 mM HCl 에 조정하여 폴리트론·믹서를 이용하여 펩티드를 추출하였다. 추출액을 11,000 rpm, 30 분간 원심하고, 상등액을 에바포레이터(evaporator)로 약 40ml 로 농축하였다. 농축액에 아세톤을 66% 로 되도록 첨가하여 아세톤 침전을 실행하고, 발생한 침전을 제거한 후, 상등액의 아세톤을 증발시켰다. 상등액을 0.1% TFA (트리플루오로아세트산) 로 평형화시킨 10g 의 Sep-Pak C18 카트리지 (Waters 사 제조) 에 첨가하여 10% CH₃CN/0.1% TFA 로 세정 후, 60% CH₃CN/0.1% TFA 로 용출시켰다. 용출액의 용매를 증발시킨 후, 동결 건조를 실행하였다. 시료를 1M AcOH 에 용해하고, 1M AcOH 로 평형화시킨 SP-Sephadex C-25 (H⁺ 형) 에 흡착시켰다. 1M AcOH, 2M 피리딘 및 2M 피리딘-AcOH (pH 5.0) 로 단계적으로 용출시킴으로써, SP-I, SP-II 및 SP-III 의 3 개의획분을 각각 얻었다. SP-III 획분을 Sephadex G-50 겔 여과 컬럼에 걸어, 각각의 획분의 일부에 대하여 CHO-GHSR62 세포를 사용한 Ca 상승 활성의 어세이를 실행하였다. Sephadex G-50 컬럼 크로마토그래피의 결과를 도 1a 에 나타냈으나, 분자량 약 3,000 에 상당하는 활성 획분 (도 1a 중, 프랙션 43-48) 을 TSK CM-2SW 컬럼 (4.6 × 250mm, Tosoh 사 제조) 을 이용하여 pH 6.4 에서, CM-이온교환에 의한 HPLC (고속액체 크로마토그래피) 로 분획하였다. CM-HPLC 에서의 활성 분획을 동일 컬럼을 이용하여, pH 4.8 에서 2 차 CM-HPLC 로 분획하였다 (도 1b). 활성 획분 (도 1b 중, 용출시간 55-56분) 을 μBondasphere C-18 컬럼 (3.9 × 150mm, Waters 사 제조) 을 이용한 역상 HPLC 에 의해 단일로 될 때까지 정제하였다. 40g 의 래트에서 16μg 의 Ca 상승 활성을 갖는 펩티드를 정제하여 그렐린 (ghrelin) 이라고 명명하였다.

<532> 실시예 3 그렐린의 구조 해석

<533> 정제한 래트 유래 그렐린의 아미노산 서열을 펩티드·시퀀서 (ABI 494, Applied Biosystems 사) 로

결정하였다. 그렐린은 Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg (Xaa 는 미동정 아미노산) 의 서열로 이루어지는 28 아미노산 잔기로 구성되는 펩티드이었다. Xaa 는 래트 cDNA 의 염기 서열에 있어서 Ser 이고, 해당 펩티드에 있어서는 Ser 이 어떠한 수식을 받고 있는지를 알 수 있었다.

<534> 따라서, 아미노 말단에서 3 번째 세린이 수식되어 있지 않은 비수식 그렐린을 펩티드 합성기 (ABI 433A, Applied Biosystems 사) 로 화학 합성하였다. 비수식 합성 그렐린의 역상 HPLC 에서의 용출시간은, 천연형 그렐린과 크게 달랐으므로 (도 2a), 비수식 합성 그렐린은 천연형 그렐린보다도 현저하게 친수성인 것을 알 수 있었다.

<535> 이상의 결과로부터, 천연형 그렐린의 아미노 말단에서 3 번째 세린 (세린 3) 은 소수성의 잔기로 수식되어 있는 것을 알 수 있었다.

<536> 세린 3 의 수식기를 명확하기 하기 위해, 정제한 그렐린을 전자 스프레이 이온화 매스 분석기 (ESI-MS) 분석하였다. 관측된 천연형 그렐린의 분자량 (3314.9 ± 0.7) 은 cDNA 의 염기 서열로부터 얻어진 비수식 그렐린 펩티드의 분자량 (3188.5) 보다 126 큰 것이었다. 이상의 결과로부터, 천연형 그렐린은 세린 3 의 수산기가 n-옥타노일 (C8:0) 지방산으로 수식되어 있는 것을 알 수 있었다.

<537> 이것을 확인하기 위해, n-옥타노일 (C8:0) 그렐린 펩티드를 화학 합성하여, 역상 HPLC 에서의 용출 시간을 조사하였다. n-옥타노일 (C8:0) 펩티드의 화학 합성은, 세린 3 의 수산기 이외의 모든 관능기를 보호한 펩티드를 펩티드 합성기 (ABI 433A, Applied Biosystems 사) 를 사용하여 Fmoc 고상법으로 합성하고, 세린 3 의 수산기를 4-(디메틸아미노)피리딘의 존재하에서, n-옥탄산과 에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드로 아실화하여 합성하였다. 합성한 n-옥타노일펩티드는 정제한 천연형 그렐린과 동일한 용출시간이었다 (도 2a).

또한 합성 n-옥타노일펩티드 및 천연형 그렐린을 키모트립신 처리하여 얻어지는, 아미노 말단에서 4 번째까지의 펩티드 단편 (Gly 1 - Phe 4) 은 역상 HPLC 에서 동일한 용출시간을 나타냈다.

<538> 이상의 결과로부터, 래트 유래의 천연형 그렐린은 서열번호 2 에 기재된 아미노산 서열을 갖고, 세린 3 의 수산기가 n-옥탄산 (카프릴산) 으로 아실화된 구조 (도 2c) 인 것으로 결론되었다.

<539> 또 인간 그렐린을 인간 위 추출물에서 정제하고, 그 구조가 서열번호 3 에 기재된 아미노산 서열을 갖고, 아미노 말단에서 3 번째 세린 측쇄의 수산기가 n-옥탄산 (카프릴산) 으로 아실화된 구조인 것을 알 수 있었다 (도 4a).

<540> 또한 상기 래트 및 인간 유래의 그렐린의 구조는 도 1b 중의 활성 획득 중 최초의 피크 획득 (용출 시간 55-56분) 을 정제한 것의 구조이지만, 도 1b 의 다른 활성 획득에 대해서도 정제 후, 상기와 동일한 방법으로 구조 해석을 실행한 결과, 세린 3 을 수식하고 있는 지방산은 카프릴산 (C8:0) 이외에, 카프릴산의 모노엔산 (C8:1), 카프린산 (C10:0) 및 그 모노엔산 (C10:1) 및 라우릴산 (C12:0) 및 그 모노엔산 (C12:1) 이 있는 것을 알 수 있었다.

<541> 또 닭, 토끼 및 개구리의 그렐린을 실시예 2 와 동일한 방법으로 위 추출물에서 정제하고, 또한 실시예 3 과 동일한 방법으로 구조 해석하였다. 그 구조는 닭의 그렐린은 서열번호 25 에 기재된 아미노산 서열, 토끼의 그렐린은 서열번호 26 에 기재된 아미노산 서열, 개구리의 그렐린은 서열번호 27 에 기재된 아미노산 서열을 갖고, 모두 아미노 말단에서 3 번째 세린 측쇄의 수산기가 n-옥탄산 (카프릴산) 으로 아실화된 구조인 것을 알 수 있었다.

<542> 또한, 아프리카산 발톱개구리, 옥새송어 및 개의 그렐린을 실시예 2 와 동일하게 하여 위 추출물에서 정제하고, 또한 실시예 3 과 동일하게 하여 구조 해석하였다.

<543> 그 구조는, 아프리카산 발톱개구리의 그렐린은 서열번호 28 에 기재된 아미노산 서열, 옥새송어의 그렐린은 서열번호 29 및 30 에 기재된 아미노산 서열, 개의 그렐린은 서열번호 31 에 기재된 아미노산 서열을 갖고, 모두 아미노 말단에서 3 번째 세린 측쇄 또는 트레오닌 측쇄의 수산기가 n-옥탄산 (카프릴산) 으로 아실화된 구조인 것을 알 수 있었다.

<544> 또한 옥새송어로부터는, 서열번호 29 에 기재된 23 아미노산 잔기로 이루어지는 그렐린-23 과, 서열번호 30 에 기재된 20 아미노산 잔기로 이루어지는 그렐린-23 이 얻어졌다.

<545> **실시예 4 그렐린의 Ca 상승 활성**

- <546> 천연형 그렐린 및 n-옥타노일 수식 합성 그렐린은 Ca 상승 활성을 갖고 있으나, 비수식 합성 그렐린은 Ca 상승 활성을 현저하게는 나타내지 않았다 (도 2b). 또 n-옥탄산 또는 n-옥탄산과 비수식 합성 그렐린의 혼합물은 Ca 상승 활성을 현저하게는 나타내지 않았던 점에서, 천연형 그렐린의 n-옥탄산기는 Ca 상승 활성에 중요한 구조인 것을 알 수 있었다. 이후, 그렐린이란 [0-n-옥타노일-세린3]-그렐린 (도 2c) 을 말한다.
- <547> 그렐린은 CHO-GHSR62 세포에서 GHRP-6 보다도 높은 세포내 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성 (Ca 상승 활성) 을 나타냈으나, GHRH (GH 방출 호르몬, 도 3a 에서는 GRF) 는 Ca 상승 활성을 나타내지 않았다 (도 3b). 그렐린의 Ca 상승 활성은 10^{-11} M 에서 확인되고, EC_{50} 는 2.5nM 이었다. GHS-R 의 특이적 안타고니스트인 [D-Lys3]-GHRP-6 [R.G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)] 10^{-4} M 의 존재하에서, 그렐린에 의한 Ca 상승 활성은 억제되고, 고농도의 그렐린에서는, 안타고니스트 비존재하에서의 Ca 상승 활성으로 회복된다 (도 3b). 이상의 결과는, 그렐린의 Ca 상승 활성이 GHS-R 의 특이적 안타고니스트에 의해 길항적으로 저해되는 것을 나타내고 있다.
- <548> **실시예 5 그렐린 전구체 cDNA 와 그의 각종 장기에서의 발현**
- <549> 그렐린의 아미노산 서열은 공지된 어떠한 펩티드의 아미노산 서열과도 상동성을 나타내지 않았으나, GenBank 데이터 베이스를 호몰로지 검색한 결과, 래트 EST (Expressed Sequence Tag) 서열의 하나 (GenBank 수리번호 AI549172) 에 동일한 서열이 확인되었다. 이 EST 서열을 근거로 이하의 PCR 프라이머를 합성하였다.
- <550> 센스 프라이머 : 5'-TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA-3'
- <551> 안티센스 프라이머 : 5'-AGTTGCAGAGGAGGCAGAAGCT-3'
- <552> 래트 위 유래의 cDNA 를 주형에 상기의 2 개의 프라이머를 사용하여 RT-PCR 을 실행하였다. PCR 의 조건은, 1 사이클로 98℃ 에서 10초간, 55℃ 에서 30초간, 72℃ 에서 1분간을, 35 사이클 실행하였다. 증폭된 DNA 단편을 프로브로하여, 래트 위 cDNA 라이브러리를 스크리닝하였다. 약 2×10^5 의 재조합 퍼지를 스크리닝하여, 래트 유래 그렐린을 코드하는 전장 cDNA 를 취득하였다.
- <553> 래트 그렐린 cDNA 는 서열번호 6 에 기재된 501 염기로 이루어지고, 117 아미노산 (도 4a) 으로 이루어지는 그렐린 전구체 (prepro-ghrelin) 를 코드하였다. 그렐린 전구체의 아미노 말단의 23 아미노산 잔기는 시그널 펩티드의 성질을 구비하였다. 그렐린은 글리신 24 에서 시작되어, 성숙형 그렐린의 최후 2 개의 아미노산 (Pro-Arg) 은 프로테아제에 의한 절단을 받는 서열이었다.
- <554> 래트 그렐린 cDNA 를 사용하여, 저 스트리젠트 조건에서 인간 위 cDNA 라이브러리를 스크리닝하여, 전장 인간 그렐린 cDNA 를 취득하였다. 인간의 위 cDNA 라이브러리는, 인간의 위 poly(A)⁺RNA (Clontech 사) 에서 cDNA 합성 키트 (Pharmacia 사) 를 사용하여 제작하였다. 취득한 전장 인간 그렐린 cDNA 는 서열번호 7 에 기재된 511 염기로 이루어지고, 117 아미노산 (도 4a) 으로 이루어지는 인간 그렐린 전구체 (prepro-ghrelin) 을 코드하였다. 래트 및 인간 유래의 그렐린 전구체의 아미노산 서열은, 82.9% 의 동일성을 나타내고, 그렐린은 생물종 사이에서 고도로 보존되어 있는 것이 판명되었다.
- <555> 그렐린의 조직간 분포를 알기 위해, 래트의 여러가지 조직에서 단리된 poly(A)⁺RNA 을 해석하였다 (도 4b). 래트 조직의 노던 블롯 해석에 의해, 0.62kb 의 그렐린 전구체 mRNA 가 위에서 확인되었다. 심실 (Ventricle) 에도 2 개의 희미한 밴드가 확인되었으나, 이들은 6.2kb 및 1.2kb 의 mRNA 로서, 위에서의 mRNA 보다도 크고, 위와는 다른 mRNA 의 스프라이싱이 추정되었다. 이상의 결과로부터 그렐린의 주된 발현 부위는 위인 것을 알 수 있었다.
- <556> **실시예 6 그렐린의 하수체 호르몬 분비의 효과**
- <557> 그렐린이 GH 분비 유도 활성을 갖고 있는지를 in vitro 및 in vivo 에서 조사하였다. 먼저 in vitro 에서의 어세이로서, 하수체 전엽의 초기 배양 세포에 대한 그렐린의 효과를 조사하였다. 생후 2 주된 웅성 SD 래트에서 하수체 전엽을 채취하여, 콜라게나아제 처리로 분산시킨 후, 세포를 모아, 10% FCS (소태아혈청) 와 항생 물질을 포함하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) 배지에서 2 회 세정하고, DMEM 배지에 현탁하여, 하수체 전엽 초기 배양세포를 조제하였다. 5×10^4 의 세포를 폴리-D-라이신으로 코팅한 96 구멍의 세포 배양 플레이트에 심어 3 ~ 4 일간 배양하였다. 배양액을 0.1ml 의 시료를 함유하는 DMEM 배지와 교환하고, 37℃ 에서 15 분간 보존하였다. 배양액의 일부를 채취하여, 라디오이뮤노어세이에 의해, 배양액 중의 각종 하

수체 호르몬의 농도를 측정하였다. 하수체 호르몬 중, GH, FSH, LH, PRL, TSH 는 Biotrak/Amersham 사 제조 키트를 이용하였고, ACTH 는 Peninsula Laboratories 사 제조의 고감도 EIA 키트를 사용하였다.

<558> 그렐린을 하수체 전엽 초기 배양 세포에 첨가하면 세포내 칼슘 이온 농도의 상승이 확인되고, 비수식 합성 그렐린에서도 약하지만 Ca 상승 활성이 확인되었다 (도 5a). 이 결과는, 그렐린 및 비수식 합성 그렐린이 하수체 세포에 직접 작용하는 것을 나타낸다. 다음에, 하수체 전엽 초기 배양세포를 사용하여 그렐린의 GH 분비 유도 활성을 조사한 결과, 10^{-6} M 의 그렐린의 첨가에 의해 배양액 중의 GH 농도만이 농도의존적으로 증가하고, 다른 하수체 호르몬 (FSH, LH, PRL, TSH) 의 농도증가는 확인되지 않았다 (도 5b).

<559> 그렐린의 GH 분비 유도 활성을 in vivo 에서 조사하였다. 합성 그렐린 $10 \mu\text{g}$ 을 웅성 래트 (250g) 의 정맥에 주사한 후, 60 분까지 경시적으로 혈액을 채취하여, 혈장 중의 하수체 호르몬의 농도를 상기 라디오이뮤노어세이에 의해 측정하였다. 하수체 호르몬 중, GH 만이 혈액중에 방출되어, 그렐린의 정맥주사후 5 ~ 10 분에서 최고값에 도달하였다. 이 결과로부터, 위에서 혈액 중에 방출된 그렐린이 하수체 전엽 세포에 작용하여, 혈액 중에 GH 를 방출하는 것을 알 수 있고, 그렐린이 미동정되었던 특이적인 내재성 GH 분비 유도 물질인 것이 확인되었다.

<560> 실시예 7 래트에서의 심박출량 증가

<561> 마취하의 래트를 이용하여 심혈관계에 미치는 그렐린 급성 투여의 효과를 조사하였다. 체중 220-250g 의 Wistar 계 웅성 래트 (케아리) 를 이용하여, 심혈관계에 미치는 그렐린 급성 투여의 효과를 검토하기 위해 래트를 무작위로 4 군 ($10, 1, 0.5, 0.2 \mu\text{g}$ 투여군) 으로 나누었다. 그렐린은 생리식염수로 희석하고, 래트 1 마리의 투여량을 $10, 1, 0.5, 0.2 \mu\text{g}$ 으로 조정하여, 심박출량 측정을 위한 우충경정맥에 삽입한 인젝션 튜브 (PE50) 에서 $120 \mu\text{l}$ 급성 투여하였다.

<562> 동력학적 지표로서 전신혈압, 심박출량을 측정하고, 또한 말초혈관 저항값을 산출하였다. 래트를 펜토바르비탈 (pentobarbital) 로 마취한 후, 배위(背位)로 고정하였다. 평균 혈압 측정을 위해, 우대퇴동맥에 헤파린으로 채운 폴리에틸렌카닐레 (PE50) 를 삽입하였다. 심박출량의 측정은 열회석식 심박출량계 (CARDIOTHER M500R) 를 이용하여 측정하였다. 우충경정맥에 생리식염수로 채운 인젝션 튜브 (PE50) 를 삽입하여 우심실 내에 놓았다. 우충경동맥에서 마이크로 카테터를 삽입하여, 대동맥 기시부에 놓았다. 주입액은 실온 (25°C) 의 생리식염수 $100 \mu\text{l}$ 를 사용하였다. 열회석식 심박출량계의 MEASURE 스위치를 누름과 동시에 주입액 (생리식염수 $100 \mu\text{l}$) 을 주입하여 심박출량을 측정하였다. 측정은 5 회 실행하여 그 평균값을 심박출량으로 하였다. 평균혈압 및 심박출량은 그렐린 투여 전, 투여 후 1, 5, 15, 30 분의 값을 측정하였다. 말초혈관 저항은 평균혈압을 심박출량으로 나누어 산출하였다.

표 1

| | 체중(g) | 그렐린 $1 \mu\text{g}$ 투여 후의 심박출량 ($\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$) | | | | |
|-----|-------|---|------|------|-----|-----|
| | | 0분 | 1분 | 5분 | 15분 | 30분 |
| 평균 | 230 | 347 | 382 | 367 | 341 | 338 |
| SEM | 3.7 | 14.3 | 10.2 | 11.5 | 7.9 | 8.8 |

<564> 표에서 SEM 은 평균값의 표준오차 (Standard Error Heans) 를 나타낸다.

표 2

| | 체중(g) | 그렐린 $10 \mu\text{g}$ 투여 후의 심박출량 ($\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$) | | | | |
|-----|-------|--|-----|------|------|------|
| | | 0분 | 1분 | 5분 | 15분 | 30분 |
| 평균 | 237 | 350 | 390 | 392 | 370 | 344 |
| SEM | 1.0 | 8.5 | 7.4 | 15.8 | 14.7 | 13.8 |

<566> 표에서 SEM 은 평균값의 표준오차 (Standard Error Heans) 를 나타낸다.

<567> 그렐린 $1 \mu\text{g}$ 투여군 (표 1) 및 그렐린 $10 \mu\text{g}$ 투여군 (표 2) 에서, 투여 후 1 분 및 5 분에서 심박출량의 증가가 확인되었다.

실시예 8 각종 기원으로부터의 그렐린 및 그렐린-27 의 단리

래트 위 추출물에서 실시예 2 에 기재된 방법으로 Ca 상승 활성을 지표로 그렐린을 정제하였다. 2 차 CM-HPLC 에서의 활성 획득 (도 1b 중, 용출시간 59분) 을, μ Bondasphere C-18 컬럼 (3.9×150 mm, Waters 사 제조) 을 이용한 역상 HPLC 에 의해 단일로 될 때까지 정제하였다. 이 획득을 전자 스프레이 이온화 매스분석기 (ESI-MS) 로 분석한 결과, 분자량 (3187.2 ± 0.9) 의 피크가 관찰되었으나, 이 값은 28 아미노산으로 이루어지고 옥탄산 (C8) 수식된 천연형 그렐린보다도 약 126 작았다. 이 펩티드의 아미노산 서열을 펩티드·시퀀서 (ABI 494, Applied Biosystems 사) 로 측정한 결과, Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg (Xaa 는 미동정 아미노산) 의 서열로 이루어지는 27 아미노산 잔기로 구성되는 펩티드이었다. 즉 28 아미노산으로 구성되는 그렐린의 아미노 말단에서 13 번째 또는 14 번째 글루타민이 하나 결실된 아미노산 서열로 이루어졌다. 이 펩티드의 Ca 상승 활성은 실시예 9 에 나타낸 바와 같이 28 아미노산의 그렐린과 동일한 점에서, 그렐린-27 이라 명명하였다. 인간의 위 추출물에서도, 래트의 경우와 동일하게 인간·그렐린-27 을 단리하고, 서열번호 11 에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 것을 확인하였다. 또한 상기 2 차 CM-HPLC 로 64-65 분에 있는 피크 획득을 정제하고, 전자 스프레이 이온화 매스분석기 (ESI-MS) 로 분석한 결과, 분자량 (3341.4 ± 0.9) 의 피크가 관측되었다. 이 지방산 수식 펩티드는 28 아미노산으로 이루어지는 점에서, 그렐린 (28 아미노산) 의 아미노 말단에서 3 번째 세린이 데칸산 (C10) 으로 수식된 것임을 알 수 있었다.

그렐린 27 전구체를 코드하는 cDNA 를, 실시예 5 에서 작성한 래트 위 cDNA 라이브러리에서 실시예 5 에서 작성한 PCR 증폭 DNA 단편을 프로브한, 플라크 하이브리다이제이션으로 클로닝하였다. cDNA 의 염기 서열을 결정하고, 그렐린-27 전구체를 코드하는 것을 확인하였다. 얻어진 그렐린-27 전구체 cDNA 는 서열번호 14 에 기재된 염기 서열로 이루어지고, 서열번호 12 에 기재된 아미노산 서열을 갖는 116 아미노산으로 이루어지는 그렐린-27 전구체를 코드하였다. 또 상기와 완전히 동일한 방법으로 인간·그렐린-27 전구체 cDNA 를 클로닝하고, 서열번호 15 에 기재된 염기 서열로 이루어지고, 서열번호 13 에 기재된 아미노산 서열을 갖는 116 아미노산으로 이루어지는 인간·그렐린-27 전구체를 코드하는 것을 알 수 있었다.

돼지 유래의 그렐린 및 그렐린-27 의 전구체를 코드하는 cDNA 를, 돼지 cDNA 라이브러리로부터 실시예 5 에 기재된 방법에 의해, 실시예 5 에 기재된 PCR 증폭 DNA 단편을 프로브한 플라크 하이브리다이제이션으로 클로닝하였다. 얻어진 cDNA 클론의 염기 서열을 결정하고, 돼지·그렐린 전구체 또는 돼지·그렐린-27 전구체를 코드하는 것을 확인하였다. 얻어진 돼지·그렐린 전구체 cDNA 는 서열번호 20 에 기재된 염기 서열로 이루어지고, 서열번호 18 에 기재된 아미노산 서열을 갖는 118 아미노산으로 이루어지는 그렐린 전구체를 코드하였다. 또 돼지·그렐린-27 전구체 cDNA 는 서열번호 21 에 기재된 염기 서열로 이루어지고, 서열번호 19 에 기재된 아미노산 서열을 갖는 117 아미노산으로 이루어지는 그렐린-27 전구체를 코드하였다. 따라서 돼지·그렐린 (28 아미노산) 및 돼지·그렐린-27 (27 아미노산) 은 각각 서열번호 16 및 17 에 기재된 아미노산 서열로 이루어진다.

토끼, 아프리카산 발톱개구리 또는 옥새송어 유래의 그렐린의 전구체를 코드하는 cDNA 를 각종 cDNA 라이브러리에서 실시예 5 에 기재된 방법에 의해, 실시예 5 에 기재된 PCR 증폭 DNA 단편을 프로브한 플라크 하이브리다이제이션으로 클로닝하였다. 얻어진 cDNA 클론의 염기 서열을 결정하고, 그렐린 전구체를 코드하는 것을 확인하였다.

얻어진 토끼·그렐린 전구체 cDNA 는 서열번호 36 에 기재된 염기 서열로 이루어지고, 아프리카산 발톱개구리·그렐린 전구체 cDNA 는, 서열번호 37 에 기재된 염기 서열로 이루어지고, 옥새송어·그렐린 전구체 cDNA 는 서열번호 38 또는 39 에 기재된 염기 서열로 이루어졌다.

또한 옥새송어로부터는 서열번호 38 에 기재된 그렐린-23 전구체를 코드하는 cDNA 와, 서열번호 39 에 기재된 그렐린-20 전구체를 코드하는 cDNA 가 얻어졌다.

상기 cDNA 염기 서열로부터, 토끼·그렐린 전구체는, 서열번호 32 에 기재된 아미노산 서열을 갖고, 아프리카산 발톱개구리·그렐린 전구체는 서열번호 33 에 기재된 아미노산 서열을 갖고, 옥새송어·그렐린 전구체는 서열번호 34 또는 35 에 기재된 아미노산 서열을 갖는 것을 알 수 있었다.

또한 옥새송어로부터는, 서열번호 34 에 기재된 그렐린-23 전구체의 아미노산 서열과, 서열번호 35 에 기재된 그렐린-20 전구체의 아미노산 서열을 알 수 있었다.

소·그렐린 전구체 cDNA 는 PCR 법으로 클로닝하였다. 즉 래트, 인간 및 돼지 유래의 그렐린 및 그렐린-27

에서 보존되어 있는 아미노산 서열을 근거로 설계한 염기 서열을 갖는 합성 DNA 를 프라이머로 하고, 소 위의 cDNA 라이브러리를 주형으로 하여 PCR 을 실행하였다. 증폭된 DNA 단편은 서열번호 24 에 기재된 염기 서열을 갖고, 서열번호 23 에 기재된 소·그렐린-27 전구체의 일부를 코드하였다. 따라서 소·그렐린-27 은 서열번호 22 에 기재된 아미노산 서열을 갖는다. 또 소 위의 cDNA 라이브러리를 주형으로 하는 상기 PCR 로 증폭된 DNA 단편 중에는, 그렐린 (28 아미노산) 전구체를 코드하는 DNA 는 없었다.

<578> 래트, 인간 및 돼지 유래의 그렐린과 래트, 인간, 돼지 및 소 유래의 그렐린-27 의 아미노산은 매우 유사하고, 특히 아미노 말단에서 10 번째까지의 아미노산 서열은 상기 7 종의 그렐린에서 완전히 일치하였다.

<579> 실시예 9 각종 그렐린 유도체의 활성 비교

<580> 래트 및 인간 유래의 그렐린을 각종 프로테아제에 의해 부분 분해한 펩티드 단편, 또는 화학 합성한 펩티드의 Ca 상승 활성을 비교함으로써, Ca 상승 활성에 필요한 코어·아미노산 서열 및 수식 지방산의 사슬길이의 최적 값을 구하였다. Ca 상승 활성은 최대값 50% 의 활성을 나타낸 그렐린의 농도 (EC50, nM) 로 나타냈다. 따라서, EC50 값이 낮을수록 활성이 높은 것이 된다.

표 3

각종 그렐린 유도체의 활성 비교

| 기원 | 배열번호 | 아미노산 | 지방산 수식 | Ca 상승 활성 (EC50, nM) | 비고 |
|----|------|--------------------|---------------|------------------------|---------|
| 인간 | 3 | 1-28 | Acyl (C : 8) | 2.6 | 천연형 그렐린 |
| 인간 | 3 | 1-15 | Acyl (C : 8) | 7.0 | |
| 인간 | 3 | 1-11 | Acyl (C : 8) | 15 | |
| 래트 | 2 | 1-28 | Acyl (C : 8) | 2.9 | 천연형 그렐린 |
| 래트 | 2 | 1-15 | Acyl (C : 8) | 8.6 | |
| 래트 | 2 | 1-11 | Acyl (C : 8) | 15 | |
| 래트 | 2 | 1-10 | Acyl (C : 8) | 19 | |
| 래트 | 2 | 1-9 | Acyl (C : 8) | 38 | |
| 래트 | 2 | 1-8 | Acyl (C : 8) | 100 | |
| 래트 | 2 | 1-4 | Acyl (C : 8) | 480 | |
| 래트 | 2 | 16-28 | Acyl (C : 8) | >10000 | |
| 래트 | 2 | (1-12)+ (14-28) | Acyl (C : 8) | 2.8 | 그렐린 -27 |
| 래트 | 2 | 1-28 | Acyl (C : 16) | 3.1 | |
| 래트 | 2 | 1-28 | Acyl (C : 10) | 2.6 | |
| 래트 | 2 | 1-28 | Acyl (C : 6) | 16 | |
| 래트 | 2 | 1-28 | Acyl (C : 4) | 280 | |
| 래트 | 2 | 1-28 | Acyl (C : 2) | 780 | |

<581> 그렐린의 Ca 상승 활성은 아미노 말단측에 존재한다. 아미노 말단에서 4 번째 아미노산까지의 펩티드에 충분한 Ca 상승 활성은 있으나, 아미노 말단에서 10 번째 아미노산까지의 펩티드이면, 천연형 그렐린에 가까운 강한 Ca 상승 활성이 있다. 또 수식 지방산의 사슬길이에 대하여, C:2 (아세틸기) 이더라도 충분한 활성은 있으나, C:8 (옥타노일기) 에서 Ca 상승 활성은 최고로 되고, 그 후 지방산의 탄소수가 C:10 (데카노일기), C:16 으로 증가하여도 강한 Ca 상승 활성은 변화하지 않는다. 즉 아미노 말단에서 3 번째 세린을 수식하고 있는 지방산은, 탄소수 8 이상이면 Ca 상승 활성이 가장 강해진다.

<583> 실시예 10 각종 그렐린 유도체 화합물의 합성

<584> (1) 펩티드 유도체 합성

<585> Fmoc-Ser(C₈H₁₇) 및 Fmoc-Ser(C₈H₁₇) 이외의 아미노산 유도체와 합성 시약을 퍼킨엘머 사, 노바비오켄 사 또는 와파나베가가꾸 가부시끼가이샤에서 구입하였다. 펩티드 사슬의 연장은 주로 퍼킨엘머 사 제조의 어플라이

드 바이오시스템 433A 합성기를 사용하고, Boc 법, 또는 Fmoc 법으로 보호 펩티드 유도체-수지를 구축하였다.

Boc 법으로 얻어진 보호 펩티드 수지는 p-크레졸 존재하, 무수 불화수소 (HF) 로 탈보호하고 펩티드를 유리시켜 정제에 사용하였다. Fmoc 법으로 얻어진 보호 펩티드 수지는 트리플루오로아세트산 (TFA), 또는 여러 가지의 스캐벤저 (scavenger) 를 함유하는 희석 TFA 로 탈보호하고, 유리된 펩티드를 정제에 사용하였다. 정제는 C4 또는 C18 을 사용한 역상 HPLC 로 실시하였다. 정제품은 역상 HPLC 로 그 순도를 확인하고, 아미노산 조성 분석 및 질량 분석으로 구조를 확인하였다.

- <586> 본 발명품의 펩티드는 통상적인 펩티드 합성법으로 제조된다. 예컨대 「생화학 실험강좌 1 단백질 화학」 제 4 권의 제 2 장, 제 3 장 (도쿄가가꾸 도진) 또는 「속 의약품 개발 14 펩티드 합성」 (히로카와 쇼팽) 등의 서적에 기재되어 있는 방법에 의해 제조할 수 있다. 따라서 본 발명품의 펩티드의 대표적인 합성예를 이하에 나타냈다. 구체적으로는, 아실화 펩티드의 합성예와 알킬화 펩티드의 합성예를 나타냈다. 또 인간 유래의 그렐린 (이하 hGhrelin 으로 약칭하는 경우도 있음) 또는 래트 유래의 그렐린 (이하 rGhrelin 으로 약칭하는 경우도 있음) 을 트립신, 또는 키모트립신, 또는 양 효소를 순서대로 작용시켜 이하의 그렐린 단편 (19. 그렐린(16-28), 20. hGhrelin(1-15), 21. rGhrelin(1-15), 23. hGhrelin(1-11), 24. rGhrelin(1-11), 25. 그렐린(1-10), 26. 그렐린(1-9), 27. 그렐린(1-8), 30. 그렐린(1-4)) 을 조제하여, 분석용 HPLC 로 단리한 것을 활성 측정에 사용하였다. 41. [N-Acety]-그렐린(1-10) 은 통상적인 방법으로 그렐린(1-10) 을 N-아세틸삭신 이미드 처리하여 조제하였다. 화합물번호 2. 래트 그렐린은 천연물을 사용, 10. [Ser³(부틸)]-rGhrelin, 11. [Ser³(헥사노일)]-rGhrelin, 12. [Ser³(데카노일)]-rGhrelin, 13. [Ser³(라우로일)]-rGhrelin, 14. [Ser³(팔미토일)]-rGhrelin 은, 화합물 1 hGhrelin 의 합성에 사용한 것과 동일한 방법으로 합성하여 활성 측정에 사용하였다.
- <587> [주된 약호]
- <588> HMP 수지 ; 4-히드록시메틸-페녹시메틸 수지
- <589> Fmoc 아미드 수지 ; 4-(2', 4'-디메톡시페닐-Fmoc-아미노메틸) 페녹시아세트아미도-에틸 수지
- <590> PAM 수지 ; 페닐아세트아미도메틸 수지
- <591> HBTU ; 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트
- <592> TBTU ; 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트
- <593> HOBt ; 1-히드록시벤조트리아졸
- <594> DCC ; 디시클로헥실카르보디이미드
- <595> DIPCI ; 디이소프로필카르보디이미드
- <596> TFA ; 트리플루오로아세트산
- <597> DIPEA ; 디이소프로필에틸아민
- <598> TIPS ; 트리이소프로필실란
- <599> Fmoc ; 플루오레닐메톡시카르보닐
- <600> Boc ; t-부틸옥시카르보닐
- <601> Trt ; 트리틸
- <602> Bu^t ; t-부틸
- <603> Pmc ; 2,2,5,7,8-펜타메틸크로만-6-술포닐
- <604> PrI ; 프로피오닐
- <605> PhPrI ; 페닐프로피오닐
- <606> Bzl ; 벤질
- <607> Bom ; 벤질옥시메틸

- <608> Tos ; 톨루엔술포닐
- <609> Cl-Z ; 2-클로로-벤질옥시카르보닐
- <610> Pis ; 2-페닐이소프로필
- <611> Mtt ; 4-메틸트리틸
- <612> DMF ; N,N-디메틸포름아미드
- <613> NMP ; N-메틸피롤리돈
- <614> DMAP ; 4-디메틸아미노피리딘
- <615> HOSu ; N-히드록시숙신이미드
- <616> Adod ; 2-아미노도데칸산
- <617> Aib ; 2-아미노이소부틸산
- <618> Ape ; 5-아미노펜탄산
- <619> Cha ; 시클로헥실알라닌
- <620> Dap ; 2,3-디아미노프로피온산
- <621> Nal ; 나프틸알라닌
- <622> Nle ; 노르류신
- <623> [합성에 사용한 보호 아미노산]
- <624> Fmoc법 :
- <625> Boc-Gly, Fmoc-Gly, Fmoc-Ser(Bu^t), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Glu(OBu^t), Fmoc-His(Boc), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Pro, Fmoc-Leu, Fmoc-Ala, Fmoc-Val, Fmoc-Phe, Fmoc-Phe, Fmoc-Ser(n-C₈H₁₇), Fmoc-Ser(n-C₈H₁₇), Fmoc-Cys(n-C₈H₁₇), Fmoc-Asp(OPis), Fmoc-Ser(Bzl), Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Dap(옥타노일), Fmoc-2-Nal, Fmoc-2-Nal, Fmoc-Nle, Fmoc-Lys(Mtt), Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Asp(O-C₇H₁₅)
- <626> Boc법 :
- <627> Boc-Gly, Boc-Ser(Bzl), Boc-Ser(Ac), Boc-Ser(Pr1), Boc-Glu(OBzl), Boc-His(Bom), Boc-Gln, Boc-Arg(Tos), Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Ala, Boc-Val, Boc-Phe, Boc-Cys(n-C₈H₁₇), Boc-Ape, Boc-Ser(n-C₈H₁₇)
- <628> [사용한 기기]
- <629> (a) 분석용 HPLC 시스템
- <630> 기기 ; 시마즈 LC-10A 시스템
- <631> 컬럼 ; YMC PROTEIN-RP (4.6mm ϕ × 150mm)
- <632> 컬럼 온도 ; 40℃
- <633> 용출액 ; 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세토니트릴 농도를 20 분간 0% 에서 50% 로 직선적으로 변화시켰음.
- <634> 유속 ; 1ml/분
- <635> 검출 ; UV (210 nm)
- <636> 주입량 ; 10 ~ 100μl
- <637> (b) 분리용 HPLC 시스템
- <638> 기기 ; Waters 600 Multisolvent Delivery System

- <639> 컬럼 ; YMC-PACK-ODS-A (5 μ m, 20mm \times 250mm)
- <640> YMC-PACK-PROTEIN-RP (5 μ m, C4, 10mm \times 250mm)
- <641> YMC-PACK-PROTEIN-RP (5 μ m, C4, 20mm \times 250mm)
- <642> YMC PROTEIN-RP (4.6mm ϕ \times 150mm)
- <643> 용출액 ; 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 적절히 아세토니트릴 농도를 직선적으로 변화시켰음.
- <644> 유속 ; 10ml/분 (내경 20mm 컬럼용), 3ml/분 (내경 10mm 컬럼용), 1ml/분 (내경 4.6mm 컬럼용)
- <645> 검출 ; 210 nm, 260 nm
- <646> 주입 ; 10 ~ 2000 μ l. 2000 μ l 이상은 펌프로 주입하였음.
- <647> (c) 질량분석기
- <648> 기기 ; 피니건 MAT TSQ700
- <649> 이온원 ; ESI
- <650> 검출 이온 모드 ; positive
- <651> 스프레이 전압 ; 4.5kV
- <652> 캐필러리 온도 ; 250 $^{\circ}$ C
- <653> 이동상 ; 0.2% 아세트산·메탄올 혼합액 (1:1)
- <654> 유속 ; 0.2ml/분
- <655> 스캔 범위 ; m/z 300~1,500
- <656> (d) 아미노산 서열 분석
- <657> 기기 ; 퍼킨엘머 사 제조, 어플라이드 바이오시스템 477A, 492 형 시퀀서
- <658> (e) 아미노산 조성 분석
- <659> 기기 ; 히파찌 세이사쿠쇼 L-8500 형 아미노산 분석기계
- <660> 시료 ; 특별히 기재가 없는 것은 봉관 중, 6M 염산으로 110 $^{\circ}$ C, 24 시간 가수분해하였음.
- <661> (2) 아실세린 또는 아실트레오닌을 갖는 유도체의 합성에 (Fmoc 법, 카르복실 말단 카르복실산)
- <662> 화합물 1 hGhrelin : GSS(CO-C₇H₁₅)FLSPEHQVRVQQRKESKKPPAKLQPR
- <663> Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-수지 (ABI 사 제조, 403mg, 0.25mmol) 를 20% 피페라진으로 20 분간 처리한 후, 순차적으로 HBTU/HOBt 에 의한 Fmoc-아미노산 도입과 피페라진에 의한 탈 Fmoc 를 반복하여, Fmoc-Ser(Bu^t)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-수지를 구축하였다.
- 마지막으로 DCC/HOBt 로 Boc-Gly 를 도입한 후, 얻어진 보호 펩티드 수지 (1.3g) 를 1% TFA-5% TIPS-염화메틸렌 용액 (15ml) 으로 30 분간 처리하였다. 펩티드 수지를 여과시켜 염화메틸렌 (30ml) 으로 여러번 세정한 후, 5% DIEA (10ml), 이어서 염화메틸렌 (30ml) 으로 세정하였다. 얻어진 탈 Trt 펩티드 수지 (약 1.3g) 을 NMP (10ml) 에 팽윤시켜, DMAP (61.1mg, 0.5mmol) 존재하, 옥탄산 (144.2mg, 1.0mmol), DIPCI (126.2mg, 1.0mmol) 를 첨가하여 8 시간 반응시켰다. 수지를 여과하여, NMP, 염화메틸렌으로 세정하고 감압하 건조시켜, 3 위 세린 측쇄가 옥타노일화된 보호 펩티드 수지 약 1.2g 을 얻었다. 이것에 88% TFA-5% 페놀-2% TIPS-5% H₂O 로 이루어지는 탈보호시약 (10ml) 을 첨가하고, 실온에서 2 시간 교반하였다. 수지를 여과 제거하고, 여과액을 농축 후, 잔류물에 에테르를 첨가하여 침전시켰다. 침전을 여과, 건조시켜 조펩티드 약 550mg 을 얻었다. 본품 200mg 을 물 10ml 에 녹여, YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20mm \times 250mm) 에 첨가하여, 0.1% 트리플루오로아세트산 중 아세토니트릴 0% 내지 54% 까지의 60 분간 직선 그라디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 회분을 분리 채취 후, 동결 건조시켜 120mg 의 목적물을 얻었다.

- <664> (3) 아실세린 또는 아실트레오닌을 갖는 유도체의 합성에 (Fmoc법, 카르복실 말단 아미드체)
- <665> 화합물 3 그렐린(1-9)-NH₂ ; GSS(CO-C₇H₁₅)FLSPEH-NH₂
- <666> Fmoc-아미드 수지 (ABI 사 제조, 403mg, 0.25mmol) 를 20% 피페라진으로 20 분간 처리한 후, 순차적으로 HBTU/HOBt 에 의한 Fmoc-아미노산 도입과 피페라진에 의한 탈 Fmoc 를 반복하여, Fmoc-Ser(Bu^t)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(Bu^t)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-수지를 구축하였다. 마지막으로 DCC/HOBt 로 Boc-Gly 를 도입한 후, 얻어진 보호 펩티드 수지 (약 550mg) 를 1% TFA-5% TIPS-염화메틸렌 용액 (10ml) 으로 30 분간 처리하였다. 펩티드 수지를 여과시켜, 염화메틸렌 (30ml) 으로 여러번 세정한 후, 5% DIEA (10ml), 이어서 염화메틸렌 (30 ml) 으로 세정하였다. 얻어진 탈 Trt 펩티드 수지 (약 750mg) 를 NMP (10ml) 에 팽윤시키고, DMAP (61.1mg, 0.5mmol) 존재하, 옥탄산 (144.2mg, 1.0mmol), DIPCI (126.2mg, 1mmol) 를 첨가하여 4 시간 반응시켰다. 수지를 여과시키고, NMP, 염화메틸렌으로 세정하여 감압하 건조시켜, 3 위 세린 측쇄가 옥타노일화된 보호 펩티드 수지 약 800mg 을 얻었다. 이것에, TFA (10ml) 를 첨가하고, 실온에서 30 분간 교반하였다. 수지를 여과 제거하고, 여과액을 농축 후, 잔류물에 에테르를 첨가하여 침전시켰다. 침전을 여과, 건조시켜, 조펩티드 250mg 을 얻었다. 본품 약 200mg 을 30% 아세트산수 10ml 에 녹여, YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm ×250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세토니트릴 0% 내지 54% 까지의 60 분간 직선 그레디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 화분을 분리 채취 후, 동결건조시켜, 150mg 의 목적물을 얻었다.
- <667> (4) 아실세린 또는 아실트레오닌을 갖는 유도체의 합성에 (Boc법)
- <668> 화합물 9 [Ser³(프로피오닐)]-rGhrelin(1-28);
- <669> GSS(CO-CH₂CH₃)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
- <670> Boc-Arg(Tos)-Pam 레진 (0.75g, 0.5mmol) 에서, 보호 래트 그렐린 수지 (4-28) 를 Boc Chemistry 로 구축 후, 그 절반량 1.4g 에, Boc-Ser(CO-CH₂CH₃)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH 를 축합하였다. 얻어진 수지 1.5g 을 HF:p-크레졸 (8.5ml:1.5ml) 로 0℃, 1시간 처리한 후, HF 를 감압하 증류제거하였다. 잔류물에 에테르를 첨가하여 671mg 의 조펩티드를 얻었다. 이것을 50% 아세트산 (AcOH) 에 녹여 분리 채취용 컬럼 YMC-Pack-ODS-A (5μm, 20mm ×250mm) 에 첨가하고, 10ml/min 로 0.1% TFA 를 함유하는 용액으로 아세토니트릴 농도를 75 분동안에 0 내지 95% 까지 변화시켜 용출시켰다. 목적물을 함유하는 화분을 동결건조시켜 조펩티드를 135.8mg 얻었다. 이 일부 0.5mg 을 YMC-A-302 컬럼 (C18, 4.6 mm ×150mm) 에 첨가하고, 유속 1ml/min 으로 아세토니트릴 농도를 15% 내지 19% 까지 변화시켜 용출시켰다. 이 정제 조작을 반복하여 목적으로 하는 화분을 함하여 목적물 0.41mg 을 얻었다.
- <671> 이하의 아실세린 또는 아실트레오닌을 갖는 펩티드 유도체는, 상기 화합물 3 또는 화합물 9 의 제조 방법과 동일하게 하여 제조하였다.
- <672> 이하에 아실세린 또는 아실트레오닌을 갖는 펩티드 유도체의 질량분석, 아미노산 조성분석 결과를 정리하였다.
- <673> 화합물 1. hGhrelin
- ESI-MS 3371.0 (이론치 3370.9), 아미노산조성비 : Ser; 3.53 (4), Glx; 5.91 (6), Gly ; 1.02 (1), Ala; 1.00 (1), Val; 0.96 (1), Leu; 2, Phe; 1.06 (1), Lys; 3.90 (4), His; 0.97(1), Arg; 2.87 (3), Pro; 3.87 (4)
- <674>
- <675> 화합물 3. 그렐린(1-9)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 1085.7 (이론치 1085.2), 아미노산조성비 : Ser; 2.45 (3), Glx; 0.98 (1), Gly ; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 0.99 (1), His; 1.08 (1), Pro; 0.97 (1)
- <676>

- <677> 화합물 4. [Ser²(옥타노일), Ser³]-그렐린(1-9)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 1085. 8 (이론치 1085. 2), 아미노산조성비 :Ser; 2. 46 (3), Glx; 0. 98 (1), Gly ; 0. 99 (1), Leu; 1, Phe; 1. 01 (1), His; 1. 09 (1), Pro; 0. 97 (1)
- <678>
- <679> 화합물 5. [Ser²(옥타노일)]-그렐린(1-9)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 1211. 7 (이론치 1211. 4), 아미노산조성비 :Ser; 2. 48 (3), Glx; 1. 00 (1), Gly ; 1. 01 (1), Leu; 1, Phe; 1. 00 (1), His; 1. 11 (1), Pro; 0. 98 (1)
- <680>
- <681> 화합물 8. [Ser³(아세틸)]-rGhrelin
- ESI-MS 3231. 0 (이론치 3230. 7), 아미노산조성비 :Ser; 3. 50 (4), Glx; 5. 90 (6), Gly ; 0. 98 (1), Ala; 2. 00 (2), Leu; 2, Phe; 1. 01 (1), Lys; 4. 97 (5), His; 0. 99 (1), Arg; 1. 99 (2), Pro; 3. 99 (4)
- <682>
- <683> 화합물 9. [Ser³(프로피오닐)]-rGhrelin
- ESI-MS 3245. 0 (이론치 3242. 8), 아미노산조성비 :Ser; 3. 42 (4), Glx; 5. 93 (6), Gly ; 1. 00 (1), Ala; 2. 00 (2), Leu; 2, Phe; 1. 10 (1), Lys; 4. 97 (5), His; 0. 99 (1), Arg; 1. 99 (2), Pro; 3. 83 (4)
- <684>
- <685> 화합물 15. [Ser³(3-페닐프로피오닐)]-hGhrelin
- ESI-MS 3377. 0 (이론치 3376. 9), 아미노산조성비 :Ser; 3. 06 (4), Glx; 5. 92 (6), Gly ; 0. 93 (1), Ala; 0. 98 (1), Val; 0. 99 (1), Leu; 2, Phe; 1. 13 (1), Lys; 4. 03 (4), His; 1. 08 (1), Arg; 3. 00 (3), Pro; 3. 76 (4)
- <686>
- <687> 화합물 16. [Ser³(3-옥테노일)]-hGhrelin
- ESI-MS 3369. 0 (이론치 3368. 9), 아미노산조성비 :Ser; 3. 59 (4), Glx; 5. 91 (6), Gly ; 1. 00 (1), Ala; 1. 02 (1), Val; 0. 99 (1), Leu; 2, Phe; 1. 15 (1), Lys; 3. 97 (4), His; 0. 98 (1), Arg; 2. 93 (3), Pro; 3. 88 (4)
- <688>
- <689> 화합물 28. 그렐린(1-8)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺ 948. 5 (이론치 948. 1), 아미노산조성비 :Ser; 2. 45 (3), Glx; 0. 97 (1), Gly ; 0. 99 (1), Leu; 1, Phe; 1. 00 (1), Pro; 0. 97 (1)
- <690>
- <691> 화합물 29. 그렐린(1-7)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺ 819. 6 (이론치 819. 0), 아미노산조성비 :Ser; 2. 52 (3), Gly ; 1. 01 (1), Leu; 1, Phe; 1. 02 (1), Pro; 1. 09 (1)
- <692>

- <693> 화합물 30. 그렐린(1-6)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 722.4 (이론치 721.8), 아미노산조성비 : Ser; 2.47 (3),
Gly ; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1)
- <694>
- <695> 화합물 31. 그렐린(1-5)
- ESI-MS [M+H]⁺ 636.5 (이론치 635.8), 아미노산조성비 : Ser; 1.78 (2),
Gly ; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.02 (1)
- <696>
- <697> 화합물 32. 그렐린(1-5)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺ 635.4 (이론치 634.8), 아미노산조성비 : Ser; 1.67 (2),
Gly ; 1.01 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1),
- <698>
- <699> 화합물 33-2. 그렐린(1-4)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺ 522.2 (이론치 521.6), 아미노산조성비 : Ser; 1.65 (2),
Gly ; 0.99 (1), Phe; 1
- <700>
- <701> 화합물 34. 그렐린(1-3)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺ 375.2 (이론치 374.4), 아미노산조성비 : Ser; 1.66 (2),
Gly ; 1
- <702>
- <703> 화합물 35. [Lys⁸]-그렐린(1-8)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺ 947.9 (이론치 947.1), 아미노산조성비 : Ser; 2.70 (3),
Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00(1), Lys; 0.99 (1), Pro; 1.00 (1)
- <704>
- <705> 화합물 36. [Arg⁸]-그렐린(1-8)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺ 975.8 (이론치 975.2), 아미노산조성비 : Ser; 2.70 (3),
Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Arg; 0.99 (1), Pro; 1.00 (1)
- <706>
- <707> 화합물 37. [Lys⁶]-그렐린(1-6)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺ 763.6 (이론치 762.9), 아미노산조성비 : Ser; 1.80 (2),
Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Lys; 1.00 (1)
- <708>
- <709> 화합물 38. [Lys⁵]-그렐린(1-5)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺ 650.5 (이론치 649.8), 아미노산조성비 : Ser; 1.79 (2),
Gly ; 0.99 (1), Phe; 1, Lys; 0.99 (1)
- <710>
- <711> 화합물 39. [^DPhe⁴, Lys⁵]-그렐린(1-5)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺ 650.5 (이론치 649.8), 아미노산조성비 : Ser; 1.79 (2),
Gly ; 0.99 (1), Phe; 1, Lys; 0.99 (1)
- <712>

- <713> 화합물 40. [N-아미노펜타노일]-그렐린(3-7)-아미드
ESI-MS [M+H]⁺ 774.7 (이론치 774.0), 아미노산조성비 : Ser; 1.80 (2),
<714> Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Pro; 1.00 (1)
- <715> 화합물 43. [N-글리실]-그렐린(3-7)-아미드
ESI-MS [M+H]⁺; 732.7 (이론치 731.9), 아미노산조성비 : Ser; 1.80 (2),
<716> Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Pro; 1.00 (1)
- <717> 화합물 44. [Leu²]-그렐린(1-7)-아미드
ESI-MS [M+H]⁺; 845.7 (이론치 845.1), 아미노산조성비 : Ser; 1.80 (2),
<718> Gly ; 1.01 (1), Leu; 2, Phe; 1.02 (1), Pro; 0.99 (1)
- <719> 화합물 45. [His²]-그렐린(1-7)-아미드
ESI-MS [M+H]⁺; 869.7 (이론치 869.0), 프로피온산·염산 (50/50)で
150℃, 2시간 가수분해후 아미노산 조성비 : Ser; 1.02 (2), Gly ; 1.00
<720> (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), His; 0.95 (1), Pro; 0.99 (1)
- <721> 화합물 46. [Lys²]-그렐린(1-7)-아미드
ESI-MS [M+H]⁺; 860.7 (이론치 860.1), 프로피온산·염산 (50/50)で
150℃, 2시간 가수분해후 아미노산 조성비 : Ser; 1.04 (2), Gly ; 1.00
<722> (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Lys; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)
- <723> 화합물 47. [Gly²]-그렐린(1-7)-아미드
ESI-MS [M+H]⁺; 789.5 (이론치 788.9), 프로피온산·염산 (50/50)で
150℃, 2시간 가수분해후 아미노산 조성비 : Ser; 1.14 (2), Gly ; 2.01
<724> (2), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)
- <725> 화합물 59. [Thr³(옥타노일)]-hGhrelin
ESI-MS M⁺; 3384.0 (이론치 3384.9) 아미노산조성비 : Ala ; 1.02
(1) , Arg ; 2.99 (3) , Glx ; 5.91 (6) , Gly ; 1.02 (1) , His ; 1.00
(1) , Leu ; 2 (2) , Lys ; 4.05 (4) , Phe ; 1.00 (1) , Pro ; 4.06
<726> (4) , Ser ; 2.66 (3) , Thr;0.94 (1) , Val ; 0.96 (1)
- <727> 화합물 60. [Leu², Thr³(옥타노일)]-hGhrelin
ESI-MS M⁺; 3410.0 (이론치 3411.0) 아미노산조성비 : Ala ; 1.01
(1) , Arg ; 2.95 (3) , Glx ; 5.92 (6) , Gly ; 1.01 (1) , His ; 1.01
(1) , Leu ; 3 (3) , Lys ; 4.02 (4) , Phe ; 1.01 (1) , Pro ; 4.00
<728> (4) , Ser ; 1.81 (2) , Thr;0.96 (1) , Val ; 0.97 (1)

<729> 화합물 69. [Ser³(4-메틸펜타노일)]-hGhrelin

ESI-MS M; 3343.0 (이론치 3342.9) 아미노산조성비 : Ala ; 1.00 (1) , Arg ; 2.97 (3) , Glx ; 5.86 (6) , Gly ; 1.02 (1) , His ; 1.01 (1) , Leu ; 2, Lys ; 4.00 (4) , Phe ; 1.01 (1) , Pro ; 3.99 (4) , Ser ; 3.54 (4) , Val ; 0.98 (1)

<731> 화합물 75. [Lys⁷]-그렐린(1-7)-아미드

ESI-MS [M+H]⁺; 850.5 (이론치 850.0), 아미노산조성비 : Ser; 2.67 (3), Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Lys; 1.00 (1)

<733> (5) 아미노 말단 아실화 유도체의 합성에

<734> 화합물 6. [N-옥타노일, Ser³]-그렐린(1-9)-아미드;

<735> C₇H₁₅CO-GSSFLSPEH-NH₂

<736> Fmoc-아미드 수지 (ABI 사 제조, 403mg, 0.25mmol) 를 20% 피페라진으로 20 분간 처리한 후, 순차적으로 HBTU/HOBt 에 의한 Fmoc-아미노산 도입과 피페라진에 의한 탈 Fmoc 를 반복하여, Fmoc-Gly-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-수지를 구축하였다. 피페라진 처리 후, 얻어진 펩티드 수지 (550 mg) 를 NMP 로 세정하고, HOBt (135.1mg, 1mmol) 존재하, DIPCI (126.2mg, 1mmol) 과 옥탄산 (144.2mg, 1.0mmol) 을 첨가하여 4 시간 반응시켰다. 수지를 여과시켜, NMP, 염화메틸렌으로 세정하여 감압하 건조시켜, 아미노 말단 Gly 아미노산이 옥타노일화된 보호 펩티드 수지 약 600mg 을 얻었다. TFA (10ml) 로 탈보호하고 (30 분간 처리), 조펩티드 200mg 을 얻었다. 전량을 YMC-Pack PROTEIN-RP (5μm, C4, 20mm ×250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세트니트릴 0% 내지 54% 까지의 60 분간 직선 그레디언트 (유속:10ml/ml) 로 용출시켰다. 약 180mg 의 목적물을 얻었다.

측정치 ESI-MS [M+H]⁺; 1085.6 (이론치 1085.2), 아미노산조성비 : Ser; 2.47 (3), Glx; 0.98 (1), Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.02 (1), His; 1.09 (1), Pro; 0.96 (1)

<738> (6) 측쇄 알킬세린을 함유하는 유도체의 합성에

<739> 화합물 50. [Ser³(옥틸)]-그렐린(1-7)-아미드;

<740> GSS(C₈H₁₇)FLSP-NH₂Fmoc-Ser(C₈H₁₇)

<741> 빙냉하, Boc-Ser (12.3g, 53.9mmol) 의 DMF (300mmol) 용액에 수소화나트륨 (3.19g, 133mmol) 을 첨가하고, 실온에서 1.5시간 교반하였다. 이것에, 요오드화옥탄 (11.0ml, 60.9mmol) 을 첨가하고, 실온에서 16 시간 교반하였다. 빙냉하, 반응액에 물 (40ml) 을 적하한 후, 용매를 감압하 증류제거하였다. 얻어진 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (겔 ; Merck 사 제조 Art9385, 용출용매 ; 디클로로메탄 : 메탄올 : 아세트산 = 120:10:1) 를 이용하여 정제하고, Boc-Ser(C₈H₁₇) 을 담황색 유상물로서 6.88g (수율 36.2%) 얻었다. 이 Boc-Ser(C₈ H₁₇) (6.88g, 21.7mmol) 에 빙냉하, 트리플루오로아세트산 (120ml) 을 첨가하고, 실온에서 0.5 시간 교반하였다. 트리플루오로아세트산을 감압하 증류제거한 후, 얻어진 잔류물을 디에틸에테르 (120ml) 에 용해시켜, 4N 염산-디옥산 (22ml) 을 첨가하고, 빙냉하, 1 시간 교반하였다. 석출된 결정을 여과하여, H-Ser(C₈H₁₇) · HCl 을 무색결정으로서 5.23g (수율 96.3%) 얻었다. 이 H-Ser(C₈H₁₇) · HCl (2.54g, 10.0mmol) 의 10% 탄산수소나트륨 (50ml) 현탁액에 트리에틸아민 (1.40ml, 10mmol) 을 첨가한 후, 이 중에 Fmoc-OSu (5.00g, 14.8mmol) 의 1,2-디메톡시에탄 (20ml) 용액을 10 분간에 걸쳐 적하하고, 실온에서 16 시간 교반하였다. 불용물을 여과하고, 여과액에 디클로로메탄을 첨가하여 유기층을 분리한 후, 13% 식염수로 세정하였다. 무수 황산나트륨으로 건조한 후, 용매를 감압 증류제거하였다. 얻어진 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피

(겔 ; 후지시리시야사 제조 BW-300, 용출용매 ; 디클로로메탄 : 메탄올 = 93:7) 를 이용하여 정제하고, Fmoc-Ser(C₈H₁₇) 을 무색 결정으로서 2.75g (수율 62.6%) 얻었다. Rf=0.45 (CHCl₃:MeOH=9:1, Silica gel 60F₂₅₄, MERCK) Fmoc-Ser(C₈H₁₇) : Rf=0.45 (CHCl₃:MeOH=9:1, Silica gel 60F₂₅₄, MERCK)

<742> Fmoc-아미드 수지 (ABI 사 제조, 400mg, 0.25mmol) 를 20% 피페라진으로 20 분간 처리한 후, 순차적으로 HBTU/HOBt 에 의한 Fmoc-아미노산 도입과 피페라진에 의한 탈 Fmoc 를 반복하여, Fmoc-Ser(Bu^t)-Ser(C₈H₁₇)-Phe-Leu-Ser(Bu^t)-Pro 수지를 구축하였다. 마지막으로 DCC/HOBt 로 Boc-Gly 를 도입한 후, 얻어진 보호 펩티드 수지에서 250mg 을 취해 TFA (10ml) 로 30 분간 처리하였다. 수지를 여과 제거하고, 여과액을 농축후, 잔류 물에 에테르를 첨가하고 침전시켜 조펩티드 약 120mg 을 얻었다. 이것을 5% AcOH (10ml) 에 녹여, YMC-Pack-ODS-A (5μm, 20mm × 250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세토니트릴 0% 내지 60% 까지의 60 분간 직선 그레디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 화합물을 분리 채취 후, 동결건조시켜 40mg 의 목적물을 얻었다.

<743> 화합물 84. [N-아미노펜타노일, Ser³(옥틸)]-그렐린(3-5)-벤질아미드;

<744> H-Ape-Ser(C₈H₁₇)-Phe-Leu-NH-CH₂-Ph

<745> 옥심 수지 (230mg/0.25mmol, Novabiochem 제조) 를 유리필터가 부착된 반응용기에 넣고, 미리 염화메틸렌 (DCM) 에 녹여, MgSO₄ 로 건조시킨 Boc-Leu-OH · H₂O (190mg, 0.75mmol), DCC (160mg, 0.75mmol), 및 DCM 5ml 를 첨가하고, 하룻밤 진탕하였다. 적량의 DCM, DCM/EtOH=1:1, DCM 으로 순차적으로 여러번씩 세정하였다. Leu 도입후는, ① 25% TFA/DCM 10ml 를 첨가하고 30 분 진탕한 후, DCM, 이소프로필알코올 (iPrOH), DCM, DMF 로 각각 여러번 세정하고, ② 삼각플라스크 내에서 Boc 아미노산 0.75mmol (3당량), TBTU 0.75mmol (3당량), HOBt 0.75mmol (3당량) 을 DMF 5ml 에 용해시켜, DIPEA 1.25mmol (5당량) 을 첨가하고 교반한 것을 반응용기에 넣고 1 시간 진탕하는 조작을 반복하고, 순차적으로 아미노산을 축합하였다. 최종적으로 Boc-NH-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-Phe-Leu-옥심 수지 370mg 을 얻었다. DMF 약 5ml 중에 현탁시키고, 벤질아민염산염 (180mg, 1.25mmol), 트리에틸아민 (173μl, 1.25mmol), 아세트산 72μl (1.25mmol) 을 첨가하여 교반하였다. 24 시간 후, 수지를 여과 제거하고, 여과액을 감압 증류제거하여, 1N HCl 10ml 로 Boc 보호체를 석출시켰다. 물 세정, 건조 후, TFA 5ml 를 첨가하여 30 분 반응시켜 탈 Boc 를 실행하였다. TFA 를 감압 증류제거하고, 에테르 (Et₂O) 로 침전시켜, 목적물 [N-아미노펜타노일, Ser³(옥틸)]-그렐린(3-5)-벤질아미드 110mg 을 얻었다. 동일한 방법으로 화합물 82, 83, 85 를 합성하였다.

<746> 이하의 알킬세린을 갖는 펩티드 유도체는, 화합물 82 ~ 85 를 제외하고, 상기 화합물 50 의 제조 방법과 동일하게 하여 제조하였다.

<747> 이하에 알킬세린을 갖는 펩티드 유도체의 질량분석, 아미노산 조성분석 결과를 정리하였다.

<748> 화합물 17. [Ser³(옥틸)]-hGhrelin

ESI-MS ; 3357.0 (이론치 ; 3356.9), 아미노산조성비 : Ser; 2.92 (3+1), Glx; 5.94 (6), Gly ; 1.00 (1), Ala; 0.98 (1), Val; 0.99 (1), Leu; 2, Phe; 1.13 (1), Lys; 4.04 (4), His; 1.09 (1), Arg; 3.01 (3), Pro; 3.89 (4)

<749>

<750> 화합물 50. [Ser³(옥틸)]-그렐린(1-7)-아미드

ESI-MS [M+H]⁺; 805.5 (이론치 805.0) , 프로피온산 · 염산 (50/50) で 150℃, 2시간 가수분해후 아미노산 조성비 : Ser; 0.86 (2+1), Gly ; 1.01 (1), Leu; 1, Phe; 1.06 (1), Pro; 0.95 (1)

<751>

- <752> 화합물 51. [Ser³(옥틸), ^DPhe⁴]-그렐린(1-7)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 805.4 (이론치 805.0), 프로피온산·염산 (50/50)
 ㉔ 150℃, 2시간 가수분해후 아미노산 조성비 : Ser; 0.97 (2+1), Gly ;
 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.05 (1), Pro; 1.16 (1)
- <753>
- <754> 화합물 52. [^DSer³(옥틸)]-그렐린(1-7)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 805.4 (이론치 805.0), 프로피온산·염산 (50/50)
 ㉔ 150℃, 2시간 가수분해후 아미노산 조성비 : Ser; 1.51 (2+1), Gly ;
 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)
- <755>
- <756> 화합물 53. [^DSer³(옥틸), ^DPhe⁴]-그렐린(1-7)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 805.5 (이론치 805.0), 프로피온산·염산 (50/50)
 ㉔ 150℃, 2시간 가수분해후 아미노산 조성비 : Ser; 1.51 (2+1), Gly ;
 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 1.01 (1)
- <757>
- <758> 화합물 67. [Ser³(Bzl)]-hGhrelin
- ESI-MS M⁺; 3335.0 (이론치 3334.8) 아미노산조성비 : Ala ; 1.00
 (1), Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.92 (6), Gly ; 1.00 (1), His ; 1.01 (1),
 Leu ; 2 (2), Lys ; 4.00 (4), Phe ; 1.02 (1), Pro ; 4.08 (4), Ser ;
 3.58 (4), Val ; 0.98 (1)
- <759>
- <760> 화합물 76. [N-아미노펜타노일, Ser³(옥틸), Lys⁵]-그렐린(3-5)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 591.5 (이론치 590.8), 아미노산조성비 : Ser; 0.45 (1),
 Phe; 1, Lys; 1.00 (1)
- <761>
- <762> 화합물 77. [N-아미노펜타노일, ^DSer³(옥틸), ^DPhe⁴, Lys⁵]-그렐린(3-5)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 591.5 (이론치 590.8), 아미노산조성비 : Ser; 0.45 (1),
 Phe; 1, Lys; 1.01 (1)
- <763>
- <764> 화합물 78. [Aib¹, His², Ser³(옥틸), Lys⁵]-그렐린(1-5)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 714.6 (이론치 713.9), 아미노산조성비 : Ser; 0.45 (1),
 Phe; 1, His; 1.01 (1), Lys; 1.00 (1)
- <765>
- <766> 화합물 79. [Aib¹, His², ^DSer³(옥틸), ^DPhe⁴, Lys⁵]-그렐린(1-5)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 714.5 (이론치 713.9), 아미노산조성비 : Ser; 0.44 (1),
 Phe; 1, His; 1.00 (1), Lys; 1.01 (1)
- <767>

- <768> 화합물 81. [N-아미노펜타노일, Ser³(옥틸)]-그렐린(3-5)-아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 576.5 (이론치 575.8), 아미노산조성비 : Ser; 0.49 (1),
<769> Leu; 1, Phe; 0.99 (1)
- <770> 화합물 82. [N-아미노펜타노일, Ser³(옥틸)]-그렐린(3-5)-메틸아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 590.6 (이론치 589.8), 아미노산조성비 : Ser; 0.49 (1),
<771> Leu; 1, Phe; 0.99 (1)
- <772> 화합물 83. [N-아미노펜타노일, Ser³(옥틸)]-그렐린(3-5)-에틸아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 604.3 (이론치 603.8), 아미노산조성비 : Ser; 0.50 (1),
<773> Leu; 1, Phe; 0.99 (1)
- <774> 화합물 84. [N-아미노펜타노일, Ser³(옥틸)]-그렐린(3-5)-벤질아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 666.5 (이론치 665.9), 아미노산조성비 : Ser; 0.46 (1),
<775> Leu; 1, Phe; 0.98 (1)
- <776> 화합물 85. [N-아미노펜타노일, Ser³(옥틸)]-그렐린(3-5)-아미노에틸아미드
- ESI-MS [M+H]⁺; 619.6 (이론치 618.9), 아미노산조성비 : Ser; 0.47 (1),
<777> Leu; 1, Phe; 0.99 (1)
- <778> (7) 측쇄 알킬시스테인을 함유하는 유도체의 합성에
- <779> 화합물 48. [Cys³(옥틸)]-그렐린(1-7)-NH₂; GSC(C₈H₁₇)FLSP-NH₂
- <780> Fmoc-아미드 수지 (ABI 사 제조, 403mg, 0.25mmol) 를 20% 피페라진으로 20 분간 처리한 후, 순차적으로 HBTU/HOBt 에 의한 Fmoc-아미노산 도입과 피페라진에 의한 탈 Fmoc 를 반복하여, Fmoc-Ser(Bu^t)-Cys(C₈H₁₇)-Phe-Leu-Ser(Bu^t)-Pro 수지를 구축하였다. 마지막으로 DCC/HOBt 로 Boc-Gly 를 도입한 후, 얻어진 보호 펩티드 수지 (550mg) 를 TFA (10ml) 로 30 분간 처리하였다. 수지를 여과 제거하고, 여과액을 농축 후, 잔류물에 에테르를 첨가하고 침전시켜 조펩티드 120mg 을 얻었다. 이것을 5% 아세트산 (AcOH) 10ml 에 녹여, YMC-Pack-ODS-A (5μm, 20mm × 250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세트니트릴 0% 내지 60% 까지의 60 분간 직선 그라디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 획분을 분리 채취 후 동결건조시켜, 44mg 의 목적물을 얻었다.
- <781> 화합물 68. [Cys³(Trt)]-hGhrelin;
- <782> GSC(C-Ph₃)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
- <783> Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-수지 (ABI 사 제조, 403mg, 0.25mmol) 를 20% 피페라진으로 20 분간 처리한 후, 순차적으로 HBTU/HOBt 에 의한 Fmoc-아미노산 도입과 피페라진에 의한 탈 Fmoc 를 반복하여,
- Fmoc-Ser(Bu^t)-Cys(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP**
- <784> 수지를 구축하였다. 마지막으로 DCC/HOBt 로 Boc-Gly 를 도입한 후, 얻어진 보호 펩티드 수지 (1.4g) 를 얻
- <785>

었다. 이 중 400mg 에 TFA (15ml) 를 첨가하고, 실온에서 1시간 교반하였다. 여과하여 수지를 제거하고, 여과액을 농축 후, 에테르를 첨가하여 침전시켰다. 약 90mg 을 물 40ml 에 녹여, YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20mm ×250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세트오니트릴 0% 내지 54% 까지의 60 분 간 직선 그레디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 화합물을 분리 채취 후 동결건조시켜, 60mg 의 목적물을 얻었다.

<786> 이하의 알킬시스테인을 갖는 펩티드 유도체는, 상기 화합물 48 또는 화합물 68 의 제조 방법과 동일하게 하여 제조하였다.

<787> 이하에 알킬시스테인을 갖는 펩티드 유도체의 질량 분석, 아미노산 조성 분석결과를 정리하였다.

<788> 화합물 18. [Cys³(옥틸)]-rGhrelin

ESI-MS ; 3317.0 (이론치 ; 3316.9) , 아미노산조성비 : Ser; 2.69 (3), Glx; 5.90 (6), Gly ; 1.00 (1), Ala; 1.99 (2), Leu; 2, Phe; 1.02 (1), Lys; 4.97 (5), His; 0.99 (1), Arg; 1.98 (2), Pro; 3.87 (4)

<790> 화합물 48. [Cys³(옥틸)]-그렐린(1-7)-아미드

ESI-MS [M+H]⁺; 821.7 (이론치 821.1) , 프로피온산·염산 (50/50) で 150℃ , 2시간 아미노산조성비 : Ser; 0.60 (2), Gly ; 1.08 (1), Leu; 1, Phe; 1.06 (1), Pro; 0.96 (1)

<792> 화합물 49. [Cys³(옥틸), ^DPhe⁴]-그렐린(1-7)-아미드

ESI-MS [M+H]⁺; 821.6 (이론치 821.1) , 프로피온산·염산 (50/50) で 150℃, 2시간 아미노산조성비 : Ser; 0.58 (2), Gly ; 1.02 (1), Leu; 1, Phe; 1.06 (1), Pro; 0.97 (1)

<794> 화합물 68. [Cys³(Trt)]-hGhrelin

ESI-MS 3503.0 (이론치 3503.1) , 아미노산조성비 : Ser; 2.42 (3), Glx; 5.77 (6), Gly ; 1.00 (1), Ala; 1.01 (1), Val; 0.94 (1), Leu; 2, Phe; 0.99 (1), Lys; 3.94 (4), His; 0.99 (1), Arg; 2.92 (3), Pro; 3.81 (4)

<796> (8) N-메틸아미노산을 함유하는 펩티드 유도체의 합성에

<797> 화합물 86. [N-아미노펜타노일, Ser³(옥틸), MePhe⁴, MeLeu⁵]-그렐린(3-5)-아미드 ; NH₂-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu-NH₂

<798> Fmoc-아미드 수지 (0.40g, 0.25mmol) 를 유리 필터가 부착된 반응용기에 넣고, 20% 피페라진/NMP 15ml 를 첨가하여 20 분 진탕하고, Fmoc 기를 제거하였다. 그 후, NMP 15ml, Fmoc-MeLeu-OH 1.0mmol (4당량), TBTU 1.0mmol (4당량), HOBt 1.0mmol (4당량), DIPEA 1.0mmol (4당량) 을 첨가하여 1 시간 진탕하고, Fmoc-MeLeu 를 축합하였다. 그 후, 20% 피페리딘에 의한 Fmoc 기의 제거와 DIPEA 2.25mmol (9당량) 존재하, 브로모-트리스-피롤리디노-포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (3당량) 에 의한 Fmoc-아미노산 축합 (3당량) 을 반복하여, 펩티드 사슬을 연장시켰다. 축합반응의 종료를, 소량의 수지를 TFA 로 탈보호하고, HPLC 및 질량분석 (MS) 에 의해 확인하였다. Boc-NH-(CH₂)₄-CO-Ser(O-C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu- 수지를 얻은 후, 이것을 TFA 로 30 분 처리하여 절단 및 탈보호를 실행하여, TFA 를 감압 증류제거, 에테르 (Et₂O) 로 세정하고, NH₂-(CH₂)₄-CO-Ser(C₈H₁₇)-MePhe-MeLeu-NH₂ 120mg 을 얻었다. 이것을 YMC-Pack ODS-A (C18, 20mm ×250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세트오니트릴 0% 내지 54% 까지의 60 분간 직선 그레디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적

획분을 분리 채취 후, 동결건조시켜 70mg 의 목적물을 얻었다. 본 유도체를 프로피온산·염산 (50/50) 으로 150℃, 2 시간 가수분해하여, 아미노산 분석기 상에서 검출된 아미노펜탄산의 피크면적을, 아미노펜탄산 10nmol 에 대응하는 면적비에서 펩티드량을 정량하였다.

<799> ESI-MS [M+H]⁺; 604.5 (이론치 603.8), 프로피온산·염산 (50/50) 으로 150℃, 2시간 가수분해 후의 검출 아미노산: Ser, Ape

<800> (9) 혼합 디술피드 유도체의 합성

<801> 화합물 57. [Cys³(S-헵틸)]-hGhrelin ;

<802> GSC(S-C₇H₁₅)FLSPEHQVRVQRKESKKPPAKLQPR

<803> 화합물 58 의 화합물 3 의 제조 방법에 따른 합성으로 얻어진 보호 펩티드-HMP 수지 (1g) 에 88% TFA-5% 페놀-2% TIPS-5% H₂O 로 이루어지는 탈보호시약 (15ml) 을 첨가하고, 실온에서 2 시간 교반하였다. 수지를 여과

제거하고, 여과액을 농축 후, 잔류물에 에테르를 첨가하고, 조[Cys³]-hGhrelin 분말을 약 550mg 을 얻었다. 이것을 YMC-Pack ODS-A (C18, 20mm ×250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세트니트릴 0% 내지 54% 까지에서의 60 분간 직선 그레디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 획분을 분리 채취 후,

동결건조시켜 300mg 의 [Cys³]-hGhrelin(1-28) 을 얻었다. 이중 40mg (11.4 μmol) 을 물 (20ml) 에 용해시켜, 4,4'-디티오디피리딘 (7.5mg, 34.2 μmol) 의 아세트니트릴 용액 1ml 를 첨가하고, 1 시간 방치하였다.

반응 종료를 확인한 후, 반응액을 클로로포름으로 여러번 세정하고, 과잉의 4,4'-디티오디피리딘과 피리돈 유도체를 제거하였다. [티오피리딜Cys³]-hGhrelin(1-28) 을 포함하는 수층 (10ml) 을 5% NH₃ 수로 pH 를

7.4 로 하여, 1-펩탄티올 (4.5mg, 34.2 μmol) 의 아세트니트릴 용액 2ml 를 첨가하였다. 1 시간 후, 반응액을 YMC-Pack-ODS-A (C18, 20mm ×250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세트니트릴 0% 내지 54% 까지에서의 60 분간 직선 그레디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 획분을 분리 채취 후, 동결건조시켜 15mg 의 목적물을 얻었다.

<804> 화합물 57. [Cys³(S-헵틸)]-hGhrelin ;

ESI-MS 3391.0 (이론치 3391.0), 아미노산조성비 : Ser; 2.76 (3),
Glx; 5.81 (6), Gly ; 0.99 (1), Ala; 1.01 (1), Val; 0.95 (1), Leu;
2, Phe; 0.99 (1), Lys; 3.95 (4), His; 0.99 (1), Arg; 2.93 (3), Pro;
3.84 (4)

<805>

<806> (10) 3 위 측쇄에 아마이드, 역방향의 에스테르를 갖는 유도체의 합성에

<807> 화합물 55. [Asp³(NH-헵틸)]-hGhrelin ;

<808> GSD(NH-C₇H₁₅)FLSPEHQVRVQRKESKKPPAKLQPR

<809> Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-수지 (ABI사 제조, 403mg, 0.25mmol) 를 20% 피페라진으로 20 분간 처리한 후, 순차적으로 HBTU/HOBt 에 의한 Fmoc-아미노산 도입과 피페라진에 의한 탈 Fmoc 를 반복하여,

**Fmoc-Ser(Bu^t)-Asp(OPis)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu^t)-His(Boc)-
Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OB
u^t)-Ser(Bu^t)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)
-Pro-Arg(Pmc)-HMP**

<810>

<811> 수지를 구축하였다. 마지막으로 DCC/HOBt 로 Boc-Gly 를 도입한 후, 얻어진 보호 펩티드 수지 (1.3g) 를 4% TFA-염화메틸렌 용액 (15ml) 으로 15 분간 처리하였다. 펩티드 수지를 여과하고, 염화메틸렌 (30ml) 으로 여러번 세정한 후, 4% DIEA (10ml), 이어서 염화메틸렌 (30ml) 으로 세정하였다.

<812> 얻어진 탈 Pis 펩티드 수지 (약 1.3g) 을 NMP (10ml) 에 팽윤시켜, 수용성 카르보디이미드염산염 (191.7mg,

1.0mmol), HOBt (135.2mg, 1.0mmol), n-헵틸아민 (115.2mg, 1.0mmol) 을 첨가하고, 8 시간 반응시켰다.

<813> 수지를 여과하고, NMP, 염화메틸렌으로 세정하고 감압하 건조시켜, 3 위 Asp 측쇄가 헵틸아미드화된 보호 펩티드 수지 약 1.2g 을 얻었다. 이것에, 88% TFA-5% 페놀-2% TIPS-5% H₂O 로 이루어지는 탈보호시약 (10ml) 를 첨가하고, 실온에서 2 시간 교반하였다. 수지를 여과 제거하고, 여과액을 농축 후, 잔류물에 에테르를 첨가하여 침전시켰다. 침전을 여과, 건조시켜, 조펩티드 약 550mg 을 얻었다.

<814> 본품 200mg 을 물 10ml 에 녹여, YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20mm ×250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세트니트릴 0% 내지 54% 까지의 60 분간 직선 그레디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 회분을 분리 채취 후, 동결건조시켜 120mg 의 목적물을 얻었다.

<815> 화합물 61. [Lys³(옥타노일)]-hGhrelin ;

<816> GSK(CO-C₇H₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

<817> Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-수지 (ABI 사 제조, 403mg, 0.25mmol) 를 20% 피페라진으로 20 분간 처리한 후, 순차적으로 HBTU/HOBt 에 의한 Fmoc-아미노산 도입과 피페라진에 의한 탈 Fmoc 를 반복하여,

Boc-Gly-Ser(tBu)-Lys(Mtt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu¹)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu¹)-Ser(Bu¹)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP

<818>

<819> 수지를 구축하였다. 약 300mg 의 보호 펩티드 수지를 1% TFA-5% TIPS-염화메틸렌 용액 (15ml) 으로 60 분간 처리하였다.

<820> 펩티드 수지를 여과시켜 염화메틸렌 (30ml) 으로 여러번 세정한 후, 10% DIEA (10ml), 이어서 염화메틸렌 (30ml) 으로 세정하였다. 얻어진 탈 Mtt 펩티드 수지 (약 300mg) 를 NMP (2ml) 에 팽윤시켜, HOBt (34mg, 0.25mmol) 존재하, 옥탄산 (40μl, 0.25mmol), DCC (52mg, 0.25mmol) 을 첨가하여 하룻밤 반응시켰다.

<821> 수지를 여과시켜 NMP, 염화메틸렌으로 세정하고 감압하 건조시켜, 3 위 라이신 측쇄가 옥타노일화된 보호 펩티드 수지 약 300mg 을 얻었다. 이것에, 88% TFA-5% 페놀-2% TIPS-5% H₂O 로 이루어지는 탈보호시약 (5ml) 를 첨가하고, 실온에서 2시간 교반하였다. 수지를 여과 제거하고, 여과액을 농축 후, 잔류물에 에테르를 첨가하여 침전시켰다. 침전을 여과 채취하고, 건조시켜, 조펩티드 약 234mg 을 얻었다.

<822> 이것을 아세트산 6ml 에 녹여, YMC-Pack ODS-A (5μm, 20mm ×250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세트니트릴 0% 내지 60% 까지의 60 분간 직선 그레디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 회분을 분리 채취 후, 동결건조시켜 100mg 의 파우더를 얻었다. 이것을 2ml 의 50% 아세트산에 녹여, YMC-Pack PROTEIN-RP (5μm, C4, 20mm ×250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세트니트릴 0% 내지 60% 까지의 60 분간 직선 그레디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 회분을 분리 채취 후, 동결건조시켜 52mg 의 파우더를 얻었다.

<823> 이하의 화합물은 상기 화합물 55 또는 화합물 61 의 제조 방법과 동일하게 하여 제조하였다.

<824> 그 외, Fmoc 의 통상적인 방법으로 합성한 펩티드 유도체의 질량분석, 아미노산 조성분석 결과를 정리하였다.

<825> 화합물 54. [Asp³(O-헵틸)]-hGhrelin(1-28)

ESI-MS 3371.0 (이론치 3370.9), 아미노산조성비 : Asx; 0.99 (1), Ser; 2.70 (3), Glx; 5.87 (6), Gly ; 1.01 (1), Ala; 1.01 (1), Val; 0.94 (1), Leu; 2, Phe; 1.00 (1), Lys; 4.02 (4), His; 1.00 (1), Arg; 2.98 (3), Pro; 3.84 (4)

<826>

- <827> 화합물 55. [Asp³(NH-헵틸)]-hGhrelin(1-28)
- ESI-MS 3370.0 (이론치 3369.9), 아미노산조성비 : Asx; 0.88 (1), Ser; 2.95 (3), Glx; 5.97 (6), Gly; 1.21 (1), Ala; 1.03 (1), Val; 0.98 (1), Leu; 2, Phe; 1.00 (1), Lys; 3.94 (4), His; 0.92 (1), Arg; 2.91 (3), Pro; 3.99 (4)
- <828>
- <829> 화합물 56. [Dap³(옥타노일)]-hGhrelin
- ESI-MS M; 3370.0 (이론치 3369.9) 아미노산조성비 : Ala; 1.02 (1), Arg; 2.94 (3), Glx; 5.94 (6), Gly; 1.00 (1), His; 0.91 (1), Leu; 2 (2), Lys; 3.93 (4), Phe; 0.99 (1), Pro; 4.01 (4), Ser; 2.88 (3), Val; 0.98 (1), Dap; N.D.
- <830>
- <831> 화합물 58. [Adod³]-hGhrelin(1-28)
- ESI-MS M; 3355.0 (이론치 3355.0) 아미노산조성비 : Ala; 1.01 (1), Arg; 2.91 (3), Glx; 5.95 (6), Gly; 1.01 (1), His; 0.91 (1), Leu; 2 (2), Lys; 3.94 (4), Phe; 0.99 (1), Pro; 4.02 (4), Ser; 2.88 (3), Val; 0.96 (1)
- <832>
- <833> 화합물 61. [Lys³(옥타노일)]-hGhrelin
- ESI-MS M; 3412.0 (이론치 3412.0) 아미노산조성비 : Ala; 1.05 (1), Arg; 3.05 (3), Glx; 6.02 (6), Gly; 1.00 (1), His; 1.00 (1), Leu; 2 (2), Lys; 5.11 (5), Phe; 0.97 (1), Pro; 4.20 (4), Ser; 2.68 (3), Val; 1.00 (1)
- <834>
- <835> 화합물 62. [Trp³]-hGhrelin
- ESI-MS M; 3343.0 (이론치 3343.9), 아미노산조성비 : Ala; 1.00 (1), Arg; 3.03 (3), Glx; 5.94 (6), Gly; 1.01 (1), His; 1.01(1), Leu; 2 (2), Lys; 4.00 (4), Phe; 0.99 (1), Pro; 3.96 (4), Ser; 2.60 (3), Trp; N.D., Val; 0.98 (1)
- <836>
- <837> 화합물 63. [Phe³]-hGhrelin
- ESI-MS M; 3305.0 (이론치 3304.8), 아미노산조성비 : Ala; 0.99 (1), Arg; 2.96 (3), Glx; 5.86 (6), Gly; 1.00 (1), His; 1.00 (1), Leu; 2 (2), Lys; 3.98 (4), Phe; 2.01 (2), Pro; 3.99 (4), Ser; 2.67 (3), Val; 0.98 (1)
- <838>

- <839> 화합물 64. [Cha³]-hGhrelin
- ESI-MS M; 3411.0 (이론치 3410.9), 아미노산조성비 : Ala ; 1.02 (1), Arg ; 3.01 (3), Glx ; 5.92 (6), Gly ; 1.01 (1), His +Cha; 2.01 (1+1), Leu ; 2 (2), Lys ; 4.02 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 4.03 (4), Ser ; 2.72 (3), Val ; 0.97 (1)
- <840>
- <841> 화합물 65. [2-^LNal³]-hGhrelin
- ESI-MS M; 3354.0 (이론치 3354.9), 아미노산조성비 : Ala ; 1.00 (1), Arg ; 2.95 (3), Glx ; 5.87 (6), Gly ; 1.02 (1), His ; 1.01 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 3.98 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 3.94 (4), Ser ; 2.73 (3), Val ; 0.97 (1), Nal ; N.D. (1)
- <842>
- <843> 화합물 66. [2-^DNal³]-hGhrelin
- ESI-MS M; 3355.0 (이론치 3354.9), 아미노산조성비 : Ala ; 1.02 (1), Arg ; 2.95 (3), Glx ; 5.96 (6), Gly ; 1.00 (1), His ; 0.92 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 3.94 (4), Phe ; 0.99 (1), Pro ; 4.02 (4), Ser ; 2.91 (3), Val ; 0.98 (1), Nal ; N.D. (2)
- <844>
- <845> 화합물 70. [Leu³]-hGhrelin
- ESI-MS M; 3270.0 (이론치 3270.8), 아미노산조성비 : Ala ; 0.99 (1), Arg ; 2.95 (3), Glx ; 5.88 (6), Gly ; 1.01 (1), His ; 1.00 (1), Leu ; 3 (3), Lys ; 3.96 (4), Phe ; 1.00 (1), Pro ; 3.89 (4), Ser ; 2.65 (3), Val ; 0.97 (1)
- <846>
- <847> 화합물 71. [Ile³]-hGhrelin
- ESI-MS M; 3270.0 (이론치 3270.8), 아미노산조성비 : Ala ; 0.98 (1), Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.87 (6), Gly ; 0.99 (1), His ; 1.01 (1), Ile ; 0.98 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 3.97 (4), Phe ; 1.00 (1), Pro ; 3.97 (4), Ser ; 2.65 (3), Val ; 0.98 (1)
- <848>
- <849> 화합물 72. [Lys³(옥타노일)]-hGhrelin
- ESI-MS M; 3286.0 (이론치 3285.8), 아미노산조성비 : Ala ; 1.02 (1), Arg ; 2.94 (3), Glx ; 5.95 (6), Gly ; 0.99 (1), His ; 0.92 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 4.92 (5), Phe ; 0.99 (1), Pro ; 4.02 (4), Ser ; 2.91 (4), Val ; 0.99 (1)
- <850>

<851> 화합물 73. [Nle³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3270.0 (이론치 3270.8), 아미노산조성비 : Ala ; 1.01 (1), Arg ; 2.98 (3), Glx ; 5.92 (6), Gly ; 1.02 (1), His ; 1.01 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 4.01 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 4.01 (4), Ser ; 2.71 (3), Val ; 0.98 (1), Nle ; N.D. (1)

<852>

<853> 화합물 74. [Val³]-hGhrelin

ESI-MS M; 3256.0 (이론치 3256.8), 아미노산조성비 : Ala ; 0.98 (1), Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.84 (6), Gly ; 1.00 (1), His ; 1.01 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 3.97 (4), Phe ; 0.99 (1), Pro ; 3.94 (4), Ser ; 2.64 (3), Val ; 1.97 (2)

<854>

<855> 화합물 80. [Aib¹, His², ^DNal³, ^DPhe⁴, Lys⁵]-그렐린(1-5)-아미드 ;

<856> 이파모렐린 (Ipamorelin)

ESI-MS [M+H]⁺; 712.5 (이론치 711.9), 아미노산조성비 : Phe; 1, His; 1.00 (1), Lys; 1.00 (1)

<857>

<858> 실시예 11 그렐린 유도체 펩티드계 화합물의 활성 비교

<859> 실시예 10 에서 합성한 그렐린 유도체 펩티드계 화합물 및 천연형 그렐린 펩티드에 대하여, 실시예 1 에 나타난 방법에 의해 Ca 상승 활성을 측정하였다.

<860> (1) 3 위 세린 측쇄의 수식

<861> 가. 옥타노일기의 위치

<862> 그렐린의 현저한 구조상의 특징은 3 위 세린 수산기의 옥타노일기이다. 먼저, 옥타노일화되는 세린의 위치가 3 위인 것이 활성 발현에 유리한 지의 여부를 조사하였다. 래트 GSH 리셉터를 발현시킨 CHO 세포를 사용하여, 세포내 칼슘 상승 작용을 지표로 하였다.

<863> 그 EC₅₀ 값이 5.4nM 으로 유지된 단쇄 그렐린 유도체인 그렐린(1-9)아미드를 토대로, [세린²(옥타노일), 세린³]-그렐린(1-9)아미드, [세린²(옥타노일)]-그렐린(1-9)아미드, 및 [N^a-옥타노일, 세린³]-그렐린(1-9)아미드를 합성하고, 세포내 칼슘 상승 활성을 검토하였다.

<864> 결과를 표 4 에 정리하였다.

표 4

그렐린 유도체의 활성 1

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|---|-----------------------------------|
| 1. 인간 그렐린 GSS (CO-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 1.3 |
| 2. 래트 그렐린 GSS (CO-C ₇ H ₁₅) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR | 1.5 |
| 3. 그렐린 (1-9)-amide H-Gly-Ser- Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH ₂ | 5.4 |
| 4. [Ser ² (옥타노일), Ser ³]- 그렐린 (1-9)-아미드 H-Gly- Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH ₂ | 1,100 |
| 5. [Ser ² (옥타노일)]- 그렐린 (1-9)-아미드 H-Gly- Ser (CO-C ₇ H ₁₅)- Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro - Glu-His-NH ₂ | 1,400 |
| 6. [N-옥타노일, Ser ³]- 그렐린 (1-9)-아미드 C ₇ H ₁₅ CO-Gly-Leu-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro- Glu-His-NH ₂ | >10,000 |

인간 그렐린의 옥타노일기를 3 위에서 2 위 세린으로 옮기면 활성은 약 1/200 으로 저하되었다 (EC₅₀ = 1,100nM).

2 위와 3 위의 양쪽에 옥타노일기를 갖는 유도체도 마찬가지로 활성이 저하되었다 (EC₅₀ = 1,400nM).

또 아미노 말단 아미노기만을 N-옥타노일화하면 활성은 비교적 약해졌다 (EC₅₀> 10,000nM).

이들 결과로부터 옥타노일기로 수식된 아미노산의 위치는 그렐린 분자에 있어서 3 위가 특히 바람직한 것이 판명되었다.

가. 지방산 사슬길이

래트 그렐린 3 위 세린 측쇄의 옥타노일기를 제거한 데스-옥타노일체의 세포내 칼슘 상승 활성은 옥타노일체의 2.6 nM 에서 3,500 nM 으로 저하되는 점에서, 3 위 세린 측쇄의 옥타노일기는 활성 발현에 매우 중요한 역할을 하는 것이 명확하다.

따라서 여러가지 포화 지방산을 사용하여, 래트 그렐린의 세린 측쇄 아실기의 탄소수와 활성 관계를 조사하였다. 즉 아세틸기 (CH₃CO-), 프로피오닐기 (CH₃CH₂CO-), 부티릴기 (CH₃(CH₂)₂CO-), 헥사노일기 (CH₃(CH₂)₄CO-), 데카노일기 (CH₃(CH₂)₈CO-), 라우로일기 (CH₃(CH₂)₁₀CO-) 및 팔미토일기 (CH₃(CH₂)₁₄CO-) 로 3 위 세린 수산기를 아실화한 그렐린 유도체의 세포내 칼슘 상승 활성을 구하였다.

결과를 표 5 에 정리하였다.

표 5

그렐린 유도체의 활성 2

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|---|-----------------------------------|
| 7. [Ser ³]-레트 그렐린 GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR | 3,500 |
| 8. [Ser ³ (아세틸)]-rGhrelin GSS(CO-CH ₃)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR | 780 |
| 9. [Ser ³ (프로피오닐)]-rGhrelin GSS(CO-C ₂ H ₅)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR | n. t. |
| 10. [Ser ³ (부티릴)]-rGhrelin GSS(CO-C ₃ H ₇)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR | 280 |
| 11. [Ser ³ (헥사노일)]-rGhrelin GSS(CO-C ₅ H ₁₁)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR | 16 |
| 12. [Ser ³ (데카노일)]-rGhrelin GSS(CO-C ₉ H ₁₉)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR | 1.7 |
| 13. [Ser ³ (라우로일)]-rGhrelin GSS(CO-C ₁₁ H ₂₃)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR | 2.4 |
| 14. [Ser ³ (팔미토일)]-rGhrelin GSS(CO-C ₁₅ H ₃₁)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR | 6.5 |

표에서 n.t. 는 시험하지 않은 것을 나타낸다.

지방산 사슬길이의 활성에 대한 영향은, 아세틸기 (C2) 에서 EC₅₀ 값이 780nM, 부타노일기 (C4) 에서 EC₅₀ 값이 280nM 으로 점점 현저해져, 헥사노일기 (C7) 에서 EC₅₀ 값이 16nM 으로 Ca 상승 활성이 더욱 상승되어, 옥타노일기 (그렐린) 에서 EC₅₀ 이 1.5nM 으로 Ca 상승 활성이 피크에 도달하였다. 데카노일기 (C10) 에서도 EC₅₀ 값이 1.7nM 으로 Ca 상승 활성은 그렐린과 동등하게 유지되고, 또한 라우로일기 (C12) 에서 EC₅₀ 값이 2.4nM, 팔미토일기 (C16) 에서도 EC₅₀ 값이 6.5nM 으로 지방산 사슬길이를 연장시켜도 Ca 상승 활성이 유지되었다.

나. 여러가지 아실 치환기

포화 지방산 대신에, 3-페닐프로피온산 (HO-CO-CH₂CH₂Ph) 을 방향족 지방산의 대표예로서 3 위 세린 수산기에 에스테르 결합시킨 인간 그렐린 유도체, 및 불포화 지방산의 대표예로서 3-옥텐산 (CH₃(CH₂)₃CH=CH-CH₂COOH), 분지상 지방산의 대표예로서 4-메틸펜탄산 ((CH₃)₂CH-CH₂CH₂CO₂H) 을 에스테르 결합시킨 인간 그렐린 유도체를 작성하여 활성을 평가하였다.

다. 알킬기로의 치환

화학적으로 불안정한 에스테르 결합을 더욱 안정된 에테르, 티오에테르 결합 등으로 변환하면 화학적으로 안정된 그렐린 유도체의 작성이 가능하다. 그러나 활성이 유지되는 것이 전제인 것은 말할 필요도 없다.

따라서 인간 그렐린의 3 위 세린을 옥틸 (C₈H₁₇) 화한 인간 그렐린의 에테르 유도체, 및 레트 그렐린의 3 위 세린을 시스테인으로 치환하고, 마찬가지로 옥틸화한 레트 그렐린의 티오에테르체의 활성을 조사하였다.

또 인간 그렐린의 3 위 세린을 벤질화 (-CH₂Ph) 한 유도체, 및 인간 그렐린의 3 위 세린을 시스테인으로 치환하여 트리틸화 (-C(Ph)₃) 한 유도체를 작성하였다.

결과를 표 6 에 정리하였다. 또한, 인간 그렐린의 3 위 세린을 벤질화 (-CH₂Ph) 한 유도체, 및 인간 그렐린의 3 위 세린을 시스테인으로 치환하여 트리틸화 (-C(Ph)₃) 한 유도체의 Ca 상승 활성에 대해서는, 표 13 에 화합물 67, 68 로서 결과를 기재하였다. 또 4-메틸펜탄산 ((CH₃)₂CH-CH₂CH₂CO₂H) 을 3 위 세린 수산기에 에스테르 결합시킨 인간 그렐린 유도체의 Ca 상승 활성에 대해서도, 표 13 에 화합물 69 로서 결과를 기재하였다.

표 6

그렐린 유도체의 활성 3

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|--|-----------------------------------|
| 15. [Ser ³ (3- 페닐프로피오닐)]-hGhrelin GSS(CO-CH ₂ CH ₂ Ph) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 1.4 |
| 16. [Ser ³ (3- 옥테노일)]-hGhrelin GSS(CO-CH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ CH ₃) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 1.7 |
| 17. [Ser ³ (옥틸)]-hGhrelin GSS(C ₈ H ₁₇) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 1.2 |
| 18. [Cys ³ (옥틸)]-rGhrelin GSC(C ₈ H ₁₇) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR | 5.4 |

<884>

<885>

불포화 지방산인 3-옥테노일기를 3 위의 세린 측쇄에 도입하여도, 옥타노일기와 동등한 Ca 상승 활성 (EC₅₀=1.7nM) 이었다.

<886>

흥미깊은 것은 페닐프로피오닐기의 도입에서도, EC₅₀=1.4nM 으로 Ca 상승 활성이 유지되고, 또 분지상 지방산으로 C6 에 상당하는 4-메틸펜타노일기를 도입하여도, EC₅₀ 값이 4.4nM 으로, Ca 상승 활성이 유지된 (표 13, 화합물 69) 점에서, 3 위 세린 측쇄의 아실기는 반드시 직쇄 알카노일기일 필요는 없는 것이 명확해졌다.

<887>

또한, 화학적 안정성을 기대할 수 있는 3 위 세린 또는 시스테인을 옥틸화한 에테르 및 티오에테르체의 EC₅₀ 값이, 각각 1.2nM, 5.4nM 으로 유지된 점에서, 3 위 아미노산 잔기 측쇄는 반드시 아실기일 필요는 없는 것이 명확해졌다.

<888>

또, 3 위를 Ser(Bzl) [인간 그렐린의 3 위 세린을 벤질화 (-CH₂Ph) 한 유도체], 또는 Cys(Trt) [인간 그렐린의 3 위 세린을 시스테인으로 치환하여 트리틸화 (-C(Ph)₃) 한 유도체] 로 치환한 그렐린도, EC₅₀ 값이 각각 7.6nM, 20nM 이고, Ca 상승 활성이 유지되었다 (표 13, 화합물 67, 68).

<889>

(2) 활성 영역의 검색

<890>

카르복실 말단부를 포함하는 그렐린 (16-28) 에 세포내 Ca 상승 활성이 비교적 낮은 (EC₅₀ > 10,000nM) 점, 또한, 아미노 말단부를 포함하는 인간 그렐린 (1-15) 과 래트 인간 그렐린 (1-15) 의 EC₅₀ 값이 각각 7.0nM, 8.6nM 으로 세포내 Ca 상승 활성이 유지된 점에서, 그렐린의 활성 부위는 아미노 말단 부분에 존재하는 것이 명확해졌다 (표 7).

표 7

그렐린 유도체의 활성 4

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|--|-----------------------------------|
| 19. 그렐린 (16-28) H-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-pro-Ala-lysLeu-Gln-Pro-Arg-OH | >10,000 |
| 20. hGhrelin(1-15) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-OH | 7.0 |
| 21. rGhrelin(1-15) H-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-OH | 8.6 |
| 22. [des Gln ¹⁴]-rGhrerin GSS(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQKAQ_RKESKKPPAKLQPR | 1.5 |

<891>

<892>

또 그렐린 (1-15) 에 있어서, 인간형과 래트형의 활성이 대략 동등한 점에서, 11 위와 12 위의 아미노산 잔기

(인간에서는 -아르기닐-발릴, 래트에서는 -라이실-알라닐-) 는 이들의 아미노산에 한정되지 않는다.

<893> 이와 같은 인간 그렐린, 또는 래트 그렐린에서 얻어진 구조 활성 상관의 결과는, 각각 래트 그렐린 또는 인간 그렐린에 적용할 수 있다.

<894> 또 14 위의 글루타민을 제거한 [데스-글루타민¹⁴]-래트 그렐린에, 래트 그렐린과 같은 Ca 상승 활성 ($EC_{50}=1.5nM$) 이 확인된 점에서, 그렐린 분자 중앙부의 아미노산이 결손되어도 된다.

<895> (3) 펩티드 사슬길이와 카르복실 말단으로의 염기성 기의 도입

<896> 활성이 비교적 강하게 보인 그렐린 (1-15) 을 근거로, 적절히 카르복실 말단측 아미노산 잔기를 결손시킨 유도체를 작성하여 활성을 평가하였다.

<897> 카르복실 말단이 카르복실산인 단쇄 유도체와 카르복실 말단이 아마이드화된 단쇄 유도체의 활성을 표 8 에 나타냈다.

표 8

그렐린 유도체의 활성 5

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC_{50} (nM) |
|--|-------------------------------|
| 23. hGhrelin(1-11) H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-OH | 15 |
| 24. rGhrelin(1-11) H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-OH | 15 |
| 25. 그렐린 (1-10) H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH | 19 |
| 26. 그렐린 (1-9) H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-OH | 38 |
| 27. 그렐린 (1-8) H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-OH | 100 |
| 28. 그렐린 (1-8)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-NH ₂ | 13 |
| 29. 그렐린 (1-7)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 2.6 |
| 30. 그렐린 (1-6)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-NH ₂ | 4.8 |
| 31. 그렐린 (1-5) H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-OH | 68 |
| 32. 그렐린 (1-5)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-NH ₂ | 6.2 |
| 33-1. 그렐린 (1-4) H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-OH | 480 |
| 33-2. 그렐린 (1-4)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-NH ₂ | 160 |
| 34. 그렐린 (1-3)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-NH ₂ | >10,000 |

<898> 그렐린 (1-3) 아미드의 Ca 상승 활성은 비교적 낮았다 ($EC_{50} > 10,000nM$). 페닐알라닌을 연장시킨 그렐린 (1-4) 에서는 EC_{50} 값이 480nM, 그 카르복실 말단 아마이드체가 160nM 으로 Ca 상승 활성이 현저해졌다.

<900> 또한 류신아미드를 부가한 그렐린 (1-5) 아마이드체의 활성은, (1-4) 아마이드체의 약 26 배가 더욱 상승되어

(EC₅₀=6.2nM), 천연품과 동일한 레벨의 Ca 상승 활성을 나타냈다.

- <901> 가장 강한 Ca 상승 활성은 그렐린 (1-7) 아마이드체에서 보이고, 그 EC₅₀ 값은 2.6nM 으로 천연품과 대략 동일하였다.
- <902> 이상의 결과로부터, 그렐린 활성 발현을 위해 필수인 구조적 요인은 아미노 말단부 4 잔기의 서열에 집약되는데, 5 위에 류신 등의 잔기가 부가됨으로써, 그렐린 수용체로의 친화성, 또는 시그널 트랜스덕션이 극적으로 향상되기 때문에, 5 위에 류신 등의 잔기가 부가되는 것이 바람직하다.
- <903> 또 상기 결과로부터 명확한 바와 같이, 카르복실 말단 카르복실산을 아마이드화함으로써 Ca 상승 활성이 상승되는 경향이 확인되었다.
- <904> 예컨대 그렐린 (1-9) 에서는, 아마이드화함으로써 EC₅₀ 값이 38nM 에서 5.4nM 으로 Ca 상승 활성이 약 7 배, 그렐린 (1-4) 에서는 EC₅₀ 값이 480 nM 에서 160 nM 으로 Ca 상승 활성이 약 3 배로 상승되었다. 또 그렐린 (1-9) 아마이드의 9 위 염기성 잔기 히스티딘 잔기를 제거한 그렐린 (1-8) 아마이드에서는, EC₅₀ 값이 5.4nM 에서 13nM 으로 되어 Ca 상승 활성이 저하되고, 또한 산성 아미노산인 8 위 글루타민산을 제거한 그렐린 (1-7) 아마이드에서는, 반대로 EC₅₀ 값이 13nM 에서 2.6 nM 으로 되어 Ca 상승 활성이 상승되었다.
- <905> 아마이드화 효과의 하나는 카르복실산의 염전하의 중화이고, 상기의 결과는, 단쇄 유도체에서 카르복실 말단 아미노산의 염기성이 활성 상승에 크게 기여하는 것을 나타낸다.
- <906> 이 결과를 근거로, 높은 활성이 얻어진 그렐린 (1-7) 아마이드를 중심으로, 카르복실 말단부에 염기성을 부여한 유도체를 작성하고, 활성을 조사하였다.
- <907> 결과를 표 9 에 나타낸다.

표 9

그렐린 유도체의 활성 6

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|---|-----------------------------------|
| 35. [Lys ⁸]- 그렐린 (1-8)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Lys-NH ₂ | 1.1 |
| 36. [Arg ⁸]- 그렐린 (1-8)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Arg-NH ₂ | 1.1 |
| 37. [Lys ⁶]- 그렐린 (1-6)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Lys-NH ₂ | 12 |
| 38. [Lys ⁵]- 그렐린 (1-5)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Lys-NH ₂ | 10 |
| 39. [Phe ⁴ , Lys ⁵]- 그렐린 (1-5)-아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)- ^D Phe-Lys-NH ₂ | 1,700 |

- <908>
- <909> 그렐린 (1-5) 의 카르복실 말단부에 라이신을 도입한 [라이신⁶]-그렐린(1-6)아미드의 EC₅₀ 값은, 4.8nM 에서 12nM 으로 되어, Ca 상승 활성은 약간 저하되었지만, 그렐린 (1-4) 에서는, 카르복실 말단에 라이신을 부가함으로써, EC₅₀ 값이 480nM 에서 10nM 으로 되어, Ca 상승 활성이 약 50 배 상승되었다. 또 그렐린 (1-7) 의 카르복실 말단부에 아르기닌 또는 라이신을 부가한 아마이드 유도체의 활성은, 그렐린(1-7) 아마이드 (EC₅₀ =2.6nM) 와 비교하여, 모두 1.1nM 으로 매우 강한 세포내 칼슘 상승 활성을 나타냈다.
- <910> 이상, 대부분의 경우에 있어서, 카르복실 말단부에서의 산성의 마스킹 및 염기성 기를 도입함으로써, 활성이 상승되는 것이 명확해졌다.
- <911> (4) 아미노 말단 글리신과 2 위 세린 잔기
- <912> 활성이 확인된 그렐린 (1-7) 아마이드 (EC₅₀ =2.6nM) [표 8 화합물 29], 또는 그렐린 (1-9) 아마이드 (EC₅₀ =5.4nM) [표 4 화합물 3] 를 근거로, 아미노 말단 글리신과 2 위 세린의 활성에 대한 영향을 조사하였다.

<913> 결과를 표 10 에 정리하였다.

표 10

그렐린 유도체의 활성 7

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|---|-----------------------------------|
| 40. [N-아미노펜타노일]-그렐린 (3-7)-아미드 NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 3.4 |
| 41. [N-아세틸]-그렐린 (1-10) CH ₃ CO-Gly-Ser-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH | >10,000 |
| 42. [N-Tyr]-rGhrelin YGSS(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQKQQRKESKKPPAKLQPR | 120 |
| 43. [N-글리실]-그렐린 (3-7)-아미드 H-Gly-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 380 |
| 44. [Leu ²]-그렐린 (1-7)-아미드 H-Gly-Leu-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 42 |
| 45. [His ²]-그렐린 (1-7)-아미드 H-Gly-His-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 35 |
| 46. [Lys ²]-그렐린 (1-7)-아미드 H-Gly-Lys-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 24 |
| 47. [Gly ²]-그렐린 (1-7)-아미드 H-Gly-Gly-Ser(CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 78 |

<914>

<915> 아미노 말단의 아미노기를 블록한 N^a-아세틸-그렐린 (1-10) 의 활성이 비교적 약해졌다 (EC₅₀ > 10,000nM).

또 상술한 바와 같이 [N^a-옥타노일,세린³]-그렐린(1-9)아미드 (표1 화합물 6) 의 활성도 비교적 약해진 점에서 (EC₅₀> 10,000nM), 아미노 말단의 아미노기가 블록되어 있지 않은 것이 Ca 상승 활성 발현에서 바람직하다.

<916>

또한, 아미노 말단의 글리신과 2 위 세린을, 2 잔기 길이에 상당하는 5-아미노-n펜탄산 (NH₂-(CH₂)₄-CO-) 으로 치환하였다. N^a-아미노펜타노일-그렐린 (3-7) 아미드의 Ca 상승 활성이 대략 유지된 점 (EC₅₀=3.4nM) 및 2 위 세린을 결손시킨 [N^a-글리실]그렐린 (3-7) 아미드의 Ca 상승 활성이 저하된 점 (EC₅₀=380nM), 아미노 말단에 티로신 잔기를 부여한 [N-티로실]-래트 그렐린의 Ca 상승 활성이 저하된 점 (EC₅₀=120nM) 등에서, 더욱 강한 활성을 얻기 위해 바람직한 아미노 말단 아미노기의 위치는, 3 위의 옥타노일세린 잔기부터 아미노산 잔기에서 2 잔기 상당분, 아미노 말단 방향으로 존재하는 것이 바람직하다.

<917>

또 그렐린 (1-7) 아미드에 있어서, 2 위 세린을 류신, 글리신, 히스티딘, 라이신으로 치환한 유도체의 EC₅₀ 값은 각각 42nM, 78nM, 35nM, 24nM 으로 되어, 그렐린 (1-7) 아미드와 비교하여, Ca 상승 활성이 약간 저하되었다.

<918>

본 결과로부터 2 위 세린 잔기-NH-CH(CH₂OH)-CO- 가 아미노펜탄산의 부분 구조-CH₂-CH₂-CO- 로 치환할 수 있는 점에서, 적어도 2 위 세린 잔기는 그렐린 아미노 말단의 아미노기를 3 위 옥타노일기에서 일정한 거리를 유지하는 스페이서적인 역할을 한다. 또 5-아미노펜탄산의 치환으로 활성이 유지된 것은, 알킬아민 구조의 도입에 의해 아미노 말단의 염기성이 상승되었기 때문이기도 하다.

<919>

이상을 정리하면, 아미노 말단부의 글리신 잔기는, 그 아미노기로써 그렐린 분자의 아미노 말단에 염기성을 부여하여 그렐린의 활성을 발현시키는 것으로 생각되기 때문에, 아미노 말단부의 아미노기는 블록되어 있지 않은 것이 바람직하다.

<920>

또 2 위 세린 잔지는 아미노 말단 아미노기를 3 위 옥타노일기에서 일정한 거리를 유지하는 스페이서적인 역할을 하는 것으로 생각되기 때문에, 비교적 부피가 작은 측쇄를 갖는 아미노산이나 비아미노산 화합물로 치환하여도 된다. 즉 그렐린 분자에 있어서 아미노 말단 아미노기를 기점으로 옥타노일기의 위치가 규정되어 있어,

이 위치관계가 그렐린 활성 구조의 일부를 형성한다.

<921> 즉 2 위 아미노산 측쇄는 부피가 큰 구조보다는, 오히려 세린, 알라닌, 노르발린과 같이 측쇄가 비교적 작고, 인접 잔기의 자유도를 속박하지 않는 아미노산 잔기가 바람직하다. 또한 N^a-아미노펜타노일-그렐린 (3-7) 아미드의 Ca 상승 활성이 대략 유지된 (EC₅₀=3.4nM) 점에서, 2 위 세린은 비아미노산 화합물로 치환가능하다.

<922> (5) 3 위 및 4 위 아미노산 잔기의 광학 활성

<923> 그렐린 (1-7) 아미드의 구조를 근거로, 3 위 세린과 4 위 페닐알라닌을 각각 L-체에서 D-체로 변환한 유도체를 작성하여 3 위와 4 위 아미노산의 광학 활성이 활성에 부여하는 영향을 검토하였다. 구체적으로는 양호한 활성이 유지된 [세린³(옥틸)]-그렐린 (1-7) 아미드 (EC₅₀=5.8nM) [표 11, 화합물 50], 또는 [시스테인³(옥틸)]-그렐린 (1-7) 아미드 (EC₅₀=7.4nM) [표 11, 화합물 48] 를 근거로 3 위 세린과 4 위 페닐알라닌을 각각 대응하는 L-체, D-체로 치환한 유도체를 작성하였다.

<924> 결과를 표 11 에 정리하였다. 이 결과로부터, 3 위와 4 위의 아미노산은 모두 L-체인 것이 바람직하다.

표 11

그렐린 유도체의 활성 8

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|---|-----------------------------------|
| 48. [Cys ³ (옥틸)]- 그렐린 ₁ (1-7)-아미드 H-Gly-Ser-Cys(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 7. 4 |
| 49. [Cys ³ (옥틸), ^D Phe ⁴]- 그렐린 ₁ (1-7)-아미드 H-Gly-Ser-Cys(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 3, 000 |
| 50. [Ser ³ (옥틸)]- 그렐린 ₁ (1-7)-아미드 H-Gly-Ser-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 5. 8 |
| 51. [Ser ³ (옥틸), ^D Phe ⁴]- 그렐린 ₁ (1-7)-아미드 H-Gly-Ser-Ser(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 2, 200 |
| 52. [^D Ser ³ (옥틸)]- 그렐린 ₁ (1-7)-아미드 H-Gly-Ser- ^D Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | >10, 000 |
| 53. [^D Ser ³ (옥틸), ^D Phe ⁴]- 그렐린 ₁ (1-7)-아미드 H-Gly-Ser- ^D Ser(C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | >10, 000 |

<925> (6) 3 위 측쇄의 결합 양식

<926> 3 위의 측쇄 사슬길이가 그렐린 사슬길이 (-CH₂-O-CO-C₇H₁₅)와 동일해지도록, 본래의 에스테르 결합을 역방향의 에스테르 (화합물번호 54), 아미드 (화합물번호 55, 56), 디설피드 (화합물번호 57), 메틸렌 (화합물번호 58)로 치환한 유도체를 작성하였다. 함께 β 탄소상에 입체장애를 가진 에스테르 유도체 (화합물번호 59, 60), 메틸렌이 3 유닛분 연장된 형태의 아미드 유도체 (화합물번호 61)를 작성하였다. 결과를 표 12 에 정리하였다.

표 12

그렐린 유도체의 활성 9

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|---|-----------------------------------|
| 54. [Asp ³ (O- 헵틸)]-hGhrelin GSD(O-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 5.1 |
| 55. [Asp ³ (NH- 헵틸)]-hGhrelin GSD(NH-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 11 |
| 56. [Dap ³ (옥타노일)]-hGhrelin GS-NH- ^L CH(CH ₂ NHCO-C ₇ H ₁₅)-CO-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 2.6 |
| 57. [Cys ³ (S- 헵틸)]-hGhrelin GSC(S-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 1.4 |
| 58. [Adod ³]-hGhrelin GS-NH-CH(n-C ₁₀ H ₂₁)-CO-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 0.91 |
| 59. [Thr ³ (옥타노일)]-hGhrelin GST(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 10 |
| 60. [Leu ² , Thr ³ (옥타노일)]-hGhrelin GLT(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 46 |
| 61. [Lys ³ (옥타노일)]-hGhrelin GSK(CO-C ₇ H ₁₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 32 |

<928>

<929>

3 위 측쇄를 전부 메틸기로 치환한 화합물 58 의 활성이 가장 강하고, EC₅₀ 값은 1nM 이하이었다. 그 외, 결합 종류에 따라 활성의 고저는 다소 보이지만, 3 위 아미노산 측쇄에 결합 양식은 활성에 큰 영향을 주지 않는 것이 확인되었다.

<930>

(7) 3 위 측쇄의 소수성

<931>

3 위의 Ser (옥타노일) 기를 천연 아미노산을 중심으로 소수성 아미노산으로 치환한 유도체를 작성하고, 이들의 활성을 조사하였다. 결과를 표 13 에 정리하였다.

표 13

그렐린 유도체의 활성 10

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|--|-----------------------------------|
| 62. [Trp ³]-hGhrelin GSWFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 31 |
| 63. [Phe ³]-hGhrelin GSFFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 2,000 |
| 64. [Cha ³]-hGhrelin GS-Cha-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 19 |
| 65. [2- ¹ NaI ³]-hGhrelin GS- ¹ NaI-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 8.2 |
| 66. [2- ^D NaI ³]-hGhrelin GS- ^D NaI-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | >10,000 |
| 67. [Ser ³ (Bzl)]-hGhrelin GSS(CH ₂ -C ₆ H ₅)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 7.6 |
| 68. [Cys ³ (트리틸)]-hGhrelin GSC(C-Ph ₃)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 20 |
| 69. [Ser ³ (4- 메틸펜타노일)]-hGhrelin GSS(CO-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 4.4 |
| 70. [Leu ³]-hGhrelin GSLFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 4,400 |
| 71. [Ile ³]-hGhrelin GSIFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | >10,000 |
| 72. [Lys ³]-hGhrelin GSKFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 120 |
| 73. [Nle ³]-hGhrelin GS-Nle-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 2,800 |
| 74. [Val ³]-hGhrelin GSVFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR | 1,600 |

<932>

<933>

3 위에 트립토판, 시클로헥실알라닌, 나프틸알라닌과 같은 방향족성의 소수성 아미노산을 갖는 유도체의 EC₅₀ 값은, 각각 31nM, 19nM, 8.2nM 으로, Ca 상승 활성은 유지되었다. 의외로 페닐알라닌을 3 위에 도입하면 약간 Ca 상승 활성은 낮았지만, 소수성을 상승시킨 Ser(Bzl), Cys(트리틸)을 3 위에 도입하여도, 동일하게 Ca 상승 활성은 유지되었던 점에서, 3 위 측쇄의 소수성은 활성 발현에 더욱 바람직한 것이 확인되었다.

<934>

또한 3 위에 류신, 이소류신, 노르류신, 발린과 같은 지방족성의 소수성 아미노산을 도입하면, 방향족성 아미노산을 도입한 경우와 비하여 약간 낮기는 하지만, 전반적으로 Ca 상승 활성은 유지되었다. 노르류신을 3 위에 갖는 화합물 73 의 활성이 EC₅₀=2,800nM 인 것에 대하여, 노르류신 측쇄에 아미노기가 부가된 6-아미노-노르류신(라이신 ; 화합물 72)의 활성은 EC₅₀ 값이 120nM 으로 상승되는 것은, 상술한 카르복실기 말단에서 염기성인 것이 바람직한 것과 마찬가지로, 3 위 측쇄에서도 염기성의 부여가 바람직한 것이 확인되었다.

<935>

(8) 단쇄 그렐린 유도체

<936>

그렐린의 활성은 아미노 말단부 1-4 에서 현저하게 발현되고, 5 위에 류신을 부가함으로써 증강되는 점, 3 위 아미노산 잔기는 소수성 측쇄를 갖는 것이 바람직한 점, 염기성 잔기의 도입이 활성을 상승시키는 점, 및 1 위와 2 위의 아미노산 잔기는 δ-아미노산 등의 2 잔기 상당 길이의 비아미노산 화합물로 치환될 수 있는 점 등의 결과로부터, 표 14 또는 표 15 의 화합물번호 76 내지 87 에 나타낸 바와 같이, 아미노 말단부(1-5) 서열을 기체로 한 여러가지의 단쇄 그렐린 유도체를 작성하여, 이들의 활성을 조사하였다. 결과를 표 14 및 표 15 에 정리하였다.

<937>

또한 화합물 80 은 이미 알려져 있다(이파모렐린 ; K. Raum 외, Eur. J. of Endocrinol., 139 권, 552~561

페이지, 1998 년).

표 14

그렐린 유도체의 활성 1 1

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|---|-----------------------------------|
| 75. [Lys ⁷]- 그렐린 ₁ (1-7)- 아미드 H-Gly-Ser-Ser (CO-C ₇ H ₁₅)-Phe-Leu-Ser-Lys-NH ₂ | 11 |
| 76. [N-아미노펜타노일, Ser ³ (옥틸), Lys ⁵]- 그렐린 ₁ (3-5)- 아미드 NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser (C ₈ H ₁₇)-Phe-Lys-NH ₂ | 12 |
| 77. [N-아미노펜타노일, ^D Ser ³ (옥틸), ^D Phe ⁴ , Lys ⁵]- 그렐린 ₁ (3-5)- 아미드 NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO- ^D Ser (C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Lys-NH ₂ | 1, 600 |
| 78. [Aib ¹ , His ² , Ser ³ (옥틸), Lys ⁵]- 그렐린 ₁ (1-5)- 아미드 H-Aib-His-Ser (C ₈ H ₁₇)-Phe-Lys-NH ₂ | 34 |
| 79. [Aib ¹ , His ² , ^D Ser ³ (옥틸), ^D Phe ⁴ , Lys ⁵]- 그렐린 ₁ (1-5)- 아미드 H-Aib-His- ^D Ser (C ₈ H ₁₇)- ^D Phe-Lys-NH ₂ | 38 |
| 80. [Aib ¹ , His ² , ^D Nal ³ , ^D Phe ⁴ , Lys ⁵]- 그렐린 ₁ (1-5)- 아미드 H-Aib-His- ^D Nal- ^D Phe-Lys-NH ₂ | 2. 5 |

이미 알려져 있는 화합물 80 의 Ca 상승 활성이 2.5nM 으로 높았던 점에서, 화합물 80 에서의 3 위의 2-D-나프틸알라닌을 D-옥틸세린으로 치환한 화합물 79 의 활성을 조사한 결과, EC₅₀ 값은 38nM 으로 활성은 유지되었다.

1 위와 2 위의 아미노산 구조가 다르지만, 화합물 79 와 동일하게 D-옥틸세린과 D-페닐알라닌을 3 위와 4 위에 갖는 화합물 77 의 활성이 1,600nM 으로 저하된 것을 함께 고려하면, 1 위와 2 위에 대응하는 아미노산의 서열 또는 구조가, 활성 발현에 중요한 3 위와 4 위의 아미노산 측쇄의 입체 배치에도 영향을 주고 있다.

즉 1, 2 위를 아미노펜탄산으로 치환한 경우, 3 위의 2-D-나프틸알라닌과 4 위 D-페닐알라닌을, 각각 대응하는 L-아미노산으로 치환하여도 활성은 34nM 으로 유지된 (화합물 78) 점 등에서, 그렐린의 1 위와 2 위의 아미노산 서열, Gly-Ser 은 3 위와 4 위에 L-입체 서열을 요구하지만, 다른 아미노산 서열, 예컨대 Aib-His 등의 도입에 의해 3, 4 위가 D-입체 배치에서도 활성이 현저해진다. 또는 1, 2 위에 아미노펜탄산을 도입함으로써 3, 4 위는 L-, D- 어느 입체 배치에서도 활성 발현이 보이는 것이 확인되었다.

표 15

그렐린 유도체의 활성 1 2

| 화합물 구조 | Ca 상승 활성 EC ₅₀ (nM) |
|--|--------------------------------------|
| 81. [N-아미노펜타노일, Ser ³ (옥틸)]-그렐린(3-5)-아미드 NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH ₂ | 11 |
| 82. [N-아미노펜타노일, Ser ³ (옥틸)]-그렐린(3-5)-메틸아미드 NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-CH ₃ | 12 |
| 83. [N-아미노펜타노일, Ser ³ (옥틸)]-그렐린(3-5)-에틸아미드 NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-C ₂ H ₅ | 22 |
| 84. [N-아미노펜타노일, Ser ³ (옥틸)]-그렐린(3-5)-벤질아미드 NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-CH ₂ -C ₆ H ₅ | 98 |
| 85. [N-아미노펜타노일, Ser ³ (옥틸)] -그렐린(3-5)-아미노에틸아미드 NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-Phe-Leu-NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂ | 3.5 |
| 86. [N-아미노펜타노일, Ser ³ (옥틸), MePhe ⁴ , MeLeu ⁵] -그렐린(3-5)-아미드 NH ₂ -(CH ₂) ₄ -CO-Ser(C ₈ H ₁₇)-MePhe-MeLeu-NH ₂ | 82 |
| 87. [PLeu ⁵]-hGhrelin GSS(CO-C ₇ H ₁₅)F-DL-SPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR | 220 |

<941>

<942>

그렐린의 아미노 말단부 (1-5) 서열을 기체로 한 [N-아미노펜타노일, Ser³(옥틸)]-그렐린(3-5)를 사용하여, 카르복실기 말단부의 구조 활성 상관을 조사하였다. 5 위 류신의 카르복실기 말단을 아미드, 메틸아미드, 에틸아미드, 벤질아미드로 수식한 결과, 활성은 유지되었으나, EC₅₀ 값이 각각 11nM, 12nM, 22nM, 98nM으로 점점 저하되는 경향을 볼 수 있었다. 또한 에틸아미드를 아미노에틸아미드로 함으로써, EC₅₀이 3.5nM으로 활성은 상승된 점에서, 그렐린 분자에 있어서 카르복실기 말단부에 염기성을 부여하는 것이 바람직한 것을 알 수 있었다.

<943>

이들 여러가지 카르복실 말단 아미드 유도체는, 생체내에서 카르복시펩티다아제류에 의한 효소분해에 저항하는 점에서도 유용한 화합물이다. 마찬가지로 N-메틸아미노산을 함유하는 화합물 86 (EC₅₀=86nM)도 효소 저항성을 갖는 점에서 유용한 화합물이다.

<944>

실시예 12 래트에서의 그렐린 유도체의 GH 방출 활성

<945>

(1) 래트에서의 각종 장쇄 그렐린 유도체의 GH 방출 활성

<946>

넵부탈 마취하의 IGS-SD 계 래트 (약 7 주령)에 화합물 17 ; [Ser³(옥틸)]-hGhrelin을 18nmol/kg, 화합물 18 ; [Cys³(옥틸)]-rGhrelin을 30nmol/kg, 화합물 65 ; [2-^LNal³]-hGhrelin을 100nmol/kg, 또는 화합물 15 ; [Ser³(3-페닐프로피닐)]-hGhrelin을 18nmol/kg을 급속히 정맥내 투여하였다 (각 n=3). 투여 15분 후에 혈장을 채취하고, GH 농도를 라디오이뮤노어세이법 (Biotrak/Amersham 사)으로 측정하였다. 컨트롤로서 0.2% 소혈청 알부민 (BSA)-생리식염액과 각각 6nmol/kg의 rGhrelin, hGhrelin, 80nmol/kg의 이파모렐린 (화합물 80)을 투여하고, 투여 후 15분에 혈장 중 GH 농도를 비교하였다 (각 n=3).

<947>

결과를 표 13에 나타낸다. 화합물 17 ; [Ser³(옥틸)]-hGhrelin 및 화합물 18 ; [Cys³(옥틸)]-rGhrelin 및 화합물 15 ; [Ser³(3-Phprl)]-hGhrelin는 모두 강한 GH 방출 활성을 나타내고, [2-^LNal³]-hGhrelin의 GH 방출

활성도 세포내 Ca 상승 활성과 좋은 상관을 볼 수 있었다.

표 16

각종 장쇄 그렐린 유도체의 GH 방출 활성

| 투여 화합물 | EC ₅₀ 값 (nM) | 투여량 (nmol/kg) | 투여 15 분후의 혈장 중 GH 농도 (ng/mL) | | | |
|--|----------------------------|------------------|---------------------------------|---------|---------|--------------|
| | | | 개체 1 | 개체 2 | 개체 3 | 평균 ±표준편차 |
| 생리식염수 | — | — | 32 | 52 | 59 | 49 ±12 |
| hGhrelin | 1.3 | 6 | 1802 | 1613 | 2203 | 1873 ±301 |
| rGhrelin | 1.5 | 6 | 2056 | 1082 | 1205 | 1448 ±530 |
| 이파모렐린 (화합물 80) | 2.5 | 80 | 377 | 260 | 1184 | 607 ±503 |
| [Ser ³ (옥틸)] -hGhrelin | 1.2 | 18 | 1626 | 1602 | 1743 | 1657 ±75 |
| [Cys ³ (옥틸)] -rGhrelin | 5.4 | 30 | 2786 | 2342 | 2354 | 2494 ±253 |
| [Ser ³ (페닐프로피오닐)] -hGhrelin | 1.4 | 18 | 2119 | 2078 | 1581 | 1926 ±299 |
| [2- ¹ Nal ³]-hGhrelin | 8.2 | 100 | 1637 | 1576 | 1357 | 1524 ±147 |

(2) [Cys³(옥틸)]-라트 그렐린 투여에 의한 혈장 중 GH 농도 추이

네파탈 마취하의 Wistar 계 웅성 래트 (약 260-280g) 에 화합물 18 ; [Cys(옥틸)]-라트 그렐린을 5μg/마리 정맥 내 투여했을 때의, 혈중에 방출되는 GH 를 측정하였다. 컨트롤로서 생리식염수 및 래트 그렐린 (5μg/마리) 을 투여하고, 본품과 비교하였다.

표 17 ~ 19 에 나타낸 바와 같이, [Cys³(Octyl)]-rat Ghrelin 의 GH 분비 촉진 활성은, 분비된 GH 의 Cmax 가 천연형 래트 그렐린과 동등 (모두 약 1,100ng/ml) 하고, 또한 분비 시간을 연장시키는 경향을 나타냈다. 본 품의 세포내 Ca 상승 활성은 EC₅₀ 값으로 5.4nM 이었다.

표 17

[Cys³(옥틸)]-라트 그렐린 투여에 의한 혈장 중 GH 농도 추이

| [Cys(C18) ³] -라트 그렐린 5 μg/마리 | | 시간 (분) | | | | | | |
|--|------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|------------|
| | | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | 60 |
| 혈장 중 GH 농도 (ng/mL) | 개체 1 | 377 | 338 | 687 | 927 | 900 | 469 | 98 |
| | 개체 2 | 101 | 294 | 258 | 300 | 358 | 245 | 86 |
| | 개체 3 | 59 | 476 | 949 | 1229 | 1417 | 704 | 133 |
| | 개체 4 | 33 | 530 | 959 | 1451 | 1299 | 800 | 220 |
| | 개체 5 | 32 | 613 | 1060 | 1561 | 1359 | 726 | 122 |
| 평균 ±표준편차 | | 120 ±146 | 450 ±133 | 783 ±324 | 1093 ±506 | 1067 ±445 | 589 ±229 | 132 ±53 |

표 18

생리식염액 투여에 의한 혈장 중 GH 농도 추이

| 생리식염액 | | 시간 (분) | | | | | | |
|---------------------------------|------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|
| | | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | 60 |
| 혈장 중 GH 농도 (ng/mL) | 개체 1 | 0 | 88 | 129 | 133 | 116 | 107 | 430 |
| | 개체 2 | 204 | 122 | 118 | 134 | 128 | 69 | 36 |
| | 개체 3 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 |
| | 개체 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 | 27 | 110 |
| | 개체 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 210 |
| 평균 ± 표준편차 | | 56 ± 89 | 42 ± 58 | 49 ± 67 | 53 ± 73 | 58 ± 61 | 41 ± 47 | 159 ± 170 |

표 19

래트 그렐린 투여에 의한 혈장 중 GH 농도 추이

| 래트 그렐린 5 μg/마리 | | 시간 (분) | | | | | | |
|---------------------------------|------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | 60 |
| 혈장 중 GH 농도 (ng/mL) | 개체 1 | 143 | 186 | 425 | 405 | 215 | 56 | 3 |
| | 개체 2 | 10 | 1396 | 2028 | 1566 | 876 | 242 | 27 |
| | 개체 3 | 838 | 163 | 443 | 681 | 419 | 120 | 36 |
| | 개체 4 | 348 | 556 | 1387 | 1469 | 1293 | 663 | 100 |
| | 개체 5 | 0 | 875 | 1380 | 1009 | 1414 | 452 | 20 |
| 평균 | | 268 | 635 | 1133 | 1026 | 843 | 306 | 37 |
| ± 표준편차 | | ± 348 | ± 517 | ± 690 | ± 498 | ± 525 | ± 250 | ± 37 |

실시예 13 그렐린의 식욕 증진 작용

(1) 뇌실내 투여에 의한 식욕 증진 작용

각종 농도의 래트 그렐린을 용해시킨 생리식염수를, 체중 300g 내지 325g 의 웅성 위스터 (Wistar) 계 래트 (일군이 16 내지 20 마리) 에, 아침 8 시 45 분에 뇌실내 투여하였다. 대조에는 그렐린을 함유하지 않은 생리식염수를 뇌실내 투여하였다. 투여 후에는 자유롭게 섭취시켜 투여 후 2 시간의 섭취량을 측정하였다. 도 6 에 나타난 바와 같이, 50pmol 의 뇌실내 투여에서 섭취량의 증가가 보이고, 200pmol 및 500pmol 에서는 투여량 의존적으로 섭취량의 증가가 보였으나, 2nmol 의 투여에서는 섭취량의 증가는 저하되었다. 통상적으로 래트는 야간에 섭취하기 때문에, 아침에는 배가 불러 거의 섭취하지 않지만 (도 6 에서 대조로 한 생리식염수를 참조), 그렐린의 뇌실내투여에 의해 섭취량이 증가한 것은 그렐린에 식욕 증진 작용이 있는 것을 나타내고 있다.

(2) 정맥내 투여에 의한 식욕 증진 작용

생후 9 개월, 웅성 SD (Sprague-Dawley) 계 래트 (5 마리) 및 위스터계 래트 (4 마리) 에, 래트 그렐린 50μg/kg 을 꼬리 정맥내 투여하고, 투여 후 2시간의 섭취량을 측정하였다 (저녁 16:00 ~ 19:00 에 평가). 표 20 에 나타난 바와 같이 다른 날의 같은 시각, 동일 개체에 대하여 조사한 래트 그렐린 비투여시의 섭취량에 비하여, 그렐린의 정맥내 투여에 의해, 섭취량이 명확하게 증가하였다. 즉, 그렐린의 정맥내 투여에 의해서도, 식욕 증진 작용이 있는 것이 나타났다.

표 20

| | | 식취량(g) | |
|----|------|--------|---------|
| 계통 | 개체번호 | 그렐린 투여 | 그렐린 비투여 |

| | | | |
|-----|------|-----|-----|
| S-D | 1 | 3.2 | 2.2 |
| | 2 | 3.7 | 1.0 |
| | 3 | 3.2 | 0.1 |
| | 4 | 2.7 | 1.3 |
| | 5 | 2.6 | 0.8 |
| | 평균값 | 3.1 | 1.1 |
| 위스터 | 표준편차 | 0.4 | 0.8 |
| | 6 | 2.3 | 0.2 |
| | 7 | 1.9 | 1.4 |
| | 8 | 1.6 | 0.1 |
| | 9 | 2.1 | 0.3 |
| | 평균값 | 2.0 | 0.5 |
| | 표준편차 | 0.3 | 0.6 |

<961> 실시예 14 그렐린에 의한 위기능의 항진

<962> 그렐린 투여에 의한, 위기능으로의 효과를 조사하기 위해 이하와 같은 실험을 하였다. 웅성의 SD 계 래트 (체중 200 ~ 280g, 7 ~ 8 주령) 를 실험하기 20 시간 이상 전부터 절식시켜 사용하였다. 래트는 우레탄 (1.25g/kg) 의 복강내 투여에 의해 마취하고, 가온 패드 및 가온 라이트를 사용하여 보온하였다. 기관내에 카닐레를 삽입하여, 다시 식도를 견사로 결찰 (結紮) 하고, 하기의 위산 분비 또는 위 운동 측정용의 수술을 하였다. 각성하의 실험은, 에테르 흡입에 의한 경도 마취하에 하기의 위산 분비 또는 위 운동 측정용의 수술을 실행하였다.

<963> 우레탄 마취하에서의 위산 분비의 실험은 Ohno 외의 방법 [Ohno, T., et al., Jpn. J. Pharmacol. 43, 429-439 (1987)] 에 따라 수술을 하였다. 다시 말하면, 누워 있는 자세에서 복부를 정중절개하여 위 및 십이지장을 노출시켰다. 폴리에틸렌 튜브를 전위부에서 삽관하여 급성 위루를 제작하였다. 또 하나의 폴리에틸렌 튜브를 십이지장의 절개에 의해 위내에 삽입하고, 유문부 주위를 결찰하여 고정하였다. 위내를 리저버내에서 pH 7.0 으로 조정하고, 37℃ 로 가온한 생리식염수로 관류하였다. 유속은 1.0ml/min 으로 하였다. pH 고정장치 (Hiranuma, Comitite-8) 와 100 mM 의 NaOH 액을 사용하여 관류액이 pH 7.0 으로 되도록 적정하였다. 기조 위산분비량이 안정되어 있는 것을 확인한 후, 피험액을 정맥내투여하고, 위산분비속도를 5 분 간격으로 측정하였다. 각 군 4 마리의 동물을 이용하였다.

<964> 각성하의 실험하에서는, 에테르 흡입에 의한 경도마취하에 동일한 수술을 실시한 후에, 측복부에 소절개를 추가하여 관류용 튜브를 체외로 도출시켰다. 노출된 위 및 십이지장을 복강내에 넣어 절개부를 봉합하고, 볼멘형의 래트용 고정 게이지내에 동물을 엮드린 자세로 하여 구속하고, 마취에서 깬 것을 확인하고 실험에 사용하였다. 또한 식도를 결찰하였는데, 기관 카닐레는 삽입하지 않았다.

<965> 우레탄 마취하에서의 위운동 측정 실험은, Takeuchi & Nobuhara 의 방법 [Takeuchi, K. and Nobuhara, Y., Digestive Diseases and Sciences 30, 1181-1188 (1985)] 에 따라, 미니췌어밸룬법을 이용하였다. 즉 물을 충전한 밸룬과 지지용 카테터를 전위부 절개로 위내에 삽입하였다. 위선 부분을 가로지르듯이 고정하고, 카테터의 한쪽 끝을 압력트랜스·듀서 (닛뽕고우덴가부시기가이샤 제조, LPU-0.1-350-0-II) 에 접속하였다. 위운동이 안정된 것을 확인한 후, 피험액을 60 분 간격으로 누적적으로 정맥내투여하였다. 위운동은 20cmH₂O 이상의 진폭을 갖는 수축운동의 위내압진폭과 수축반응수를 10분 간격으로 측정하였다. 각 군 4 마리의 동물을 이용하였다. 각성하의 실험에서는, 에테르 흡입에 의한 경도마취하에 동일한 수술을 실시한 후에 절개부를 봉합하고, 볼멘형의 래트용 고정 게이지내에 동물을 엮드린 자세로 하여 구속하고, 마취에서 깬 것을 확인하고 실험에 사용하였다.

<966> 래트 그렐린 및 히스타민 2 염산염을 생리식염수에 용해시켜, 꼬리정맥내에 1ml/kg 의 용량으로 투여하였다. 그렐린의 작용에 미주신경활동이 관여하는지의 여부를 조사하기 위해, 그렐린의 투여 30 분 전에 황산아트로핀을 피하투여하거나, 또는 경부 미주신경다발을 양측성으로 절단하였다. 또한 그렐린의 작용에서의 히스타민 H₂ 수용체의 관여를 조사하기 위해서는, 그렐린의 투여 30 분 전에 파모티딘 (가스타[®], 야마노우찌세이야꾸 가부시기가이샤 제조) 를 피하투여하였다. 결과는 평균값 ± 표준오차값으로 나타냈다. 통계학적 해석은 Dunnett 의 다중비교법을 이용하여 실행하였다. P 값 < 0.05 를 통계학적으로 의의가 있다고

관정하였다.

- <967> 도 7a 및 표 12 에 나타난 바와 같이, 우레탄 마취하에서 래트 그렐린을 0.8 ~ 20 μ g/kg 의 용량으로 정맥내투여하면, 용량의존적으로 위산분비가 촉진되었다.
- <968> 마취하에서는, 그렐린 투여전에는 위의 자발운동은 거의 볼 수 없다. 그 상태에서 래트 그렐린을 0.8 ~ 20 μ g/kg 의 용량으로 정맥내투여하면, 도 8a, 도 8b 및 표 21 에 나타난 바와 같이, 위운동의 진폭 및 빈도가 모두 향진되었다. 이들 반응은 래트 그렐린의 투여 후, 신속하게 볼 수 있었다. 20 μ g/kg 의 투여시에는, 위산분비는 증대하고, 20 분 이내에 최대값으로 도달한 후, 투여 후 90 분까지는 서서히 감소되었다. 래트 그렐린 20 μ g/kg 에 의한 위산분비촉진작용의 최대 반응의 크기는 도 7a, 도 7b 에 나타난 바와 같이, 히스타민 3mg/kg 을 정맥내투여했을 때에 야기되는 반응에 거의 필적하는 것이었다. 위운동의 진폭에 대한 향진 작용은 각 용량 모두 10 분 이내에 최대반응에 도달하고, 20 μ g/kg 투여시에는 50 분 후까지 서서히 감소되었다.
- <969> 또한 표 21 에 나타난 바와 같이 래트 그렐린의 20 μ g/kg 투여에서 야기되는 위산분비촉진작용은 아트로핀 또는 양측 경부 미주신경 절제술의 전처치에 따라서는 거의 완전히 억제되고, 히스타민 H₂ 수용체 길항약인 파모티딘을 1mg/kg 피하투여하는 전처치에서는 전혀 영향을 받지 않았다. 또 래트 그렐린 투여에서 야기되는 위운동 향진작용도 아트로핀 또는 양측 경부 미주신경 절제술의 전처치에 따라 완전히 억제되었다. 이것으로부터, 그렐린의 위기능 향진작용은, 히스타민계 기서에 의한 것은 아니라, 미주신경계를 활성화하는 것에 의한 것이 확인되었다.
- <970> 또한, 각성하 래트에 있어서도, 상기 우레탄 마취하와 동일하게, 래트 그렐린 (4 및 20 μ g/kg) 을 정맥내투여하면 위산분비가 촉진되었다. 또 각성하 래트에서는 마취하에 비하여 피험약 투여전부터 위의 자발운동이 발생하고 있어, 그 상태로 래트 그렐린을 0.8 ~ 20 μ g/kg 용량으로 정맥내투여하여도, 위운동은 진폭 및 빈도 모두 향진되었다. 이상의 결과로부터, 우레탄 마취하 및 각성하의 어느 것에서도, 그렐린의 정맥내투여에 의해 위산분비의 촉진 및 위운동의 향진이 일어나는 것이 확인되었다.

표 21

<971>

| 처치 | | 위산분비(μ 당량/60 분) | 위운동 | |
|---|-----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------------|
| | | | 빈도(회/60분) | 진폭(cmH ₂ O/회/60분) |
| 생리식염수 | | 17.6 \pm 1.2 | 1.3 \pm 1.0 | 1.7 \pm 1.0 |
| 래트 그렐린 | 0.8 μ g/kg 정맥내 주사 | 24.5 \pm 2.2 | 35.5 \pm 18.1 | 6.7 \pm 4.4 |
| | 4 μ g/kg 정맥내 주사 | 23.5 \pm 2.6 | 60.8 \pm 25.6 | 11.1 \pm 5.3 |
| | 20 μ g/kg 정맥내 주사 | 43.3 \pm 4.6 (*1) | 100.5 \pm 20.4 (*1) | 21.8 \pm 2.5 (*1) |
| 래트 그렐린 20 μ g/kg 정맥내 주사 | +아트로핀 1mg/kg 피하투여 | 26.1 \pm 3.9 (*2) | 0 (*3) | 0 (*3) |
| | +미주신경절제술 | 18.4 \pm 3.7 (*3) | 0 (*3) | 0 (*3) |
| | +파모티딘 1mg/kg 피하투여 | 43.0 \pm 4.2 | NT | NT |
| 표내의 기호는 다음과 같다. *1 : p < 0.01 , *2 : p < 0.05, *3 : p < 0.01 NT 미시험 | | | | |

<972> 실시예 15 그렐린 및 그렐린 유도체의 세포증식 촉진작용

- <973> 그렐린 투여에 의한 세포증식 촉진작용을 조사하기 위해 이하의 실험을 하였다. 래트 그렐린 또는 티오에테르형 래트 그렐린 (화합물 18 [Cys³(옥틸)]-hGhrelin) 을 20 μ g/kg 을 위스터계 웅성 래트 (7.5 주령) 의 꼬리정맥내에 투여하였다. 투여 17 시간 후에 ³H-티미딘 (³H-thymidine) 을 꼬리정맥내 투여하고, 그 1 시간 후에 십이지장, 공장 및 골수를 적출하였다. 이들 조직 중의 DNA 핵분으로의 ³H-티미딘의 투입량을 측정하고, 그렐린 및 그렐린 유도체의 세포 증식 촉진 작용을 조사하였다. 조직을 가늘게 자른 후에 폴리트론호모제나이저로 호모제네이트하고, 그 원심 상등액을 트리클로로아세트산으로 침전시켜, DNA 핵분을 취득하였다. DNA

획분의 방사능을 액체 신틸레이션 카운터로 측정하였다.

<974> 표 22 에 나타낸 바와 같이, 래트 그렐린 또는 티오에테르형 래트 그렐린의 정맥내투여에 의해, 이들 조직중 또는 장기중의 DNA 로의 ³H-티미딘 투여가 촉진된 점에서, 그렐린은 십이지장, 공장 및 골수에서의 세포증식 촉진 작용을 나타내는 것이 확인되었다.

<975> 그렐린 정맥내 투여 후의 세포 증식 촉진 작용의 타임 코스는, GHRH (성장호르몬 방출 호르몬) 투여에 의한 것과 동일하고, 그렐린의 세포 증식 촉진 작용은 주로 하수체에서 분비되는 GH (성장호르몬) 를 통하는 것으로 생각되었다. GH 분비조절을 생리적인 인자인 그렐린에 맡기는 것은 생체조절에 무리가 없고, GH 에서 문제되는 부작용도 적은 것으로 생각되었다.

표 22

| | 비교예 | 래트 그렐린 | 티오에테르형 그렐린 |
|---|--------------|--------------|--------------|
| 골수(조직 중) | 100.0 ±17.8% | 141.7 ±30.1% | 144.5 ±16.5% |
| 십이지장(DNA분획 중) | 100.0 ±14.2% | 136.0 ±17.8% | 114.0 ±11.7% |
| 공장(DNA분획 중) | 100.0 ±6.8% | 159.0 ±7.5% | 151.0 ±23.6% |
| 수치는 비교예 (생리식염수 투여군) 3 마리의 평균값을 기준으로 했을 때의 방사능의 삽입량의 비율(%) 로 나타냈다. | | | |

<977> 실시예 16 항그렐린 항체에 의한 그렐린의 정량

<978> 래트 그렐린의 아미노 말단측 및 카르복실 말단측의 펩티드를 항원으로 작성된 항체를 사용하여, 라디오이뮤노 어세이 (RIA) 에 의해 각종 생체조직중의 그렐린을 정량하였다.

<979> [C-Cys]-래트 그렐린[1-11] (래트 그렐린의 아미노 말단측의 1 내지 11 번째까지의 아미노산 서열을 갖는 펩티드의 카르복실 말단에 시스테인이 결합된 펩티드) 및 [C-Cys]-래트 그렐린[13-28] (래트 그렐린의 아미노 말단측의 13 내지 28 번째까지의 아미노산 서열을 갖는 펩티드의 카르복실 말단에 시스테인이 결합된 펩티드) 을 항원으로 하여, 토끼를 면역시켜 N 단측 항체 (항[C-Cys]-래트 그렐린[1-11]항체) 와 C 단측 항체 (항[C-Cys]-래트 그렐린[13-28]항체) 를 작성하였다.

<980> 도 9a 에 나타낸 바와 같이, 방사능 표식한 래트 그렐린과 N 단측 항체의 결합에 있어서, 래트 그렐린의 IC50 (절반 저해량) 은, 반응액당 3.1fmol 이었다. 이 N 단측 항체는, 화학합성한 인간 그렐린 및 래트 그렐린과 100% 교차반응성을 나타냈으나, 3 위의 세린이 n-헥사노일로 수식된 n-헥사노일·래트 그렐린 및 3 위의 세린이 n-데카노일로 수식된 n-데카노일·래트 그렐린은, 각각 0.3% 및 20% 밖에 교차반응성을 나타내지 않았다. 또, N 단측 항체는 지방산을 탈리한 그렐린과는 전혀 반응하지 않았다.

<981> 래트 그렐린 (28 아미노산), 인간 그렐린 (28 아미노산) 및 인간이나 래트 등에서 발견된 그렐린-27 (27 아미노산으로 이루어지는 그렐린) 에 대하여, N단측 항체는 동등한 친화성을 나타냈다. 따라서, N 단측 항체는 3 위 세린이 n-옥타노일로 수식된 천연형 그렐린을 특이적으로 인식하는 것이 확인되었다.

<982> 도 9b 에 나타낸 바와 같이, 방사능 표식된 래트 그렐린의 C 단측 항체에 대한 결합에 있어서, n-옥타노일로 수식된 천연형 래트 그렐린 및 n-옥타노일기가 탈리된 래트 그렐린의 IC50 은, 반응액당 44 fmol 로 동등하였다. 즉, 지방산 수식된 그렐린에도 지방산이 탈리된 그렐린에도 동등한 친화성을 나타내는 것이 확인되었다.

<983> 이상의 결과를 근거로, 생체내 각 조직에 존재하는 그렐린에 대하여, N 단측 항체에 의해 3 위 세린이 n-옥타노일로 수식된 그렐린을 정량하여, C 단측 항체에 의해 지방산 수식된 그렐린 및 지방산이 탈리된 그렐린의 양쪽을 정량할 수 있는 것을 알 수 있었다.

<984> 표 23 은 실제로 생체 각 조직의 지방산 수식된 그렐린의 함량, 및 지방산 수식된 그렐린과 지방산이 탈리된 그렐린 양쪽의 함량을 조사한 결과이다.

표 23

| 조직명 | 항체와 반응한 래트 그렐린의 양 (fmol/mg조직) | |
|-----|----------------------------------|-------|
| | C-RIA | N-RIA |

| | | |
|---------|---------------|---------------|
| 시상하부 | 1.8 ±0.3 | < 0.05 |
| 하수체 | 8.5 ±3.1 | < 0.05 |
| 갑상선 | 3.5 ±2.0 | < 0.05 |
| 하악선 | 8.8 ±1.3 | < 0.05 |
| 흉선 | 3.5 ±0.4 | < 0.05 |
| 부신 | 3.1 ±0.4 | < 0.05 |
| 심방 | 2.3 ±0.2 | 0.07 ±0.01 |
| 심실 | 2.1 ±0.1 | < 0.05 |
| 대동맥 | 2.4 ±0.7 | 0.14 ±0.03 |
| 폐 | 3.1 ±0.4 | < 0.05 |
| 간장 | 2.8 ±0.5 | < 0.05 |
| 췌장 | 2.6 ±0.6 | 0.15 ±0.05 |
| 위 | 1779.8 ±533.9 | 377.31 ±55.83 |
| 십이지장 | 106.7 ±7.3 | 20.57 ±0.69 |
| 공장 | 60.2 ±17.2 | 10.73 ±5.44 |
| 회장 | 20.5 ±5.1 | 0.16 ±0.08 |
| 맹장 | 15.1 ±2.5 | 1.70 ±5.44 |
| 결장 | 10.4 ±0.7 | < 0.05 |
| 신장 | 5.4 ±0.3 | < 0.05 |
| 정소 | 2.8 ±0.2 | < 0.05 |
| 혈장(1ml) | 219.6 ±71.8 | 4.02 ±1.91 |

<986> 표 중, C-RIA 는 C 단측 항체를 사용한 라디오이뮤노어세이법에 의한 정량 결과를 나타내고, N-RIA 는 N 단측 항체를 사용한 라디오이뮤노어세이법에 의한 정량 결과를 나타낸다.

<987> 또, 표 중의 수치는 「값 ±표준편차」를 나타낸다.

<988> **실시예 17 반합성법에 의한 래트 그렐린(1-28)의 제조**

<989> 합성 스킴

<990> rGhrelin(6-28) 과 Ghrelin(1-7) 을 각각 유전자공학적 수법과 화학합성법에 의해 조제하고, 양 Ghrelin 단편에서 rGhrelin 을 조제한 예를 나타낸다.

<991> 구체적으로는 β-갈락토시다아제 97S 와 rGhrelin(6-28) 사이에 V8 프로테아제와 KexII 프로테아제의 절단부위를 갖는 아미노산 서열 (-QFE-SRHRR-) 을 갖는 융합 단백질, β-galactosidase97S-(QFE-SRHRR)-rGhrelin(6-28) 을 대장균으로 발현시켰다. 본 융합 단백질을 V8 프로테아제 처리하고, SRHRR-rGhrelin(6-28) 을 잘라냈다. 다음에, SRHRR-rGhrelin(6-28) 의 전체 아미노기를 Boc기로 보호한 후, KexII 프로테아제 처리하고, 새로 6 위 Ser 의 아미노 말단 아미노기가 유리된 [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGhrelin(6-28) 을 얻었다. 본 보호단편과 화학합성법으로 얻어진 [N^a-Boc]-rGhrelin(1-5)-OSu 를 프래그먼트 융합하고, 얻어진 [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGhrelin 을 산 처리함으로써 rGhrelin 을 제조하였다.

<992> 본 실시예에서는 rGhrelin 의 반합성예를 나타냈으나, 인간형도 본 방법으로 합성할 수 있다.

<993> 또, 본 실시예에서는 프래그먼트 축합을 (1-5) 와 (6-28) 에서 실시하였으나, 예컨대 화학합성한 아미노 말단부 단편 (1-2), (1-3), 또는 (1-7) 과, 각각 28 위부터 3 위까지의 자유로운 길이를 갖는 Ghrelin 의 카르복실 말부 단편과의 융합 단백질을 유전자공학적으로 작성한 카르복실 말부 단편 (3-28), (4-28), 또는 (8-28) 과의 축합 등이 가능하다. 화학합성의 공정수를 경감시킬 경우, (1-2) 와 (3-28) 또는 (1-3) 과 (4-28) 에서의 축합이 유리하다. 또 축합에 의한 라세미화를 완전히 방지하는 관점에서는 7 위 Pro 를 이용한 (1-7) 과 (8-28) 의 축합이 특히 바람직하다.

<994> 발현 벡터 pG97s rGR 의 구축과 그렐린(6-28) 융합 단백질의 발현

<995> 래트 그렐린의 cDNA 유전자 서열에 의거하여, 아미노산 서열 QFE-SRHRR 을 프레프로 (prepro) 영역에 갖는 rGhrelin(6-28) 의 DNA 단편을, 모든 합성 올리고머를 사용하여 어닐링법으로 얻었다.

- <996> 이 DNA 단편을 pG97SnPPH34 (일본공개특허공보 평9-296000)에 삽입하기 위해, 먼저 pG97SnPPH34를 SalI 및 SmaI 처리에 의해, 인간 부갑상선 호르몬 전구체 유전자를 결실시켰다. 이것을 알칼리포스포타아제 처리 후, 먼저 SalI 처리, kinase 처리를 한 rGhrelin 유도체 유전자 단편과 T4 리가아제에 의해 연결시켰다. 연결한 플라스미드를 대장균 DH5 α 주에 형질전환하고, 플라스미드 pG97s rGR을 얻었다.
- <997> 얻어진 pG97s rGR을 대장균 M25 (ompT) 주에 형질전환을 하고, 얻어진 형질전환주를 200ml의 Terrific Broth 액체 배지 (1.2%, 트립토판, 2.4% 효모엑기스, 0.4% 글루코오스) 3 개에 접종하고, 37°C에서 진탕 배양하였다. 균체 농도가 OD₆₆₀=0.8로 된 시점에서 이소프로필 1-티오- β -D-갈락토피라노시드 (IPTG)를 최종 농도 2mM이 되도록 첨가하고, rGhrelin(6-28) 융합 단백질을 발현시켰다. 또한 4시간 배양 후, 원심분리하고, 균체를 회수하였다. 래트 그렐린(6-28) 융합 단백질의 구성을 이하에 나타낸다.
- <998> 래트 그렐린6-28 융합 단백질 : (β -갈락토시다아제-97S)-QFE-SRHRR-rGhrelin(6-28)
- <999> rGhrelin6-28 융합 단백질의 프로세싱과 [SRHRR]-rGhrelin(6-28)의 정제
- <1000> 얻어진 균체 20ml를 TE 버퍼에 현탁한 후, French Press로 균체 파쇄하였다. 그 후, 3000rpm, 15분의 원심분리로 봉입체를 회수하고, 10ml TE 버퍼, 탈이온수로 다시 현탁하고, 원심분리함으로써 봉입체를 세정하였다. OD₆₆₀의 값이 50.0이 되도록 봉입체를 탈이온수로 희석하고, Tris-HCl (pH8.2)를 최종 농도 50mM이 되도록 첨가하고, 요소 (최종 농도 3.5M)에 의해 봉입체를 용해시켰다. 30°C로 보온한 본 용액에, rV8 프로테아제 유도체 V8D5 (이하 V8D5라 약기함) (일본공개특허공보 평9-47291)를 최종 농도 10 μ g/ml로 되도록 첨가하고, 30°C에서 20분 효소처리를 하였다. 3% 아세트산 (AcOH)을 첨가하여 반응을 정지시켰다.
- <1001> 잘라낸 [SRHRR]-rGhrelin(6-28)을 함유하는 V8D5 효소반응 정지액에 1.5배 양의 탈이온수를 첨가하고, 5N NaOH를 사용하여 pH 5.0으로 조정하고, β 갈락토시다아제 유도체 단편을 침전, 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 제거하였다.
- <1002> [SRHRR]-rGhrelin(6-28)을 함유하는 상등액을, 0.1% TFA로 평형화한 TSK-ODS 80Ts 컬럼 (입경 20 μ m, 50mm I.D. x 100mm, TOSOH사 제조)에 첨가하였다. 버퍼 A [0.8ml/min, 1% 아세토니트릴, 0.1% TFA] 100%에서 버퍼-B [50% 아세토니트릴, 0.095% TFA] 100%의 농도 구배를 5컬럼 용량으로 완료하는 프로그램으로 용출을 실행하였다. 목적 펩티드 [SRHRR]-rGhrelin(6-28)을 함유하는획분을 분리하였다 (약 50mg).
- <1003> [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGhrelin(6-28)의 조제
- <1004> 약 50mg (15 μ mol)의 [SRHRR]-rGhrelin(6-28)을 함유하는 50% 아세토니트릴 수용액에, 이탄산디-t-부틸을 6당량물 (19.2mg, 6 \times 15 μ mol) 첨가하고, 트리에틸아민으로 pH 9로 조정하고, 실온에서 15분 방치하였다. 반응액에 최종 농도 0.5%로 되도록 아세트산을 첨가하고, 아세토니트릴을 증류제거한 후, 0.1% TFA를 함유하는 10% 아세토니트릴로 평형화한 EMPORE-옥틸(C8) HD 4mm/ml 카트리지에 첨가하고, 평형화액으로 세정 후, 0.095% TFA를 함유하는 90% 아세토니트릴로 [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGhrelin(6-28)을 용출시켰다. 아세토니트릴을 증류제거하고, 약 30mg의 목적물을 함유하는 용액을 6ml 얻었다.
- <1005> 질량분석 결과, Boc화하기 전 (측정 분자량=3396, 이론상 분자량=3398)에 비하여 Boc화한 후에는 분자량이 500 많아진 것 (측정 분자량 3395)과, 600 많아진 것 (측정 분자량=3995)의 2종류가 주로 보였다.
- <1006> Kex2 프로테아제에 의한 [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGhrelin(6-28)의 절단과 정제
- <1007> 얻어진 [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGhrelin(6-28)수용액 (30mg, 6ml)에 염화칼슘 용액, Tris-HCl pH 8.2를 각각 최종 농도 0.3mM, 20mM이 되도록 첨가하였다. Kex2 프로테아제 (일본공개특허공보 평10-229884)용액을 1 \times 10⁵ unit/ml로 되도록 첨가한 후, 30°C, 60분간 프로테아제 처리하였다.
- <1008> HPLC 상, [Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGhrelin(6-28)의 피크가 소실되어, [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGhrelin(6-28)의 피크가 더욱 소수성 측에 나타나고, Boc-SRHRR에 대응하는 친수성의 피크가 관찰되었다.
- <1009> 원료소실을 확인한 후, 반응액을 아세트산수로 pH 3.5로 조정하고, 1% 아세트산을 함유하는 1.0% 아세토니트릴로 평형화한 역상 크로마토그래피 ODS-80Ts (1.66cc 컬럼용적, 입경 20 μ m, TOSOH사 제조)에 첨가하였다. 평형화액으로 5컬럼 용적으로 세정한 후, 1% 아세트산을 함유하는 1.0% 아세토니트릴에서 90.0% 아세토니트릴

로의 농도 구배를 5 컬럼 용적으로 완료하는 프로그램을 실행하고, [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGhrelin(6-28) 을 용출시켰다. 주획분을 동결건조하고, 목적으로 하는 보호 펩티드를 6.2mg 얻었다.

<1010> 프래그먼트 추출과 탈보호

<1011> Ghrelin(1-5) (190mg, 0.0301mmol, 화합물 31) 의 트리플루오로에탄올 (TFE) 용액 (6.00ml) 에 트리에틸아민 (51.0 μ l, 0.366mmol), 이탄산디-t-부틸 (78.0mg, 0.0356mmol) 의 TFE 용액 (4.00ml) 를 첨가하고, 실온에서 13 시간 교반하였다. 용매를 감압하 증류제거하고, 얻어진 잔류물에 에테르 (20.0ml) 를 첨가하고, [N^a-Boc]-rGhrelin(1-5) 을 180.5mg 얻었다.

<1012> 다음에 [N^a-Boc]-rGhrelin(1-5) (22.0mg, 0.0301mmol) 의 DMF (1.00ml) 용액에 HOSu (5.20mg, 0.0452mmol) 을 첨가한 후, -30℃ 옥중 DIPCI (7.30 μ l, 0.0466mmol) 을 첨가하였다. -30℃ 옥에서 1 시간, 실온에서 18 시간 교반한 후, 용매를 감압하 증류제거하고, 얻어진 잔류물을 에테르로 분말로 하고, [N^a-Boc]-rGhrelin(1-5) 의 삭신이미드에스테르체 [N^a-Boc]-rGhrelin(1-5)-OSu 를 14.1mg 얻었다.

<1013> 다음에 리콘비난트법으로 조제한 [Lys(Boc)^{11,16,19,20,24}]-rGhrelin(6-28) (6.10mg, 2.18 μ mol) 의 DMF (0.6ml) 용액에, [N^a-Boc]-rGhrelin(1-5)-OSu (3.3mg, 3.96 μ mol), 트리에틸아민 (2.5 μ l, 17.9 μ mol) 을 첨가하여 실온에서 24 시간 교반하였다. 용매를 감압하 증류제거하고, 얻어진 잔류물에 빙냉하, 직접 TFA (2.00ml) 를 첨가하고, 실온에서 1.5시간 교반하였다. TFA 를 감압하 증류제거한 후, 잔류물에 에테르를 첨가하여 rGhrelin(1-28) 을 함유하는 조펩티드 6.2mg 을 얻었다.

<1014> 이것을 5% 아세트산 (AcOH) 2ml 에 녹여, YMC-Pack-ODS-A (5 μ m, 20mm \times 250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세토니트릴 0% 내지 95% 까지의 60 분간 직선 그레디언트 (유속 : 10ml/min) 로 용출시켰다. 목적 획분을 분리 후 동결건조하고, 다시 YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 10mm \times 250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세토니트릴 7.5% 내지 21.3% 까지의 30 분간 직선 그레디언트 (유속 : 4.7ml/min) 로 용출시켰다.

<1015> 목적획분을 분리 후, 동결건조하고, 다시 YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 10mm \times 250mm) 에 첨가하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 중, 아세토니트릴 7.5% 내지 21.3% 까지의 30 분간 직선 그레디언트 (유속 : 4.7ml/min) 로 용출시켰다.

<1016> 목적획분을 분리 후, 동결건조하고, rGhrelin(1-28) 을 2.1mg 얻었다. rGhrelin(1-28) 을 2.1mg 얻었다. 이것은 분석용 HPLC 에서 표준품의 rGhrelin(1-28) 과 유지시간이 일치하며, 세포내 칼슘 상승 활성은 EC₅₀=1.5nM 으로 천연품과 동등하였다.

ESI-MS 3315.0 (이론치 3314.8), 아미노산조성비 : Ser; 3.74 (4), Glx;

5.69 (6), Gly ; 1.18 (1), Ala; 2.05 (2), Leu; 2. Phe; 0.98 (1), Lys;

4.98 (5), His; 1.03(1), Arg; 1.96 (2), Pro; 4.01 (4)

<1017> 화합물 87 [^Dleu⁵]-rGhrelin(1-28)

<1019> 또 [N^a-Boc]-rGhrelin(1-5) 의 삭신이미드에스테르화, 또는 프래그먼트 추출시의 부반응물로서, [^Dleu⁵]-rGhrelin(1-28) 이 0.8mg 얻어졌다. 이것의 세포내 칼슘 상승 활성은 EC₅₀=220nM 이었다.

ESI-MS 3315.0 (이론치 3314.8), 아미노산조성비 : Ser; 3.80 (4), Glx;

5.92 (6), Gly ; 1.23 (1), Ala; 2.07 (2), Leu; 2. Phe; 0.97 (1), Lys;

4.92 (5), His; 1.02(1), Arg; 1.97 (2), Pro; 4.11 (4)

<1020> D₂O/DCI 가수분해 후 류신의 GC-MS 분석: L-Leu; 1.17(1), D-Leu;0.83 (1)

<1021> D₂O/DCI 가수분해 후의 류신의 GC-MS 분석 : L-Leu ; 1.17(1), D-Leu;0.83(1)

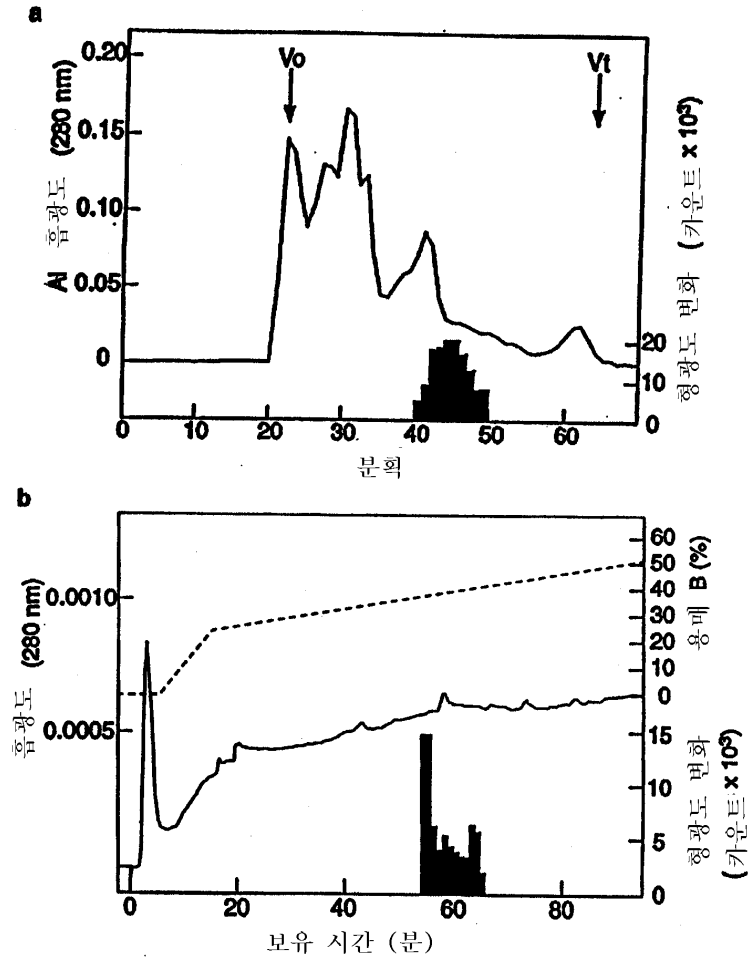
산업상 이용 가능성

<1022>

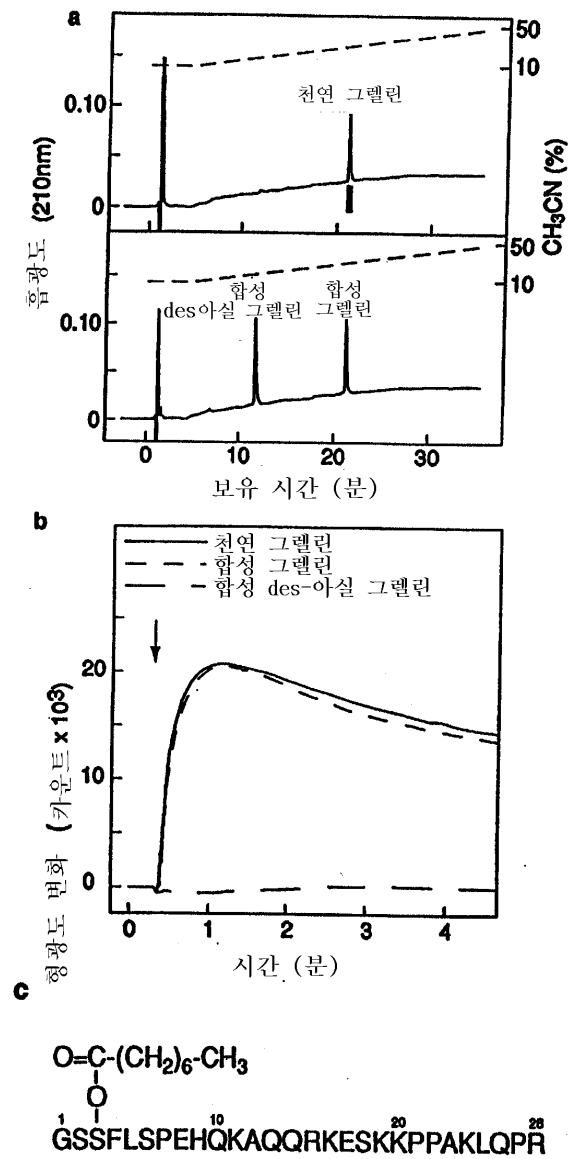
본 발명의 신규 펩티드계 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은, 사람 또는 동물에 투여함으로써 GH 분비를 유도하여, 실질적인 부작용을 수반하지 않고, 소아의 성장촉진 및 성인의 GH 결핍에 의해 대사기능의 결손을 개선하는 의약으로서, 그리고 이 항체는 GH 결핍에 의해 질병 진단에, 나아가서는 학술분야의 연구 도구로서 우수한 작용 효과를 나타낸다.

도면

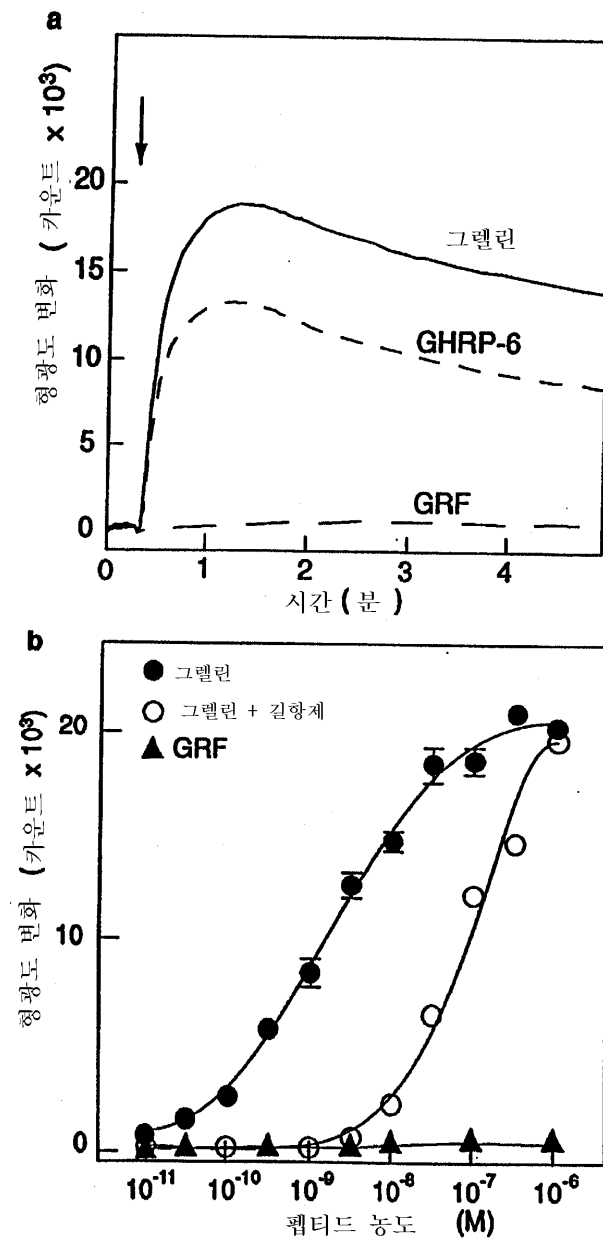
도면1



도면2



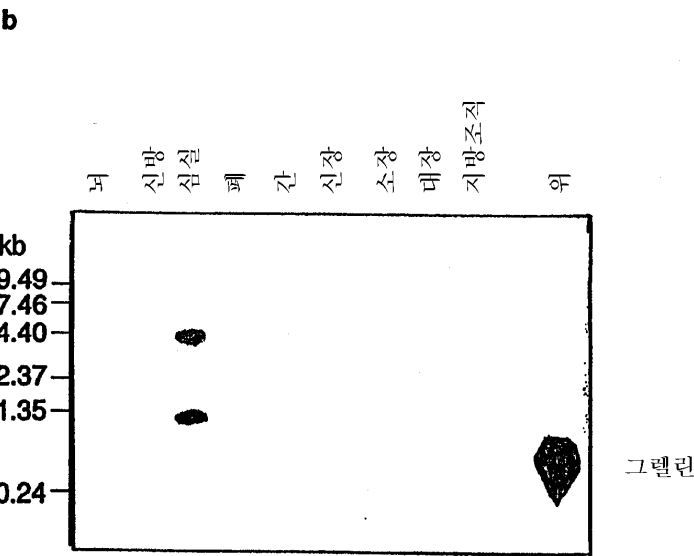
도면3



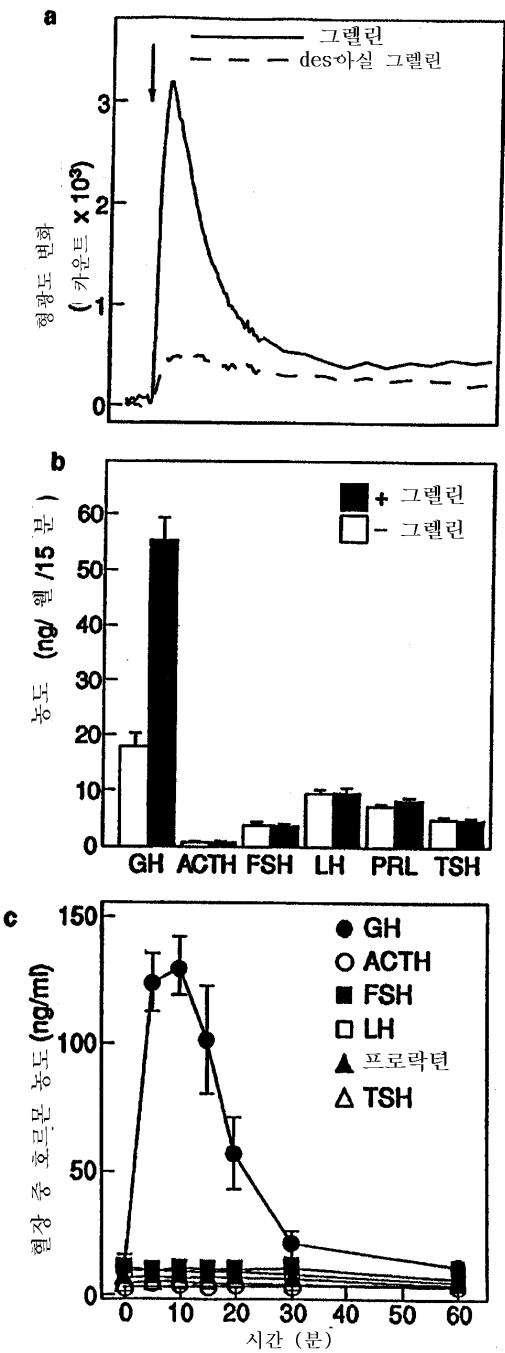
도면4

a

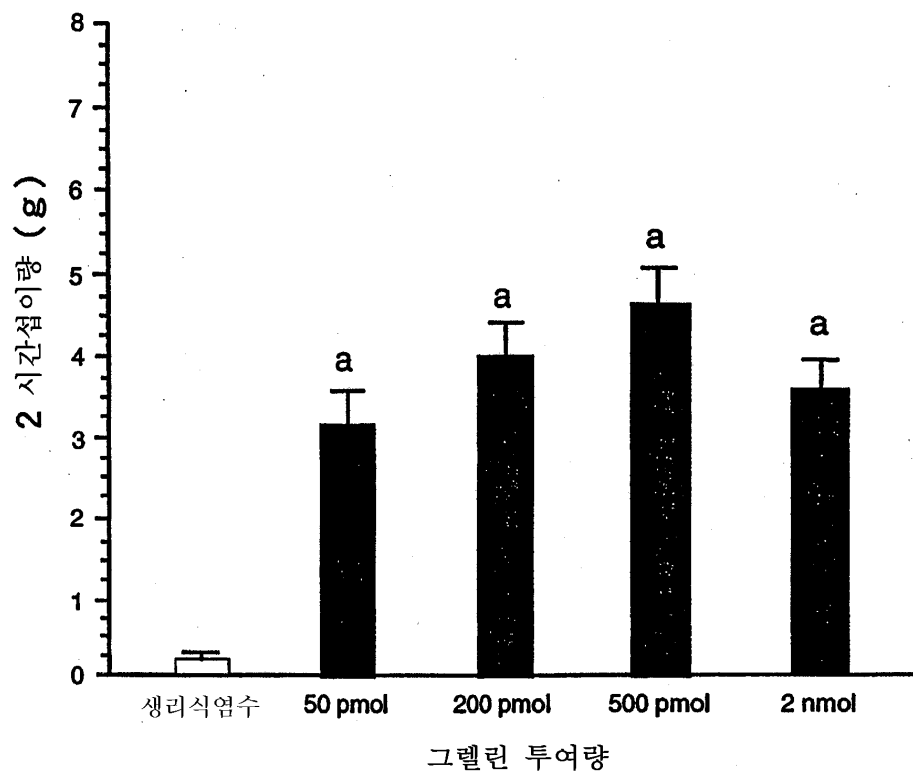
| | | | |
|----|----|---------------------------------|-----|
| 인간 | 1 | MPSPGTVCSLLLLGMLWDLAMAGSSFLSP | 30 |
| 랫 | 1 | MVSSATICSLLLSMLWMDMAMAGSSFLSP | 30 |
| 인간 | 31 | EHQVQORKESSKPPAKLOPRALAGWLRPE | 60 |
| 랫 | 31 | EHQKAQORKESSKPPAKLOPRALAGWLRPE | 60 |
| 인간 | 61 | DGGQAEAGAEDELEVRFNAPFDVGIKLSGVQ | 90 |
| 랫 | 61 | DRGQAEAEAELEIRFNAPFDVGIKLSGAQ | 90 |
| 인간 | 91 | YQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK | 117 |
| 랫 | 91 | YQHGRALGKFLQDILWEEVKEAPANK | 117 |



도면5

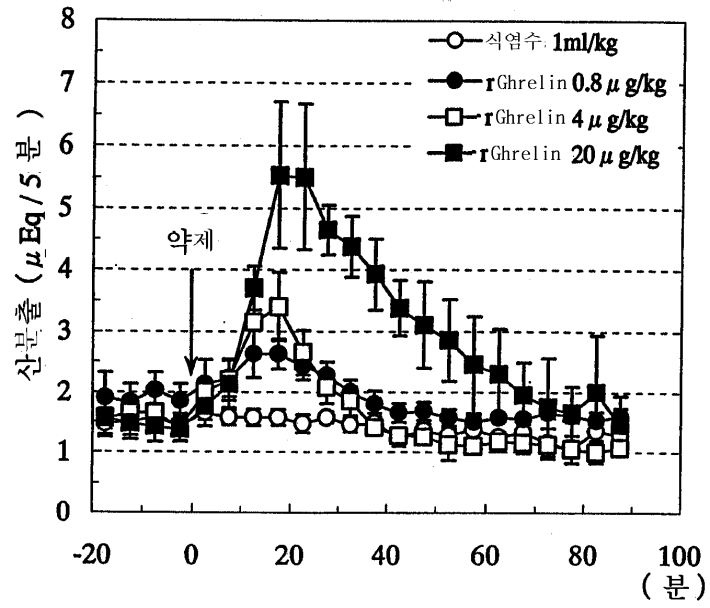


도면6

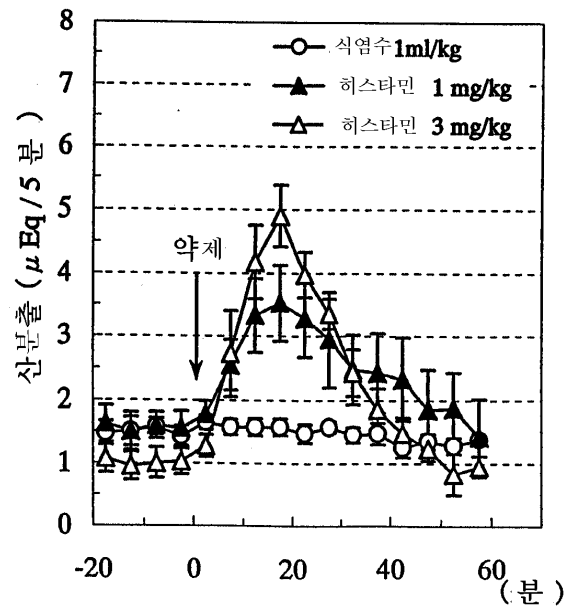


도면7

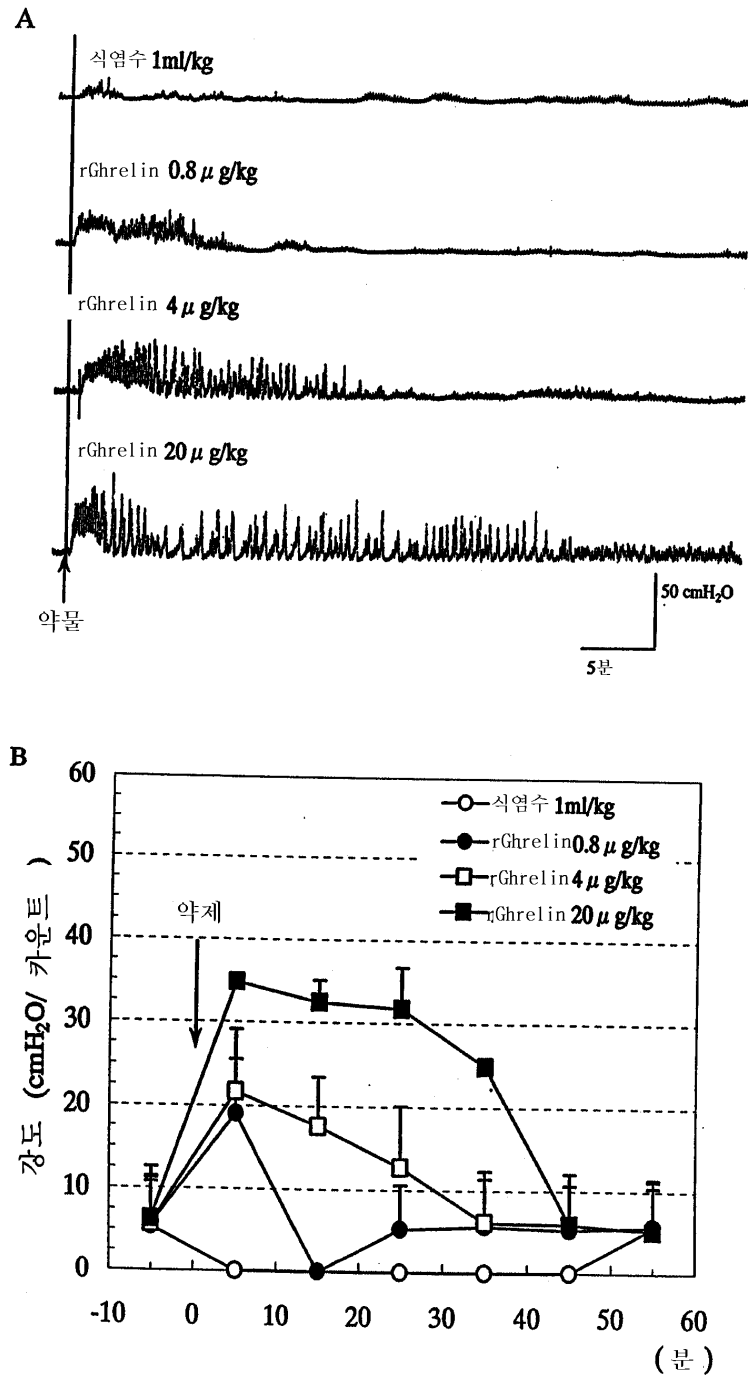
A



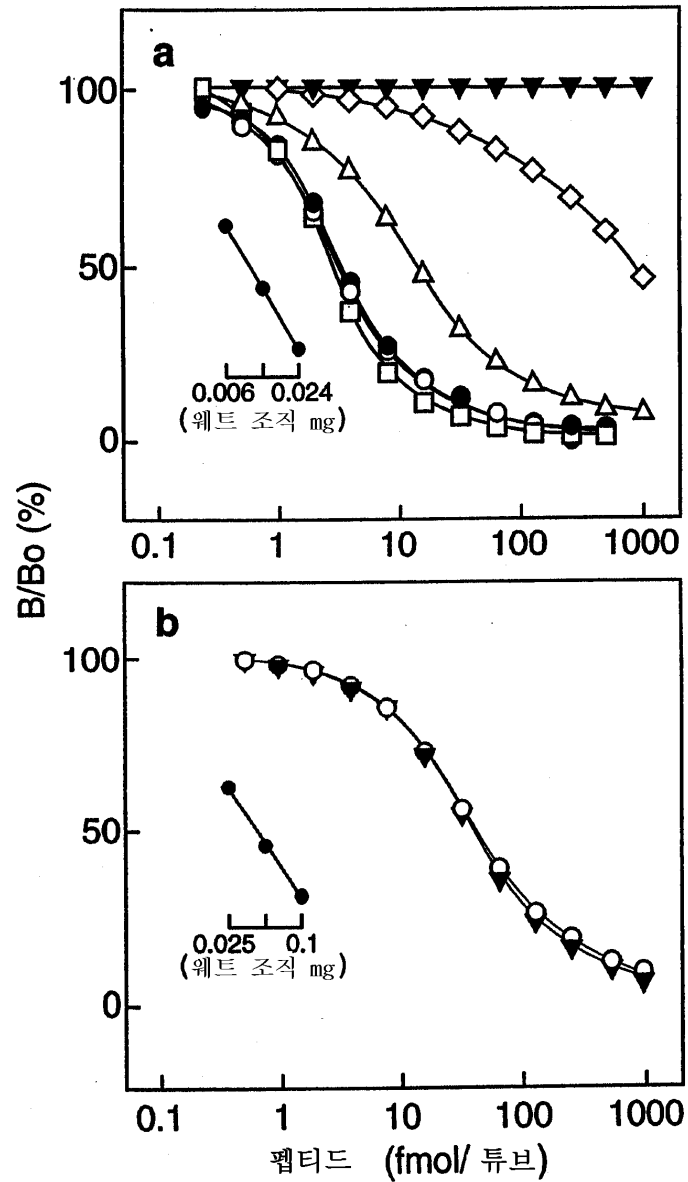
B



도면8



도면9



서열 목록

- <110> KANGAWA, Kenji
- <120> NOVEL PEPTIDES
- <150> JP 11-210002
- <151> 1999-07-23
- <150> JP 11-338841
- <151> 1999-11-29
- <150> JP 2000-126623
- <151> 2000-04-26
- <160> 39
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Amino acid sequence for a core region of endogeneous peptides of

growth hormone secretagogue

<400> 1
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro
 1 5

<210> 2
 <211>
 > 28
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <220>

<221> PEPTIDE
 <222> (1)..(28)
 <223> Amino acid sequence for rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 2
 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys
 1 5 10 15

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

<210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> PEPTIDE
 <222> (1)..(28)
 <223> Amino acid sequence for human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 3
 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> 4
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <220>

<221> PEPTIDE
 <222> (1)..(117)
 <223> Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 4
 Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Met Leu
 1 5 10 15

Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 20 25 30

Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
 35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln
50 55 60

Ala Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe
65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg
85 90 95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu
100 105 110

Ala Pro Ala Asn Lys
115

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(117)

<223> Amino acid sequence for prepro-form of human endogenous peptides
of growth hormone secretagogue

<400> 5

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Gly Met Leu
1 5 10 15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
20 25 30

Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln
50 55 60

Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe
65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln
85 90 95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu
100 105 110

Ala Pro Ala Asp Lys
115

<210> 6

<211> 501

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (31)..(381)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rat endogenous
peptides of growth hormone secretagogue

| | | |
|--|--|--|
| <400> | 6 | |
| tccagatcat ctgtctcac caccaaggcc atg gtg tct tca gcg act atc tgc | 54 | |
| | Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys | |
| | 1 5 | |
| agt ttg cta ctc ctc agc atg ctc tgg atg gac atg gcc atg gca ggt | 102 | |
| Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu Trp Met Asp Met | | |
| Ala Met Ala Gly | | |
| | 10 15 20 | |
| tcc agc ttc ttg agc cca gag cac cag aaa gcc cag cag aga aag gaa | 150 | |
| Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu | | |
| | 25 30 35 40 | |
| tcc aag aag cca cca gct aaa ctg cag cca cga gct ctg gaa ggc tgg | 198 | |
| Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp | | |
| | 45 50 55 | |
| ctc cac cca gag gac aga gga caa gca gaa gag gca gag gag gag ctg | 246 | |
| Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu | | |
| | 60 65 70 | |
| gaa atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag ctg tca gga | 294 | |
| Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly | | |
| | 75 80 85 | |
| gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt cag gat | 342 | |
| Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp | | |
| | 90 95 100 | |
| atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag taaccactg | 390 | |
| Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys | | |
| | 105 110 115 | |
| acaggactgg tcctgtact ttcttcctaa gcaagaactc acatccagct tctgcctcct | 450 | |
| ctgcaactcc cagcactctc ctgctgactt acaataaat gttcaagctg t | 501 | |
| <210> | 7 | |
| <211> | 511 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Homo sapiens | |
| <220> | | |
| <221> | CDS | |
| <222> | (34)..(384) | |
| <223> | Base sequence of cDNA coding prepro-form of human endogenous peptides of growth hormone secretagogue | |
| <400> | 7 | |
| gcaggccac ctgtctgcaa ccagctgag gcc atg ccc tcc cca ggg | 48 | |
| | Met Pro Ser Pro Gly | |
| | 1 5 | |
| acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg gcc | 96 | |
| Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Gly Met Leu | | |
| Trp Leu Asp Leu Ala | | |
| | 10 15 20 | |
| atg gca ggc tcc agc ttc ctg agc cct gaa cac cag aga gtc cag cag | 144 | |
| Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln | | |
| | 25 30 35 | |
| aga aag gag tcg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct cta | 192 | |
| Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu | | |
| | 40 45 50 | |
| gca ggc tgg ctc cgc ccg gaa gat gga ggt caa gca gaa ggg gca gag | 240 | |

Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala Glu
55 60 65
gat gaa ctg gaa gtc cgg ttc aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc aag 288
Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys
70 75 80 85
ctg tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag ttt 336

Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys Phe
90 95 100
ctt cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac aag 384
Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp Lys
105 110 115
tgatcg ccacaagcc ttactcacct ctctctaagt ttagaagcgc tcacttggt 440
tttcgcttgc ttctgcagca actccacga ctgttgtaca agctcaggag gcgaataaat 500

gttcaaactg t 511
<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of
growth hormone secretagogue
<400> 8
Gly Ser Ser Phe
1
<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of
growth hormone secretagogue
<400> 9
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln
1 5 10
<210> 10
<211> 27
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(27)
<223> Amino acid sequence for rat endogenous peptides (27 amino acids)
of growth hormone secretagogue
<400> 10
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25
<210> 11
<211> 27
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(27)

<223> Amino acid sequence for human endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 11

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

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(116)

<223> Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 12

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Met Leu
1 5 10 15

Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
20 25 30

Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln
35 40 45

Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala
50 55 60

Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp
65 70 75 80

Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala
85 90 95

Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala
100 105 110

Pro Ala Asn Lys
115

<210> 13

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(116)

<223> Amino acid sequence for prepro-form of human endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 13
Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
1 5 10 15
Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
20 25 30
Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln
35 40 45
Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala
50 55 60
Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp
65 70 75 80
Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala
85 90 95
Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala
100 105 110
Pro Ala Asp Lys
115
<210> 14
<211> 498
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<220>
<221> CDS
<222> (31)..(378)
<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rat endogenous
peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue
<400> 14
tccagatcat ctgtctcac caccaaggcc atg gtg tct tca gcg act atc tgc 54
Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys
1 5
agt ttg cta ctc ctc agc atg ctc tgg atg gac atg gcc atg gca ggt 102
Ser Leu Leu Leu Ser Met
Leu Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly
10 15 20
tcc agc ttc ttg agc cca gag cac cag aaa gcc cag aga aag gaa tcc 150
Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser
25 30 35 40
aag aag cca cca gct aaa ctg cag cca cga gct ctg gaa ggc tgg ctc 198
Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu
45 50
55
cac cca gag gac aga gga caa gca gaa gag gca gag gag gag ctg gaa 246
His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu
60 65 70
atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag ctg tca gga gct 294
Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala
75 80 85
cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt
cag gat atc 342
Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile

90 95 100
ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag ta accactgaca 390
Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys
105 110 115
ggactgggcc ctgtactttc ctccaaagca agaactcaca tccagcttct gcctcctctg 450
caactcccag cactctcctg ctgacttaca aataaatgtt caagctgt
498
<210> 15
<211> 508
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (34)..(381)
<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of human endogenous
peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue
<400> 15
gcaggccac ctgtctgcaa cccagctgag gcc atg ccc tcc cca ggg 48
Met Pro Ser Pro Gly
1 5
acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg gcc 96
Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu
Leu Gly Met Leu Trp Leu Asp Leu Ala
10 15 20
atg gca ggc tcc agc ttc ctg agc cct gaa cac cag aga gtc cag aga 144
Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg
25 30 35
aag gag tcg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct cta gca 192
Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Ala
40 45 50
ggc tgg ctc cgc ccg gaa gat gga ggt caa gca gaa ggg gca gag gat 240
Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala Glu Asp
55 60 65
gaa ctg gaa gtc cgg ttc aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc aag ctg 288
Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu
70 75 80 85
tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag ttt ctt
336
Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys Phe Leu
90 95 100
cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac aag 381
Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp Lys
105 110 115
tgatcgccc acaagcctta ctacactctc tctaagtitta gaagcgctca tctggctttt 440
cgcttgcttc tgcagcaact cccagactg ttgtacaagc tcaggaggcg aataaatgtt
500
caaactgt 508
<210> 16
<211> 28
<212> PRT
<213> Sus scrofa (pig)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(28)

<223> Amino acid sequence for porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 16

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

Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg

20 25

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> Sus scrofa (pig)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(27)

<223> Amino acid sequence for porcine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 17

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

Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg

20 25

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Sus scrofa (pig)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(118)

<223> Amino acid sequence for prepro-form of porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 18

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu
1 5 10 15

Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu
20 25 30

His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys
35 40 45

Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly
50 55 60

Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro
65 70 75 80

Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly
85 90 95

Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr
100 105 110

Glu Ala Pro Ala Asp Lys

115
 <210> 19
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa (pig)
 <220>

 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(117)
 <223> Amino acid sequence for prepro-form of porcine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue
 <400> 19
 Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu
 1 5 10 15

 Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu
 20 25 30

 His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu
 35 40 45

 Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly Glu
 50 55 60

 Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Cys
 65 70 75 80

 Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly Gln
 85 90 95

 Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr Glu
 100 105 110

 Ala Pro Ala Asp Lys
 115
 <210> 20
 <211> 494
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa (pig)
 <220>

 <221> CDS
 <222> (9)..(362)
 <223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue
 <400> 20
 ctgaggcc atg ccc tcc acg ggg acc att tgc agc ctg ctg ctc ctc agc 50
 Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser
 1 5 10
 gtg ctc ctc atg gca gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttc ttg agc 98
 Val Leu Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly
 Ser Ser Phe Leu Ser
 15 20 25 30
 ccc gaa cac cag aaa gtg cag cag aga aag gag tcc aag aag cca gca 146
 Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala
 35 40 45
 gcc aaa ctg aag ccc cgg gcc ctg gaa ggc tgg ctc ggc cca gaa gac 194
 Ala Lys Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp

| | | | |
|---|---|-----|-----|
| 50 | 55 | 60 | |
| agt ggt gag gtg gaa ggc acg gag gac aag ctg gaa atc cgg ttc aac | | | 242 |
| Ser Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn | | | |
| 65 | 70 | 75 | |
| gcc ccc tgt gat gtt ggg atc aag ttg tca ggg gct cag tcc gac cag | | | 290 |
| Ala Pro Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln | | | |
| 80 | 85 | 90 | |
| cac ggc cag ccc ctg ggg aaa ttt ctc cag gac atc ctc tgg gaa gag | | | 338 |
| His Gly Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu | | | |
| 95 | 100 | 105 | 110 |
| gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtc cctgagacca gccacctctg | | | 390 |
| Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys | | | |
| 115 | | | |
| ttctcccagc ctctaaggg ctcacctggc ttccaggacg cttccactat cacaccagc | | | 450 |
| tctgagggat gctagcctgg gaggtgaata aacattcaga ctgg | | | 494 |
| <210> | 21 | | |
| <211> | 491 | | |
| <212> | DNA | | |
| <213> | Sus scrofa (pig) | | |
| <220> | | | |
| <221> | CDS | | |
| <222> | (9)..(359) | | |
| <223> | Base sequence of cDNA coding prepro-form of porcine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue | | |
| <400> | 21 | | |
| ctgaggcc atg ccc tcc acg ggg acc att tgc agc ctg ctg ctc ctc agc | | | 50 |
| Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser | | | |
| 1 | 5 | 10 | |
| gtg ctc ctc atg gca gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttc ttg agc | | | 98 |
| Val Leu Leu Met Ala Asp | | | |
| Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser | | | |
| 15 | 20 | 25 | 30 |
| ccc gaa cac cag aaa gtg cag aga aag gag tcc aag aag cca gca gcc | | | 146 |
| Pro Glu His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| aaa ctg aag ccc cgg gcc ctg gaa ggc tgg ctc ggc cca gaa gac agt | | | 194 |
| Lys Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser | | | |
| 50 | 55 | | |
| 60 | | | |
| ggt gag gtg gaa ggc acg gag gac aag ctg gaa atc cgg ttc aac gcc | | | 242 |
| Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala | | | |
| 65 | 70 | 75 | |
| ccc tgt gat gtt ggg atc aag ttg tca ggg gct cag tcc gac cag cac | | | 290 |
| Pro Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His | | | |
| 80 | 85 | 90 | |
| ggc cag ccc ctg ggg aaa ttt ctc cag gac atc ctc | | | |
| tgg gaa gag gtc | 338 | | |
| Gly Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val | | | |
| 95 | 100 | 105 | 110 |
| act gag gcc ccg gcc gac aag t gatgttcct gagaccagcc acctctgttc | | | 390 |
| Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys | | | |
| 115 | | | |
| tcccagcctc ctaagggtc acctggcttc caggacgctt ccaactatcac acccagctct | | | 450 |

gagggatgct agcctgggag gtgaataaac attcagactg g

491

<210> 22
<211> 27
<212> PRT
<213> Bos taurus
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(27)
<223> Amino acid sequence for bovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 22
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu Leu Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

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

<210> 23
<211> 89
<212> PRT
<213> Bos taurus
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(89)
<223> Partial amino acid sequence for a prepro-form of bovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 23
Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu
1 5 10 15

Leu Gln Arg Lys Glu Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
20 25 30

Thr Leu Glu Gly Gln Phe Asp Pro Glu Val Gly Ser Gln Ala Glu Gly
35 40 45

Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asn Ile Gly
50 55 60

Ile Lys Leu Ala Gly Ala Gln Ser Leu Gln His Gly Gln Thr Leu Gly
65 70 75 80

Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu
85

<210> 24
<211> 267
<212> DNA
<213> Bos taurus
<220>

<221> CDS
<222> (1)..(267)
<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of bovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 24
gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttt ctg agc ccc gaa cat cag gaa 48
Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu
1 5 10 15
ctg cag aga aag gaa gct aag aag cca tca ggc aga ctg aag ccc cgg 96
Leu Gln Arg Lys Glu Ala Lys
Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
20 25 30
acc ctg gaa ggc cag ttt gac ccg gag gtg gga agt cag gcg gaa ggt 144
Thr Leu Glu Gly Gln Phe Asp Pro Glu Val Gly Ser Gln Ala Glu Gly
35 40 45
gca gag gac gag ctg gaa atc cgg ttc aac gcc ccc ttt aac att ggg 192
Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asn Ile Gly
50 55 60

atc aag cta gca ggg gct cag tcc ctc cag cat ggc cag acg ttg ggg 240
Ile Lys Leu Ala Gly Ala Gln Ser Leu Gln His Gly Gln Thr Leu Gly
65 70 75 80
aag ttt ctt cag gac atc ctc tgg gaa 267
Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu
85

<210> 25
<211> 24
<212> PRT
<213> Gallus
domesticus
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(24)
<223> Amino acid sequence for chicken endogenous peptides of growth
hormone secretagogue
<400> 25
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys
1 5 10 15

Gly Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg
20
<210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> Anguilla japonica
<220>

<221> MOD_RES
<222> (21)
<223> AMIDATION, Amino acid sequence for eel endogenous peptides of
growth hormone secretagogue
<400> 26
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys
1 5 10 15

Lys Pro Pro Arg Val
20
<210> 27
<211> 28
<212> PRT

<213> Rana cafesbeiana
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(28)
<223> Amino acid sequence for frog endogenous peptides of growth hormone secretagogue
<400> 27

Gly Leu Ser Phe Leu Ser Pro Ala Glu Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg
1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met Arg
20 25

<210> 28
<211> 27
<212> PRT
<213> Xenopus laevis
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(27)
<223> Amino acid sequence for frog (Xenopus laevis) endogenous peptides of growth hormone secretagogue
<400> 28

Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg
1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met
20 25

<210> 29
<211> 23
<212> PRT
<213> Oncorhynchus mykiss
<220>

<221> MOD_RES
<222> (23)
<223> AMIDATION, Amino acid sequence for rainbow trout endogenous peptides (23 amino acids) of growth hormone secretagogue
<400> 29

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

Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val
20

<210> 30
<211> 20
<212> PRT
<213> Oncorhynchus mykiss
<220>

<221> MOD_RES
<222> (20)
<223> AMIDATION, Amino acid sequence for rainbow trout endogenous peptides (20 amino acids) of growth hormone secretagogue
<400> 30

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly Lys

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Pro Pro Arg Val
20

<210> 31
<211> 28
<212> PRT
<213> Canis familiaris
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(28)
<223> Amino acid sequence for dog endogenous peptides of growth hormone secretagogue
<400> 31
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

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

<210> 32
<211> 108
<212> PRT
<213> Anguilla japonica
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(108)
<223> Amino acid sequence for prepro-form of eel endogenous peptides of growth hormone secretagogue
<400> 32
Met Lys Arg Thr Ala Tyr Ile Ile Leu Leu Val Cys Val Leu Ala Leu
1 5 10 15

Trp Met Asp Ser Val Gln Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln
20 25 30

Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp
35 40 45

Ser Asp Gly Ile Leu Asp Leu Phe Met Arg Pro Pro Leu Gln Asp Glu
50 55 60

Asp Ile Arg His Ile Thr Phe Asn Thr Pro Phe Glu Ile Gly Ile Thr
65 70 75 80

Met Thr Glu Glu Leu Phe Gln Gln Tyr Gly Glu Val Met Gln Lys Ile
85 90 95

Met Gln Asp Leu Leu Met Asp Thr Pro Ala Lys Glu
100 105

<210> 33
<211> 114
<212> PRT
<213> Xenopus laevis
<220>

<221> PEPTIDE
 <222> (1)..(114)
 <223> Amino acid sequence frog (*Xenopus laevis*) endogenous peptides of growth hormone secretagogue
 <400> 33

Met Asn Phe Gly Lys Ala Ala Ile Phe Gly Val Val Leu Phe Cys Leu
 1 5 10 15

Leu Trp Thr Glu Gly Ala Gln Ala Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala
 20 25 30

Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His
 35 40 45

Gly Asn Met Asn Arg Arg Gly Val Glu Asp Asp Leu Ala Gly Glu Glu
 50 55 60

Ile Gly Val Thr Phe Pro Leu Asp Met Lys Met Thr Gln Glu Gln Phe
 65 70 75 80

Gln Lys Gln Arg Ala Ala Val Gln Asp Phe Leu Tyr Ser Ser Leu Leu
 85 90 95

Ser Leu Gly Ser Val Gln Asp Thr Glu Asp Lys Asn Glu Asn Pro Gln
 100 105 110

Ser Gln

<210> 34
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> *Oncorhynchus mykiss*
 <220>

<221> PEPTIDE
 <222> (1)..(82)
 <223> Amino acid sequence for prepro-form of rainbow trout endogenous peptides (23 amino acids) of growth hormone secretagogue
 <400> 34

Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala Lys Ser Val Ser
 1 5 10 15

Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Val Arg Gln
 20 25 30

Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser Phe
 35 40 45

Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn Thr
 50 55 60

Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu Phe
 65 70 75 80

Gln Glu

<210> 35
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> *Oncorhynchus mykiss*

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(99)

<223> Amino acid sequence for prepro-form of rainbow trout endogenous peptides (20 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 35

Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala Lys Ser Val Ser
1 5 10 15

Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly
20 25 30

Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser Phe Ala Glu Leu
35 40 45

Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn Thr Ile Lys Ala
50 55 60

Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu Phe Gln Glu Tyr
65 70 75 80

Gly Ala Val Leu Gln Lys Ile Leu Gln Asp Val Leu Gly Asp Thr Ala
85 90 95

Thr Ala Glu

<210> 36

<211> 503

<212> DNA

<213> *Anguilla japonica*

<220>

<221> CDS

<222> (66)..(389)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of eel endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 36

tccaagaggc actgggtttc ctcttaaagt gcaaaactcc actgtgagct tcagacatga 60

ggcag atg aaa cgc acc gca tac atc atc ctg ctg gtc tgc gtc ctg 107

Met Lys Arg Thr Ala Tyr Ile Ile Leu Leu Val Cys Val Leu

1 5 10

gcg ctg tgg atg gac tct gtc cag gct ggc tcc

agc ttc ctc agc ccc 155

Ala Leu Trp Met Asp Ser Val Gln Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro

15 20 25 30

tca cag aga ccg cag ggg aag gat aag aag cct ccc agg gtt ggc aga 203

Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg

35 40 45

cga gac tca gat ggg atc ctg gac ctg ttt atg agg ccc cca ttg cag 251

Arg Asp Ser Asp Gly Ile Leu Asp Leu Phe Met

Arg Pro Pro Leu Gln

50 55 60

gat gaa gac atc aga cac att acg ttt aac act cct ttt gag atc ggg 299

Asp Glu Asp Ile Arg His Ile Thr Phe Asn Thr Pro Phe Glu Ile Gly

65 70 75

atc acc atg act gag gag ctg ttc cag caa tat gga gaa gtg atg cag 347

Ile Thr Met Thr Glu Glu Leu Phe Gln Gln Tyr Gly Glu Val Met Gln

| | | | |
|---|---|-----|----|
| 80 | 85 | 90 | |
| aag atc atg cag gat ttg ctg atg gac aca cct gcc aaa gag | t | 390 | |
| Lys Ile Met Gln Asp Leu Leu Met Asp Thr Pro Ala Lys Glu | | | |
| 95 | 100 | 105 | |
| gacaagagtg gatatgatct ggacttcata aaacctgcg tcccatatat tccctgcatta | | 450 | |
| ttgcatgcat aattcaacca attgttaaac atttaataaa attttgcaa cgc | | 503 | |
| <210> | 37 | | |
| <211> | 484 | | |
| <212> | DNA | | |
| <213> | Xenopus laevis | | |
| <220> | | | |
| <221> | CDS | | |
| <222> | (47)..(388) | | |
| <223> | Base sequence of cDNA coding prepro-form of frog (Xenopus laevis) | | |
| | endogenous peptides of growth hormone secretagogue | | |
| <400> | 37 | | |
| tttcactttt atctgcagg cggcaccggt gaccaggacc ttcagg | atg aat ttt | 55 | |
| | Met Asn Phe | | |
| | 1 | | |
| ggt aaa gcc gcc atc ttt ggg gtt gtc ttg ttc tgc ctg ctg tgg acg | | 103 | |
| Gly Lys Ala Ala Ile Phe Gly | | | |
| Val Val Leu Phe Cys Leu Leu Trp Thr | | | |
| 5 | 10 | 15 | |
| gag ggg gcc cag gct ggc ttg acc ttc ctg agt cca gcc gac atg cag | | 151 | |
| Glu Gly Ala Gln Ala Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala Asp Met Gln | | | |
| 20 | 25 | 30 | 35 |
| aag att gcg gag agg caa tca cag aat aag ctg aga cac ggc aat atg | | 199 | |
| Lys Ile Ala Glu Arg Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met | | | |
| 40 | 45 | | |
| 50 | | | |
| aat cgc agg ggt gtg gag gat gac ctg gcc ggg gag gag atc ggg gtg | | 247 | |
| Asn Arg Arg Gly Val Glu Asp Asp Leu Ala Gly Glu Glu Ile Gly Val | | | |
| 55 | 60 | 65 | |
| acc ttc cct ctg gat atg aag atg acg cag gag cag ttc cag aag cag | | 295 | |
| Thr Phe Pro Leu Asp Met Lys Met Thr Gln Glu Gln Phe Gln Lys Gln | | | |
| 70 | 75 | 80 | |
| agg gct gcg gtg cag gac ttc ctg tac tcc tcc ctc ctc | | | |
| tct ctc ggg | 343 | | |
| Arg Ala Ala Val Gln Asp Phe Leu Tyr Ser Ser Leu Leu Ser Leu Gly | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| tca gtg cag gat aca gaa gac aag aat gaa aat cct cag agc caa | tg | 390 | |
| Ser Val Gln Asp Thr Glu Asp Lys Asn Glu Asn Pro Gln Ser Gln | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| agaatgatga aaatccgctc gtctctgatg ccctccccg atctgtgtgt ctttattatc | | 450 | |
| tctgtgtaac ccagaaataa atcttattta tggc | | 484 | |
| <210> | 38 | | |
| <211> | 462 | | |
| <212> | DNA | | |
| <213> | Oncorhynchus mykiss | | |
| <220> | | | |
| <221> | CDS | | |
| <222> | (12)..(257) | | |
| <223> | Base sequence of cDNA coding prepro-form of rainbow trout | | |

| | | |
|---|---|-----|
| endogenous peptides (23 amino acids) of growth hormone secretagogue | | |
| <400> | 38 | |
| tcacaggtct c | atg ata ctg atg ctg tgt act ctg gct ctg tgg | 44 |
| | Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp | |
| | 1 5 10 | |
| gcc aag tca gtc agt gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc tcc cag aaa | | 92 |
| Ala Lys Ser Val Ser Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys | | |
| | 15 20 25 | |
| cca cag gta aga cag ggt aaa ggg aag ccc cct cga gtt ggt cgg cga | | 140 |
| Pro Gln Val Arg Gln Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg | | |
| | 30 35 40 | |
| gac att gag | | |
| agc ttt gct gag ctg ttt gag ggt ccc ctt cac cag gaa | 188 | |
| Asp Ile Glu Ser Phe Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu | | |
| | 45 50 55 | |
| gac aaa cac aat acg atc aag gct cct ttt gag atg ggc atc acc atg | | 236 |
| Asp Lys His Asn Thr Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met | | |
| | 60 65 70 75 | |
| agt gag gag gag ttc cag gag tat ggtgccgtgc tgcagaagat cctgcaggac | | 290 |
| Ser Glu Glu | | |
| Glu Phe Gln Glu | | |
| | 80 | |
| gtcctgggag acaactgccac tgcagaatga tcacaacttg gcatagacac ggaatacaaa | | 350 |
| gaacctccat tcctgtttct ccaactttcc tttctcaact tgtcttatac ccaatgtact | | 410 |
| gtgtgaacat cgtttgaatt gtaaaagatg aataaaataa ccgcggccgc ta | | 462 |
| <210> | 39 | |
| <211> | 453 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Oncorhynchus mykiss | |
| <220> | | |
| <221> | CDS | |
| <222> | (12)..(308) | |
| <223> | Base sequence of cDNA coding prepro-form of rainbow trout endogenous peptides (20 amino acids) of growth hormone secretagogue | |
| <400> | 39 | |
| tcacaggtct c | atg ata ctg atg ctg tgt act ctg gct ctg tgg | 44 |
| | Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp | |
| | 1 5 10 | |
| gcc aag tca gtc agt gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc tcc cag aaa | | 92 |
| Ala Lys Ser Val Ser Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys | | |
| | 15 20 25 | |
| cca cag ggt aaa ggg aag ccc cct cga gtt ggt cgg cga gac att gag | | 140 |
| Pro Gln Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu | | |
| | 30 35 40 | |
| agc ttt gct | | |
| gag ctg ttt gag ggt ccc ctt cac cag gaa gac aaa cac | 188 | |
| Ser Phe Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His | | |
| | 45 50 55 | |
| aat acg atc aag gct cct ttt gag atg ggc atc acc atg agt gag gag | | 236 |
| Asn Thr Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu | | |
| | 60 65 70 75 | |
| gag ttc cag gag tat ggt gcc gtg ctg cag aag atc ctg cag gac gtc | | 284 |

| | |
|---|-----|
| Glu Phe Gln | |
| Glu Tyr Gly Ala Val Leu Gln Lys Ile Leu Gln Asp Val | |
| 80 85 90 | |
| ctg gga gac act gcc act gca gaa tg atcacaactt ggcataagaca | 330 |
| Leu Gly Asp Thr Ala Thr Ala Glu | |
| 95 | |
| cggaatacaa agaacctcca ttccctgttc tccaactttc ctttctcaac ttgtcttata | 390 |
| cccaatgtac tgtgtgaaca tcgtttgaat tgtaaaagat gaataaaata acactgcttc | 450 |
| ctt | 453 |