



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0070180
(43) 공개일자 2015년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/17 (2013.01)
A61K 31/425 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7010085
(22) 출원일자(국제) 2013년10월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년04월20일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2013/078743
(87) 국제공개번호 WO 2014/065341
국제공개일자 2014년05월01일
(30) 우선권주장
JP-P-2012-234300 2012년10월24일 일본(JP)

(71) 출원인
다이이찌 산쿄 가부시키키가이샤
일본 도쿄도 주오구 니혼바시 혼쵸 3-5-1
(72) 발명자
마츠오 츠요시
일본 효고켄 고베시 주오구 미나토지마 미나미마
치 6쵸메 4방 3고 아스비오파마 가부시키키가이샤
나이
무라야마 노리히토
일본 효고켄 고베시 주오구 미나토지마 미나미마
치 6쵸메 4방 3고 아스비오파마 가부시키키가이샤
나이
후루야 마유미
일본 효고켄 고베시 주오구 미나토지마 미나미마
치 6쵸메 4방 3고 아스비오파마 가부시키키가이샤
나이
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 근위축성 측삭 경화증 치료제

(57) 요약

성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 (GHS-R) 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로서 함유하는 근위축성 측삭 경화증 치료제. 현재 유효한 치료약이 없는 근위축성 측삭 경화증에 대한 의약품을 제공하는 것을 과제로 한다. 연하 장애가 중독이 아닌 근위축성 측삭 경화증에 이환하고 있는 개체를 투여 대상으로 하는 그렐린으로 대표되는 GHS-R 작용약을 유효 성분으로 하는 근위축성 측삭 경화증 치료제. 당해 개체가 기존의 ALS 치료제에 불응성 또는 응답이 불충분한 개체여도 된다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2013.01)

C07K 14/46 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로서 함유하고, 연하장해가 중독이 아닌 근위축성 측삭 경화증에 이환하고 있는 개체에 투여하기 위한 근위축성 측삭 경화증 치료제.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

개체가 또한 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제에 불응성 또는 응답이 불충분한 개체인 치료제.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제와 병용하는 치료제.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서,

기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제가 림루줄인 치료제.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로서 함유하는 근위축성 측삭 경화증 치료제가 피하 주사제인 치료제.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약이 그렐린, 프랄모렐린, GHRP-6, 헥사렐린, 이파모렐린, 이부타모렌 메탄술폰산염, 울리모렐린, 아나모렐린, 마시모렐린, 카프로모렐린 또는 SM-130686 인 치료제.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물, 또는 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열에 있어서 아미노 말단으로부터 5 번째 내지 28 번째까지의 아미노산 배열에 있어서 1 내지 수 개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물이며, 또한 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체에 결합함으로써 세포 내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 펩티드계 화합물인 치료제.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물인 치료제.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기가 n-옥타노일기에 의해 아실화되어 있는 펩티드계 화합물인 치료제.

청구항 10

성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로서 함유하는 근위축성 측삭 경화증 치료제를 연하 장애가 중독이 아닌 근위축성 측삭 경화증에 이환하고 있는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 근위축성 측삭 경화증의 치료 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

개체가 또한 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제에 불응성 또는 응답이 불충분한 개체인 치료 방법.

청구항 12

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서,

기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제를 병용하여 투여하는 치료 방법.

청구항 13

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서,

기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제가 림루졸인 치료 방법.

청구항 14

제 10 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,

성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로서 함유하는 근위축성 측삭 경화증 치료제가 피하 주사제인 치료 방법.

청구항 15

제 10 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약이 그렐린, 프랄모렐린, GHRP-6, 헥사렐린, 이파모렐린, 이부타모렌 메탄술폰산염, 올리모렐린, 아나모렐린, 마시모렐린, 카프로모렐린 또는 SM-130686 인 치료 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물, 또는 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열에 있어서 아미노 말단으로부터 5 번째 내지 28 번째까지의 아미노산 배열에 있어서 1 내지 수 개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물이며, 또한 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체에 결합함으로써 세포 내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 펩티드계 화합물인 치료 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물인 치료 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기가 n-옥타노일기에 의해 아실화되어 있는 펩티드계 화합물인 치료 방법.

청구항 19

연하 장애가 중독이 아닌 근위축성 측삭 경화증에 이환하고 있는 개체에 투여하여 근위축성 측삭 경화증을 치료하기 위한 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

개체가 또한 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제에 불응성 또는 응답이 불충분한 개체인 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

청구항 21

제 19 항 또는 제 20 항에 있어서,

상기 치료가 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제와 병용하는 치료인 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

청구항 22

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서,

기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제가 킬루졸인 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

청구항 23

제 19 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 있어서,

성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염의 개체에 대한 투여가 피하 주사제로서의 투여인 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

청구항 24

제 19 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약이 그렐린, 프랄모렐린, GHRP-6, 헥사렐린, 이파모렐린, 이부타모렌 메탄술폰산염, 올리모렐린, 아나모렐린, 마시모렐린, 카프로모렐린 또는 SM-130686 인 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

청구항 25

제 24 항에 있어서,

그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물, 또는 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열에 있어서 아미노 말단으로부터 5 번째 내지 28 번째까지의 아미노산 배열에 있어서 1 내지 수 개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물이며, 또한 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체에 결합함으로써 세포 내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 펩티드계 화합물인 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물인 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

청구항 27

제 26 항에 있어서,

그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기가 n-옥타노일기에 의해 아실화되어 있는 펩티드계 화합물인 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약을 유효 성분으로서 함유하는 근위축성 측삭 경화증 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 근위축성 측삭 경화증 (Amyotrophic Lateral Sclerosis ; 이하, ALS) 은 성인의 가장 일반적인 운동 신경 질환으로, 상위 및 하위 운동 신경 세포가 선택적으로 또한 계통적으로 사멸하는 신경 변성 질환이다. 운동 신경 세포사의 결과, 상지, 및 하지의 근육 위축, 근력 저하가 진행되고, 이 동안에 언어 장애, 연하 곤란 등의 구마비 증상 및 호흡근 마비가 가해지는 경과를 취하는 경우가 많다. ALS 는 주로 중년 이후에 발증하고, 인공 호흡기에 의한 호흡 관리를 실시하지 않는 경우, 많은 환자가 발증 후 2 ~ 3 년에 호흡 부전때문에 사망에 이르는 중독한 질환이다. 호흡근을 포함한 전신의 근위축 및 근력 저하에도 불구하고, 지능 등의 고차 기능이나 감각은 유지된다 (비특허문헌 1).

[0003] ALS 의 원인 유전자의 하나로서 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 가 예시되고 있다. ALS 환자에서 동정된 변이 SOD1 유전자를 마우스나 래트에게 도입함으로써, 인간 ALS 의 병태와 마찬가지로, 성숙 후에 운동 신경 세포가 선택적으로 사멸하고, 골격근 위축이나 근력 저하가 진행되어, 사망하는 것을 알 수 있고, 이들의 변이 SOD1 유전자 도입 마우스나 래트가 ALS 모델 동물로서 확립되어, ALS 의 병태 해석이나 치료제의 탐색에 범용되고 있다. 특히 인간 SOD1 의 93 위치 Gly(G) 의 Ala(A) 치환 단백질을 발현하는 트랜스제닉 마우스, 즉 변이 SOD1 유전자 (G93A) 도입 마우스 (이하, SOD1^{G93A} 마우스) 를 사용한 연구가 가장 진행되고 있고, 본 동물을 사용한 평가가 유럽 ALS/MND 학회에서 추천되고 있다 (비특허문헌 2).

[0004] 현재, 전세계에서 인가되어 있는 ALS 치료제는 릴루졸 (riluzole) 뿐이다. 본 약은 ALS 발증 요인의 하나로 여겨지는 글루탐산 독성에 길항하지만, 그 연명 효과는 수개월에 지나지 않고, 효과는 한정적인 것이다 (비특허문헌 1).

[0005] 그렐린 (ghrelin) 은 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 (Growth Hormone Secretagogue Receptor ; 이하, GHS-R) 의 내인성 리간드로서 발견된 펩티드 호르몬이다 (비특허문헌 3). 그렐린은 인간 및 동물에 있어서 성장 호르몬 (Growth Hormone ; 이하, GH) 분비를 항진시킨다 (비특허문헌 4 등).

[0006] GH 는 간장이나 골격근에 있어서 insulin-like growth factor-1 (이하, IGF-1) 산생을 촉진하는 것, IGF-1 은 운동 신경 세포의 영양 인자의 하나인 것이 알려져 있다. IGF-1 유전자를 포함하는 재조합 AAV4 바이러스 벡터를 SOD1^{G93A} 마우스의 측뇌실 내에 주입하면, 생존 기간이 유의하게 연장되고, 운동 기능 및 근력의 저하가 유의하게 억제되었다 (특허문헌 1). 이와 같이 IGF-1 을 뇌 내에서 강제 발현시켰을 때의 효과가 보고되어 있지만, SOD1^{G93A} 마우스의 골격근에서 인간 IGF-1 을 과잉 발현시켜도 운동 신경 세포사나 생존 기간에 영향을 주지 않았다 (비특허문헌 5). 또, 임상에서 GH 또는 IGF-1 을 ALS 환자에게 투여했을 때, GH 요법은 무효이고 (비특허문헌 6), IGF-1 도 ALS 환자의 근력, 기능 전위, 및 생존 기간의 어느 것에 대해서도 효과를 나타내지 않았다 (비특허문헌 7). 따라서, 말초성의 GH, IGF-1 계의 활성화가 ALS 에 유효하다고는 할 수 없다.

그렐린도 뇌하수체로부터의 GH 분비를 촉진하여, 혈중 GH 농도를 증가시키지만 (예를 들어, 비특허문헌 3,

4), 뇌 내나 척수에서 IGF-1 을 증가시키는 작용은 알려지지 않기 때문에, 그렐린이 ALS 병태에 대해 유효한지의 여부는 불명확하다.

[0007] 또, 그렐린은 말초에 존재하는 유일한 섭식 항진 물질로, 인간이나 동물에 있어서 섭식량을 증가시키는 것이 보고되어 있다 (예를 들어, 비특허문헌 4). 그러나, ALS 는 운동 신경 세포의 사멸에 의해 골격근이 위축되고, 근력이 저하되어, 사망에 이르는 질환이기 때문에, 그렐린의 투여에 의해 섭식량이 증가하고, 체중이나 골격근량이 유지되는 것만으로는, 운동 신경 세포사의 억제와의 관계도 불명확하여, 그렐린이 ALS 병태에 대해 유효한지의 여부는 불명확하다.

[0008] 한편, ALS 환자 중에서 혈중 LDL/HDL 비가 높고, 고지혈증을 나타내는 환자에서는, 그렇지 않은 환자와 비교해서 12 개월 이상 생존 기간이 길고, 고지혈증이 ALS 의 예후 규정 인자인 것이 보고되어 있다 (비특허문헌 8). 마찬가지로, 혈중 콜레스테롤이나 중성 지방 농도가 높은 ALS 환자에서는 예후가 좋은 것이 보고되어 있다 (비특허문헌 9).

[0009] 마우스에 그렐린을 투여하면 혈중 중성 지방 농도에는 영향을 미치지 않았지만, 혈중 총 콜레스테롤 농도를 증가시켰다는 보고가 있지만 (비특허문헌 10), 그렐린이 고지혈증의 치료에 유용하다는 보고도 있다 (특허문헌 2).

[0010] 또, 만성 호흡기 염증 환자에게 그렐린을 3 주간 반복 투여했을 때, 체중이나 영양 상태를 개선시켰지만, 혈중 콜레스테롤 농도에 영향을 미치지 않았던 것도 보고되어 있다 (비특허문헌 11).

[0011] 이상과 같이, 그렐린의 혈중 콜레스테롤이나 중성 지방에 대한 영향에 대해서는 일정한 지견이 얻어지지 않았다.

[0012] 태자 래트 해마 신경 세포를 이오노마이신으로 처리하여 세포 내 칼슘 (Ca) 을 상승시킴으로써 세포사를 유발했을 때, GHS-R 작동약인 이하의 화합물, 래트 그렐린, 프랄모렐린 (pralmorelin ; Growth Hormone Releasing Peptide-2 (이하, GHRP-2)), 헥사렐린 (hexarelin) 및 MK-0677 이 세포사 억제 작용을 나타내는 것이 보고되어 있고, 당해 화합물군이 유효한 비허혈성의 신경 변성 질환의 예로서 ALS 가 예시되어 있다 (특허문헌 3). ALS 는 성인 이후에 운동 신경 세포가 선택적으로 사멸하는 질환이며, 해마의 세포는 장애를 받지 않았다. 따라서, Ca 농도 상승으로 유발되는 태자 래트 해마 신경 세포의 세포사를 GHRP-2 나 그렐린이 in vitro 에서 억제했다고 해도, 이들 화합물이 ALS 에 유효한지의 여부는 불명확하다.

[0013] in vitro 의 래트 척수 기관 배양계에 있어서, 그렐린은 글루탐산에서 유발되는 운동 신경 세포사를 억제하는 것이 보고되어 있다 (비특허문헌 12, 13). 그러나, in vitro 의 척수 기관 배양계가 ALS 와 같은 복잡한 질환의 병태를 충분히 반영한다고는 할 수 없다.

[0014] 프랄모렐린 (GHRP-2) 이 래트 부신 갈색 세포종 유래 PC-12 세포에 있어서 세포체의 1.5 배 이상의 수상 돌기와 축삭을 가지는 세포수의 비율을 대조군에 비해 약 1.2 배로 증가시키는 것이 보고되어 있지만 (특허문헌 4), 당해 세포는 운동신경 세포는 아니기 때문에, GHRP-2 가 ALS 에 유효한지의 여부를 판단할 수 없다.

[0015] 1,2-디아세틸벤젠 (diacetylbenzene) 의 투여에 의해 야기된 마우스 근위 축삭 손상 모델에 있어서, GHS-R 작동약의 1 종인 Growth Hormone Releasing Peptide-6 (이하, GHRP-6) 및 세포 증식 인자인 EGF 는, 각각 단독으로는 보행 패턴 장애를 개선할 뿐인데, 양자를 동시에 투여하면 행동학적으로 마우스의 보행능을 개선시켜, 골격근의 활동 전위도 유의하게 개선시킨다는 보고가 있지만 (비특허문헌 14), 이용된 동물 모델은 ALS 의 임상 병태와 다르므로, GHRP-6 이 ALS 에 유효한지의 여부를 판단할 수는 없다.

[0016] 한편, 그렐린 수용체인 GHS-R 길항약이 ALS 의 치료에 유용한 것을 기재한 보고 (특허문헌 5, 특허문헌 6) 도 있는 점에서, 그렐린을 포함하는 GHS-R 작동약이 ALS 의 치료에 유용하다고는 반드시 추정되는 것은 아니다.

선행기술문헌

특허문헌

[0017] (특허문헌 0001) (특허 문헌 1) W02007/146046

(특허문헌 0002) (특허 문헌 2) 일본 공개특허공보 2008-127377

(특허문헌 0003) (특허 문헌 3) W001/047558

(특허문헌 0004) (특허 문헌 4) 일본 공개특허공보 2005-239712

(특허문헌 0005) (특허 문헌 5) US7829589

(특허문헌 0006) (특허 문헌 6) US2012/0080747

비특허문헌

[0018]

- (비특허문헌 0001) Expert Opinion on Emerging Drugs (2011 년) 16 권 (2 호) 537-558 페이지
- (비특허문헌 0002) Amyotrophic Lateral Sclerosis (2010 년) 11 권 38-45 페이지
- (비특허문헌 0003) Nature (1999 년) 402 권 656-660 페이지
- (비특허문헌 0004) Physiological Reviews (2005 년) 85 권 495-522 페이지
- (비특허문헌 0005) Experimental Neurology (2007 년) 207 권 52-63 페이지
- (비특허문헌 0006) Muscle & Nerve (1993 년) 16 권 (6 호) 624-633 페이지
- (비특허문헌 0007) Neurology (2008 년) 71 권 1770-1775 페이지
- (비특허문헌 0008) Neurology (2008 년) 70 권 1004-1009 페이지
- (비특허문헌 0009) Journal of Neurology (2011 년) 258 권 (4 호) 613-617 페이지
- (비특허문헌 0010) Nature Neuroscience (2010 년) 13 권 (7 호) 877-883 페이지
- (비특허문헌 0011) Pulmonary Pharmacology & Therapeutics (2008 년) 21 권 (5 호) 774-779 페이지
- (비특허문헌 0012) Experimental Neurology (2011 년) 230 권 114-122 페이지
- (비특허문헌 0013) Korean Journal of Physiology and Pharmacology (2012 년) 16 권 (1 호) 43-48 페이지
- (비특허문헌 0014) Neurotoxicity Research (2011 년) 19 권 195-209 페이지

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019]

기존의 ALS 치료제인 릴루졸의 임상 효과는 한정적인 것이며, 그 출시로부터 이미 15 년 이상이 경과되어, 여러 가지 화합물의 임상 개발이 실시되었음에도 불구하고, 여전히 새로운 ALS 치료제는 창제되지 않았다. 이와 같이, ALS 에 대한 유효한 치료제의 개발에 대해 현재도 큰 의료 상의 미충족 요구가 있다. 본 발명에서는, 현재 유효한 치료약이 없는 ALS 에 대해, 병태 진전을 억제하여, 효과적으로 치료할 수 있는 ALS 치료제를 제공하는 것을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0020]

본 발명자들은, 현재 유효한 치료약이 없는 ALS 에 대해 유용한 치료제, 특히 유일한 기존약인 릴루졸과 비교해서 보다 유효하게 치료할 수 있는 약제에 대해 예의 검토를 실시하여, GHS-R 작용약이 당해 기존약보다 유효한 운동 신경 세포 보호 작용을 나타내는 것을 알아내어, 본 발명을 완성했다. 즉, 본 발명은 이하의 발명을 포함한다.

[0021]

(1) 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로서 함유하고, 연하 장애가 중독이 아닌 근위축성 측삭 경화증에 이환하고 있는 개체에 투여하기 위한 근위축성 측삭 경화증 치료제.

[0022]

(2) 개체가 또한 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제에 불응성 또는 응답이 불충분한 개체인 상기 (1) 에 기재된 치료제.

[0023]

(3) 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제와 병용하는 상기 (1) 또는 (2) 에 기재된 치료제.

- [0024] (4) 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제가 릴루졸인 상기 (2) 또는 (3) 에 기재된 치료제.
- [0025] (5) 피하 주사제인 상기 (1) 또는 (2) 에 기재된 치료제.
- [0026] (6) 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약이 그렐린, 프랄모렐린, GHRP-6, 핵사렐린, 이파모렐린, 이부타 모렌테탄술폰산염, 울리모렐린, 아나모렐린, 마시모렐린, 카프로모렐린 또는 SM-130686 인 상기 (1) 내지 (5) 중 어느 한 항에 기재된 치료제.
- [0027] (7) 그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물, 또는 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열에 있어서 아미노 말단으로부터 5 번째 내지 28 번째까지의 아미노산 배열에 있어서 1 내지 수 개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물이며, 또한 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체에 결합함으로써 세포 내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 펩티드계 화합물인 상기 (6) 에 기재된 치료제.
- [0028] (8) 그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물인 상기 (7) 에 기재된 치료제.
- [0029] (9) 그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기가 n-옥타노일기에 의해 아실화되어 있는 펩티드계 화합물인 상기 (8) 에 기재된 치료제.
- [0030] (10) 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로서 함유하는 근위축성 측삭 경화증 치료제를 연하 장애가 중독이 아닌 근위축성 측삭 경화증에 이환하고 있는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 근위축성 측삭 경화증의 치료 방법.
- [0031] (11) 개체가 또한 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제에 불응성 또는 응답이 불충분한 개체인 상기 (10) 에 기재된 치료 방법.
- [0032] (12) 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제를 병용하여 투여하는 상기 (10) 또는 (11) 에 기재된 치료 방법.
- [0033] (13) 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제가 릴루졸인 상기 (11) 또는 (12) 에 기재된 치료 방법.
- [0034] (14) 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로서 함유하는 근위축성 측삭 경화증 치료제가 피하 주사제인 상기 (10) 내지 (13) 중 어느 한 항에 기재된 치료 방법.
- [0035] (15) 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약이 그렐린, 프랄모렐린, GHRP-6, 핵사렐린, 이파모렐린, 이부타 모렌테탄술폰산염, 울리모렐린, 아나모렐린, 마시모렐린, 카프로모렐린 또는 SM-130686 인 상기 (10) 내지 (14) 중 어느 한 항에 기재된 치료 방법.
- [0036] (16) 그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물, 또는 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열에 있어서 아미노 말단으로부터 5 번째 내지 28 번째까지의 아미노산 배열에 있어서 1 내지 수 개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물이며, 또한 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체에 결합함으로써 세포 내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 펩티드계 화합물인 상기 (15) 에 기재된 치료 방법.
- [0037] (17) 그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물인 상기 (16) 에 기재된 치료 방법.
- [0038] (18) 그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기가 n-옥타노일기에 의해 아실화되어 있는 펩티드계 화합물인 상기 (17) 에 기재된 치료 방법.
- [0039] (19) 연하 장애가 중독이 아닌 근위축성 측삭 경화증에 이환하고 있는 개체에 투여하여 근위축성 측삭 경화증을 치료하기 위한 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.
- [0040] (20) 개체가 또한 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제에 불응성 또는 응답이 불충분한 개체인 상기 (19) 에 기

제된 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

- [0041] (21) 상기 치료가 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제와 병용하는 치료인 상기 (19) 또는 (20) 에 기재된 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.
- [0042] (22) 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제가 킬루졸인 상기 (20) 또는 (21) 에 기재된 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.
- [0043] (23) 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염의 개체에 대한 투여가 피하 주사제로서의 투여인 상기 (19) 내지 (22) 중 어느 한 항에 기재된 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.
- [0044] (24) 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약이 그렐린, 프랄모렐린, GHRP-6, 헥사렐린, 이파모렐린, 이부타모렌메탄술폰산염, 울리모렐린, 아나모렐린, 마시모렐린, 카프로모렐린 또는 SM-130686 인 상기 (19) 내지 (23) 중 어느 한 항에 기재된 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.
- [0045] (25) 그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물, 또는 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열에 있어서 아미노 말단으로부터 5 번째 내지 28 번째까지의 아미노산 배열에 있어서 1 내지 수 개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물이며, 또한 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체에 결합함으로써 세포 내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 펩티드계 화합물인 상기 (24) 에 기재된 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.
- [0046] (26) 그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드계 화합물인 상기 (25) 에 기재된 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.
- [0047] (27) 그렐린이 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 잔기의 측사슬의 수산기가 n-옥타노일기에 의해 아실화되어 있는 펩티드계 화합물인 상기 (26) 에 기재된 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

발명의 효과

- [0048] 본 발명의 GHS-R 작용약은, ALS 에 있어서의 병태 진전을 억제함으로써 생존 기간을 연장시키는 효과를 갖기 때문에, 현재 유효한 치료약이 없는 ALS 의 치료에 매우 유용하다. 또, ALS 병태 발증 및 진전의 특징인 운동 신경 세포수의 감소를 억제하여 당해 세포의 사멸을 현저하게 억제함으로써, 근력 저하를 억제하는 효과도 갖기 때문에 더욱 유용하다. 당해 효과는, 기존의 ALS 치료제인 킬루졸이 무효인 시기로부터의 GHS-R 작용약의 투여에서도 생존 기간을 연장시키는 점에서, 킬루졸보다 우수한 것이며, 장기간의 의료 상의 미충족 요구를 만족시키는 것이다. 또한, 운동 신경 세포 보호 작용을 가지며, 근력 저하를 억제하는 점에서, 생존 기간의 연장 뿐만 아니라 생존 기간 중의 생활의 질의 향상에도 연결된다. 또, GHS-R 작용약이 운동 신경 세포 보호 효과를 나타내는 점에서, ALS 이외의 운동 신경 질환, 예를 들어 척수성 근위축증 등에도 유용하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 본 발명의 GHS-R 작용약으로서, 공지된 펩티드계 화합물이나 비펩티드계 화합물을 사용할 수 있다. 당해 펩티드계 화합물로서는 내인성 리간드인 그렐린 외에, 프랄모렐린 (GHRP-2), GHRP-6, 헥사렐린, 이파모렐린 (ipamorelin) 등을 들 수 있고, 당해 비펩티드계 화합물로서는 이부타모렌메탄술폰산염 (ibutamoren mesilate ; MK-0677), 울리모렐린 (ulimorelin ; TZP-101), 아나모렐린 (anamorelin ; RC-1291), 마시모렐린 (macimorelin, AEZS-130), 카프로모렐린 (capromorelin ; CP-424391), SM-130686 등을 들 수 있다. 특히 펩티드계 화합물이면 그렐린이 바람직하고, 또 비펩티드계 화합물이면 아나모렐린이 바람직하다.
- [0050] 그렐린으로서, 인간 유래 그렐린을 비롯해서, 래트, 마우스, 돼지, 소 등 그 밖의 동물 유래의 그렐린 및 그 유도체를 들 수 있다 (예를 들어 국제 공개 W001/07475 참조). 투여 대상의 개체가 인간인 경우는 인간 유래 그렐린을 사용하는 것이 바람직하다. 인간 유래 그렐린은 28 개의 아미노산으로 이루어지고 (배열 번호 1), 아미노 말단으로부터 3 번째의 세린 잔기의 측사슬의 수산기가 지방산 (n-옥타노일기) 에 의해 아실화된 펩

티드게 화합물이다.

- [0051] 내인성 리간드인 그렐린은 생체 내에 존재하는 호르몬이며, 이미 인간에게 투여되어, 그 안전성이 확인되고 있는 점에서, 특히 안전성이 높은 ALS 치료제가 될 수 있다.
- [0052] 또, 그렐린 유도체로서는, 배열 번호 1 에 기재된 아미노산 배열에 있어서 아미노 말단으로부터 5 번째 ~ 28 번째의 아미노산 잔기에 있어서 1 개 또는 수 개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 배열을 가지며, 아미노 말단으로부터 3 번째의 아미노산 (세린) 잔기가 당해 아미노산 잔기의 측사슬 (수산기) 에 지방산이 도입된 수식 아미노산 잔기인 펩티드이며, 또한 GHS-R 에 결합함으로써, 세포 내의 칼슘 이온 농도를 상승시키는 활성을 갖는 펩티드이면 사용할 수 있다 (국제 공개 W001/07475 참조).
- [0053] 또한, 본 명세서 중에 있어서의 「수 개」란, 1 내지 8 개, 1 내지 7 개, 1 내지 6 개, 1 내지 5 개, 1 내지 4 개, 1 내지 3 개, 또는 1 내지 2 개를 의미한다.
- [0054] 그렐린 유도체의 아미노산 배열로서는 천연형의 아미노산 배열과 비교해서 70 %, 바람직하게는 80 %, 보다 바람직하게는 90 %, 특히 바람직하게는 95 %, 가장 바람직하게는 97 % 의 상동성을 갖는 것이 바람직하다. 27 개의 아미노산으로 이루어지는 인간 유래 그렐린의 스플라이스 배리언트 (배열 번호 2) 에 있어서도 동일하다.
- [0055] 또, 그렐린 유도체의 활성에 대해서는, GHS-R 에 대한 아고니스트 활성이나 상기 간행물에 기재된 생리 작용을 지표로 할 수 있고, 당해 지표에 기초하여 목적으로 하는 그렐린 유도체를 선별할 수 있다. 예를 들어, GHS-R 에 대한 아고니스트 활성에 대해서는, 세포 내 칼슘 이온 농도를 지표로 검토할 수 있지만, 당해 지표에 관련된 측정법은 공지된 방법을 이용할 수 있고, 예를 들어, 칼슘 이온 농도 변화에 의한 Fluo-4 AM (Molecular Probe 사) 의 형광 강도의 변화를 이용한 FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices 사) 을 사용할 수 있다. 또, 칼슘 상승 활성을 갖는 펩티드계 화합물 또는 비펩티드계 화합물이 in vivo 에서 섭식 항진 활성을 갖는지 확인하기 위해서는, 공지된 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어 정상 마우스에서의 섭식 항진 작용을 확인하기 위해서는, 칼슘 상승 활성을 갖는 펩티드계 화합물 또는 비펩티드계 화합물을 동물에 피하 투여 또는 복강 내 투여하고, 투여 후 1 시간의 섭식량을 용매 투여군과 비교하면 된다.
- [0056] 프랄모렐린 (GHRP-2) 으로서는, D-알라닌-D-(2-나프틸)알라닌-L-알라닌-L-트립토판-D-페닐알라닌-L-리신아미드 (미국 특허 제5,663,146호) 를 사용할 수 있다.
- [0057] GHRP-6 으로서는, L-히스티딘-D-트립토판-L-알라닌-L-트립토판-D-페닐알라닌-L-리신아미드 (Endocrinology (1984 년) 114 권 (5 호) 1537-1545 페이지) 를 사용할 수 있다.
- [0058] 헥사렐린으로서는, L-히스티딘-2-메틸-D-트립토판-L-알라닌-L-트립토판-D-페닐알라닌-L-리신아미드 (미국 특허 제5,646,301호) 를 사용할 수 있다.
- [0059] 이파모렐린으로서는, α-메틸알라닌-L-히스티딘-D-β-(2-나프틸)-L-알라닌-D-페닐알라닌-L-리신아미드 (Journal of Medicinal Chemistry (1998 년) 41 권 3699-704 페이지) 를 사용할 수 있다.
- [0060] 이부타모렌메탄술폰산염 (MK-0677) 으로서는, 2-아미노-2-메틸-N-[(1R)-2-(1-메탄술폰닐스피로[인돌린-3,4'-피페리딘]-1'-일)-2-옥소-1-(페닐메톡시메틸)에틸]프로판아미드메탄술폰산염 (미국 특허 제5,536,716호) 을 사용할 수 있다.
- [0061] 울리모렐린 (TZP-101) 으로서는, 5(S)-시클로프로필-11(R)-(4-플루오로벤질)-2(R), 7,8(R)-트리메틸-2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,13,14,15,16-테트라데카하이드로-1,4,7,10,13-벤조옥사테트라아자시클로옥타데신-6,9,12-트리온 (미국 특허 제7,476,653호) 을 사용할 수 있다.
- [0062] 아나모렐린으로서는, 2-아미노-N- {(1R)-2- [3-벤질-3-(N,N',N'-트리메틸하이드라지노카르보닐)피페리딘-1-일]-1-((1H-인돌-3-일)-2-옥소에틸)-2-메틸프로피온아미드} (미국 특허 제6,576,648호) 를 사용할 수 있다.
- [0063] 마시모렐린 (AEZS-130) 으로서는, 2-메틸알라닌-N-[1(R)-포름아미드-2-(1H-인돌-3-일)에틸]-D-트립토판아미드 (미국 특허 제6,861,409호) 를 사용할 수 있다.
- [0064] 카프로모렐린 (CP-424391) 으로서는, 2-아미노-N-[2-[3a(R)-벤질-2-메틸-3-옥소-3,3a,4,5,6,7-헥사하이드로-2H-피라졸로 [4,3-c]피리딘-5-일]-1(R)-(벤질옥시메틸)-2-옥소에틸]이소부티라미드 (유럽 특허 제0869968호) 를 사용할 수 있다.

- [0065] SM-130686 으로서는, (+)-3(S)-(2-클로로페닐)-1-[2-(디에틸아미노)에틸]-3-하이드록시-2-옥소-4-(트리플루오로메틸)-2,3-데하이드로-1H-인돌-6-카르복시아미드염산염 (미국 특허 제6,576,656호) 을 사용할 수 있다.
- [0066] 본원 발명에 사용할 수 있는 GHR-S 작동약에 관련된 염으로서는 약학적으로 허용되는 염이 바람직하고, 예를 들어 무기 염기와 염, 유기 염기와 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등을 들 수 있다.
- [0067] 무기 염기와 염의 바람직한 예로서는, 예를 들어 나트륨염, 칼륨염 등의 알칼리 금속염 ; 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리 토금속염 ; 그리고 알루미늄염, 암모늄염 등을 들 수 있다.
- [0068] 유기염기와 염의 바람직한 예로서는, 예를 들어 트리메틸아민, 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 디시클로헥실아민, N,N'-디벤질에틸렌디아민 등과의 염을 들 수 있다.
- [0069] 무기산과의 염의 바람직한 예로서는, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염을 들 수 있다.
- [0070] 유기산과의 염의 바람직한 예로서는, 예를 들어 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레산, 시트르산, 숙신산, 말산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염을 들 수 있다.
- [0071] 염기성 아미노산과의 염의 바람직한 예로서는, 예를 들어 아르기닌, 리신, 오르니틴 등과의 염을 들 수 있고, 산성 아미노산과의 염의 바람직한 예로서는, 예를 들어 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염을 들 수 있다. 이상의 염 중에서도 특히 나트륨염, 칼륨염이 가장 바람직하다.
- [0072] 본 발명의 GHS-R 작동약은 통상적인 방법에 의해 얻을 수 있다. 예를 들어, 천연의 원료로부터 분리할 수 있고, 또는 재조합 DNA 기술 및/혹은 화학적 합성 기술에 의해 제조할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 펩티드계 화합물을 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조하는 경우, 본 발명에 관련된 펩티드계 화합물을 코드하는 목적 유전자를 삽입하는 벡터로서는, 예를 들어 대장균의 벡터 (pBR322, pUC18, pUC19 등), 고초균의 벡터 (pUB110, pTP5, pC194 등), 효모의 벡터 (YEpl 형, YRp 형, YIp 형), 또는 동물 세포의 벡터 (레트로 바이러스, 백시니아 바이러스 등) 등을 들 수 있지만, 그 밖의 것이어도, 숙주 세포 내에서 안정적으로 목적 유전자를 유지할 수 있는 것이면, 어느 것이나 사용할 수 있다. 당해 벡터는 적당한 숙주 세포에 도입된다. 목적으로 하는 유전자를 플라스미드에 삽입하는 방법이나 숙주 세포에 대한 도입 방법으로서, 예를 들어, Molecular Cloning : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 에 기재된 방법을 이용할 수 있다.
- [0074] 상기 플라스미드에 있어서 목적으로 하는 펩티드 유전자를 발현시키기 위해서, 당해 유전자의 상류에는 프로모터를 기능하도록 접속시킨다.
- [0075] 본원 발명에 있어서 사용되는 프로모터로서는, 목적 유전자의 발현에 사용하는 숙주 세포에 대응하여 적절한 프로모터이면 어떠한 것이어도 된다. 예를 들어, 형질 전환하는 숙주 세포가 Escherichia 속의 경우에는 lac 프로모터, trp 프로모터, lpp 프로모터, λ PL 프로모터, recA 프로모터 등을 사용할 수 있고, Bacillus 속의 경우에는 SPO1 프로모터, SPO2 프로모터 등을 사용할 수 있고, 효모의 경우에는 GAP 프로모터, PHO5 프로모터, ADH 프로모터 등을 사용할 수 있고, 동물 세포의 경우에는, SV40 유래 프로모터, 레트로 바이러스 유래 프로모터 등을 사용할 수 있다.
- [0076] 상기와 같이 하여 얻어진 목적 유전자를 함유하는 벡터를 사용하여 숙주 세포를 형질 전환한다. 숙주 세포로서는 세균 (예를 들어, Escherichia 속, Bacillus 속 등), 효모 (Saccharomyces 속, Pichia 속, Candida 속 등), 동물 세포 (CHO 세포, COS 세포 등) 등을 사용할 수 있다. 배양 시의 배지로서는 액체 배지가 적당하고, 당해 배지 중에는 배양하는 형질 전환 세포의 생육에 필요한 탄소원, 질소원 등이 포함되는 것이 특히 바람직하다. 원하는 바에 따라 비타민류, 성장 촉진 인자, 혈청 등을 첨가할 수 있다.
- [0077] 배양 후, 배양물로부터 본 발명에 관련된 펩티드계 화합물을 통상적인 방법에 의해 분리 정제한다. 예를 들어, 배양균체 또는 세포로부터 목적 물질을 추출하려면, 배양 후, 균체 또는 세포를 모으고, 이것을 단백질 변성제 (염산구아니딘 등) 를 포함하는 완충액에 현탁하고, 초음파 등에 의해 균체 또는 세포를 파쇄한 후, 원심분리를 실시한다. 다음으로 상청으로부터 목적 물질을 정제하려면, 목적 물질의 분자량, 용해도, 하전 (등전점), 친화성 등을 고려하여, 겔 여과, 환외 여과, 투석, SDS-PAGE, 각종 크로마토그래피 등의 분리 정제 방법

을 적절히 조합하여 실시할 수 있다.

[0078] 또 본 발명의 펩티드계 화합물을 화학적 합성 기술을 이용하여 제조하는 경우, 예를 들어 보호기가 부여된 아미노산을 액상법 및/또는 고상법에 의해 축합, 펩티드 사슬을 연장시켜, 산으로 전체 보호기를 제거하고, 얻어진 미정제 생성물을 공지된 정제 방법으로 정제함으로써 얻어진다.

[0079] 본 발명에 관련된 그렐린 및 그 유도체에 대해서도 통상적인 방법에 의해 얻을 수 있고, 예를 들어, 천연의 원료로부터 단리·정제함으로써 얻을 수 있고, 또는 재조합 DNA 기술 및/혹은 화학적 합성 기술에 의해 제조할 수 있다.

[0080] 그렐린에는 측사슬이 수식(아실화)된 아미노산 잔기가 포함되므로, 아미노산 잔기에 수식(아실화)하는 경우에는, 공지된 수단에 따라 당해 수식 반응을 실시할 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 기술을 이용하는 제법에 있어서는, 그렐린 또는 그 유도체를 코딩하는 DNA 를 갖는 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포를 배양하고, 당해 배양물로부터 목적으로 하는 펩티드를 채취함으로써 본 발명에 관련된 그렐린 또는 그 유도체를 얻을 수도 있다. 당해 숙주 세포를 선택함으로써, 당해 세포 내에 있어서 목적으로 하는 펩티드에 수식(아실화)이 된 화합물을 얻을 수 있다. 예를 들어 지방산 수식(아실화) 펩티드계 화합물을 직접 제조하는 경우에는, 당해 펩티드의 전구체 폴리펩티드를 적절한 위치에서 절단할 수 있는 프로세싱·프로테아제 활성을 가지며, 당해 펩티드 중의 세린 잔기를 아실화할 수 있는 활성을 갖는 세포를 사용하는 것이 바람직하다. 이와 같은 프로세싱·프로테아제 활성 및 세린아실화 활성을 갖는 숙주 세포는 당해 전구체 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA 를 포함하는 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 전환하고, 그 형질 전환 세포가 칼슘 상승 활성 또는 성장 호르몬 분비 촉진 활성을 갖는 지방산 수식 펩티드계 화합물을 산생하는 것을 확인함으로써 선발할 수 있다.

[0081] 또 화학 합성 기술을 이용하는 제법에 있어서는, 예를 들어, 보호기가 부여된 아미노산을 액상법 및/또는 고상법에 의해 축합, 펩티드 사슬을 연장시켜, 산으로 전체 보호기를 제거하고, 얻어진 미정제 생성물을 상기의 정제 방법으로 정제함으로써 얻을 수 있다. 아실화 효소 또는 아실기 전이 효소로 선택적으로 목적 위치에 있는 아미노산의 측사슬을 아실화할 수 있다.

[0082] 또한, 재조합 DNA 기술과 화학 합성 기술을 병용한 제법을 이용해도 되고, 수식 아미노산 잔기를 포함하는 프래그먼트를 화학 합성에 의해 제조하고, 수식 아미노산 잔기를 포함하지 않는 그 밖의 프래그먼트를 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조하고, 그 후 각각의 프래그먼트를 융합시키는 방법으로도 제조할 수 있다 (국제 공개 W001/07475, W003/084983 참조).

[0083] 본 발명에 있어서 사용할 수 있는 그 밖의 화합물, 즉, 프랄모렐린 (GHRP-2), GHRP-6, 헥사렐린, 이파모렐린, 이부타모렌테탄술폰산염 (MK-0677), 울리모렐린, 아나모렐린, 마시모렐린, 카프로모렐린 및 SM-130686 등에 대해서도 상기의 방법을 포함하여 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0084] ALS 모델 동물 (SOD1^{G93A} 마우스) 을 제한 급이하에서 사육하고, GHS-R 작동약의 섭식 항진 작용이 발현되지 않는 상태에서 GHS-R 작동약을 당해 동물에 투여하는 경우에는, 골격근량의 감소가 억제되었지만, 근력 저하 억제 작용이나 운동 신경 세포사 억제 작용은 확인되지 않은 점에서, GHS-R 작동약은 그 섭식 항진 작용이 나타나는 개체에 있어서 근력 저하 억제 작용이나 생존 기간 연장 작용을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 투여 대상으로서는, ALS 이환 개체 중, GHS-R 작동약의 투여에 의해 섭식량이 증가할 수 있는 개체, 바꾸어 말하면 개체 자체가 원하는 섭식량을 경구 섭취할 수 있는 개체로서의 「연하 장애가 중독이 아닌 개체」 이다. 또한 GHS-R 작동약은 틸루졸이 무효인 시기로부터의 투여에서도 치료 효과를 가지므로, 당해 개체는 「틸루졸에 불응성 또는 응답이 불충분한 개체」 여도 된다.

[0085] (1) 연하 장애가 중독이 아닌 개체

[0086] 「연하 장애가 중독이 아닌 개체」 란, 원하는 것 만큼의 식사량을 경구 섭취할 수 있는 개체를 나타내고, 먹고 싶다고 생각하는 식사량을 취할 수 있는 개체이다. 즉, 당해 개체는 연하 기능이 유지되어 있는 한, 먹기 쉬운 섭식 내용의 연구 (페이스트상의 가공 식품 등), 먹기 쉬운 섭식 용구의 연구 및 섭식에 있어서 개호의 보조 (예를 들어 섭식 용구의 사용 시의 보조) 가 있어도 된다.

[0087] 「연하 장애가 중독이 아니다」 란, 전세계에서 확립된 임상 평가 지표인 개정판 ALS 기능 평가 척도 (Revised ALS Functional Rating Scale (이하, ALSFRS-R) : Journal of the Neurological Sciences (1999 년) 169 권 (1-2 호) 13-21 페이지) 를 이용하여 판단할 수 있고, 당해 기능 평가 척도의 연하의 항목에 있어서, 2 점 (식사 내용의 연구를 필요로 한다) 이상의 경우이며, 바람직하게는 3 점 (가끔목이 뎀다) 이상의 경우이며, 보다

바람직하게는 4 점 (뒤틀리지 삼킬 수 있다) 의 경우이다.

- [0088] GHS-R 작동약으로서 그렐린을 사용하는 경우, 실시예에 있어서 상세히 서술되어 있는 바와 같이, SOD1^{G93A} 마우스가 먹이 상자로부터의 섭이가 곤란해지는 18 주령 이후는 먹이를 바닥에 뿌리고, 당해 마우스가 먹이를 먹을 수 있도록 보조한 조건에서도, 그렐린은 근력 저하 억제 작용 및/또는 생존 기간 연장 작용을 나타낸다. 즉, 그렐린을 그 섭식 항진 작용이 실현될 수 있는 조건에서 투여하는 경우, ALS 모델 동물의 근력 저하를 억제하여, 생존 기간을 연장시킬 수 있다.
- [0089] (2) 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제에 불응성 또는 응답이 불충분한 개체
- [0090] 기존의 근위축성 측삭 경화증 치료제 (ALS 치료제) 에 「불응성」 이란, 이전 또는 현재에 있어서 기존의 ALS 치료제에 의해 치료 효과가 보이지 않거나 또는 효과가 유지되지 않는 상태, 즉, 기존의 ALS 치료제를 복용하고 있어도 병태의 진전이 억제되지 않는 상태를 나타낸다. 기존의 ALS 치료제에 의한 치료에 대해 불응성인 것은, 상기 서술한 ALSFRS-R 에 있어서 1 종 이상의 임상 평가 지표를 검토함으로써 평가된다. 따라서, 기존의 ALS 치료제에 불응성인 것은, ALS 의 치료에 숙련된 임상가가 판단할 수 있다. 예를 들어, 임상가가 3 개월마다의 진료 시에 개체의 상태를, ALSFRS-R 을 사용하여 평가하고, 기존의 ALS 치료제 치료 개시 후의 일정 기간 (예를 들어 3 개월) 의 평가 척도의 변화도 (감소한 점수/기간) 가 기존의 ALS 치료제 치료 개시 전의 일정 기간 (예를 들어 6 개월간) 의 평가 척도의 변화도와 비교했을 때에 동일한 정도 이상인 경우에는, 당해 개체에 기존의 ALS 치료제는 유효하지 않고, 당해 개체는 기존의 ALS 치료제에 불응성이라고 판단된다.
- [0091] 또, 기존의 ALS 치료제에 의한 치료에 불응성인 개체에는, 이전에 당해 치료에 응답하여 치료 효과를 얻을 수 있었지만, 현시점에서는 이미 당해 치료에 의해 동일한 효과가 얻어지지 않는 개체도 포함된다.
- [0092] 기존의 ALS 치료제에 「응답이 불충분」 하다는 것은, 기존의 ALS 치료제에 의한 치료 효과가 불충분하고, 기존의 ALS 치료제 치료에 의해서도 병태 진전이 충분히 억제되지 않는 상태를 나타낸다. 기존의 ALS 치료제에 의한 치료에 대한 응답이 불충분하다는 것은, 상기 서술한 ALSFRS-R 에 있어서 1 종 이상의 임상 평가 지표를 검토함으로써 평가된다. 따라서, 기존의 ALS 치료제에 응답이 불충분하다는 것은, ALS 의 치료에 숙련된 임상가가 판단할 수 있다. 예를 들어, 임상가가 3 개월마다의 진료 시에 환자의 상태를, ALSFRS-R 을 사용하여 평가하고, 기존의 ALS 치료제 치료 개시 후의 일정 기간 (예를 들어 3 개월) 의 평가 척도의 변화도 (감소한 점수/기간) 를 기존의 ALS 치료제 치료 개시 전의 일정 기간 (예를 들어 6 개월간) 의 평가 척도의 변화도와 비교했을 때에 경감 경향이 30 % 미만인 경우에는, 당해 개체에 대한 기존의 ALS 치료제의 유효성이 불충분하고, 당해 개체는 기존의 ALS 치료제에 「응답이 불충분」 하다고 간주된다.
- [0093] 본 명세서에서 사용되는 「치료」 란, ALS 병태의 진전 억제, 저감 또는 배제를 나타내고, 그 병태로서는 운동 신경 세포의 진행성 변성, 근신유의 제신경, 근위축, 근력 저하, 경축 또는 마비의 진전 억제, 저감 또는 배제, 및 생존 기간의 연장이 포함된다.
- [0094] 본 명세서에서 사용되는 「치료 효과」 는 공지된 방법으로 판단할 수 있다. 예를 들어, ALSFRS-R 에 기초하는 기능 상태 (functional status), 노력성 폐활량 (Forced Vital Capacity, FVC) 에 기초하는 호흡 기능, MRC 스케일 (Medical Research Council Scale) 에 기초하는 근력 등을 평가함으로써 판단할 수 있다.
- [0095] 또, 이 외에도 ALS 증상의 정도를 판단할 수 있는 방법이면, 어떠한 방법이어도 이용할 수 있다. 예를 들어, 악력, 배근력, 독립 보행의 가부, 경관 영양의 유무, 경관 영양까지의 기간 (기간의 기산일은 임의로 설정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 ALS 치료제 또는 기존의 ALS 치료제의 투여 개시일이어도 되고, 근력 저하 등의 ALS 의 증상이 확인된 시점이어도 된다), 기관 절개의 유무, 인공 호흡기 장착의 유무, 인공 호흡기 장착을 위한 삽관 또는 기관 절개까지의 기간 (기간의 기산일은 임의로 설정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 ALS 치료제 또는 기존의 ALS 치료제의 투여 개시일이어도 되고, 근력 저하 등의 ALS 의 증상이 확인된 시점이어도 된다) 또는 생존 기간 (기간의 기산일은 임의로 설정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 ALS 치료제 또는 기존의 ALS 치료제의 투여 개시일이어도 되고, 근력 저하 등의 ALS 의 증상이 확인된 시점이어도 된다) 등에 의해서도 판단할 수 있다.
- [0096] 이들의 방법을 이용하여 약물의 「치료 효과」 를 판단하는 시기는 본 발명의 ALS 치료제 또는 기존의 ALS 치료제의 투약 기간이 종료된 후여도 되고, 투약 기간 중이어도 된다.
- [0097] 본 발명에 있어서의 GHS-R 작동약을 유효 성분으로 하는 ALS 치료제는 투여 대상의 개체에 단독으로 투여되어도 되고, 다른 약제와 병용 투여되어도 된다.

- [0098] 본 명세서에서 사용되는 「병용」 및 「병용한다」란, 2 종류 이상의 약제를 동일한 개체에 투여하는 것을 말한다. 이들의 약제는 동시에 또는 거의 동시에 (예를 들어, 1 시간 이내) 투여되어도 되고, 수 시간을 사이를 두고 투여되어도 된다. 예를 들어, 매일 최초의 약제를 투여한 직후에 2 번째의 약제를 투여한다. 전형적으로는, 제 1 및 제 2 약제의 양자가 그들의 효과를 적절히 발휘하는 타이밍에서 투여한다. 예를 들어, GHS-R 작동약으로서 그렐린을 유효 성분으로 하는 ALS 치료제와 기존의 ALS 치료제를 병용하는 경우에는, 매일 아침 식전 및 매일 저녁 식전에 기존의 ALS 치료제를 복용하고, 그 직후에 그렐린을 유효 성분으로 하는 ALS 치료제를 투여 (예를 들어, 피하 투여) 함으로써, 또는 반대의 순서로 투여함으로써, 양쪽 약제를 병용할 수 있다.
- [0099] 그렐린은 기존의 ALS 치료제가 무효한 조건하에서, 근력 저하 억제 작용 및/또는 생존 기간의 연장 작용을 나타내는 점에서, 기존의 ALS 치료제에 불응성 또는 응답이 불충분한 ALS 이환 개체에 유효하고, 기존의 ALS 치료제에 응답이 불충분한 개체에 있어서 기존의 ALS 치료제와의 병용 효과도 기대된다. 기존의 ALS 치료제로서는 킬루졸을 들 수 있다.
- [0100] 본원 발명에 사용할 수 있는 GHS-R 작동약 또는 그들의 약리학적으로 허용할 수 있는 염은, 약학적으로 허용되는 담체와 배합하여, 정제, 캡슐제, 과립제, 세립제, 산제 등의 고형 제제, 또는 시럽제, 주사제 등의 액상 제제로서 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다.
- [0101] 약학적으로 허용되는 담체로서는, 제제 소재로서 관용의 각종 유기 또는 무기 담체 물질이 사용되고, 고형 제제에 있어서의 부형제, 활택제, 결합제, 붕괴제 ; 액상 제제에 있어서의 용제, 용해 보조제, 현탁화제, 등장화제, pH 조정제, 완충제, 무통화제 등으로서 배합된다. 또 필요에 따라, 방부제, 향산화제, 착색제, 감미제 등의 제제 첨가물을 사용할 수도 있다.
- [0102] 부형제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 유당, 백당, D-만니톨, 전분, 결정 셀룰로오스, 경질 무수 규산 등을 들 수 있다. 활택제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 톨크, 콜로이드 실리카 등을 들 수 있다.
- [0103] 결합제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 결정 셀룰로오스, 백당, D-만니톨, 텍스트린, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈 등을 들 수 있다.
- [0104] 붕괴제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 전분, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 크로스카르멜로스나트륨, 카르복시메틸스타치나트륨 등을 들 수 있다.
- [0105] 용제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 주사용수, 알코올, 프로필렌글리콜, 마크로골, 참기름, 옥수수유 등을 들 수 있다.
- [0106] 용해 보조제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, D-만니톨, 벤조산벤질, 에탄올, 트리스아미노메탄, 콜레스테롤, 트리에탄올아민, 탄산나트륨, 시트르산나트륨 등을 들 수 있다.
- [0107] 현탁화제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 스테아릴트리에탄올아민, 라우릴황산나트륨, 라우릴아미노프로피온산, 레시틴, 염화벤잘코늄, 염화벤제토늄, 모노스테아르산글리세린 등의 계면 활성제 ; 예를 들어 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 메틸셀룰로오스, 하이드록시메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스 등의 친수성 고분자 등을 들 수 있다.
- [0108] 등장화제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 염화나트륨, 글리세린, D-만니톨 등을 들 수 있다.
- [0109] 완충제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 인산염, 아세트산염, 탄산염, 시트르산염 등의 완충액 등을 들 수 있다.
- [0110] 무통화제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 벤질알코올 등을 들 수 있다.
- [0111] 방부제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 파라옥시벤조산에스테르류, 클로로부탄올, 벤질알코올, 페네틸알코올, 데하이드로아세트산, 소르빈산 등을 들 수 있다.
- [0112] 향산화제의 바람직한 예로서는, 예를 들어 아황산염, 아스코르브산 등을 들 수 있다.
- [0113] 비경구 투여에 적합한 제제 형태로서는, 예를 들어, 정맥내 투여, 피내 투여, 피하 투여, 또는 근육내 투여용 등의 주사제, 점적제, 좌제, 경피 흡수제, 경점막 흡수제, 또는 흡입제 등을 들 수 있고, 경구 투여에 적합한 제제 형태로서는, 예를 들어, 캡슐제, 정제, 시럽제 등을 들 수 있지만, 본 발명의 의약의 유효 성분이 펩티드

제 화합물의 경우, 그 제제 형태로서는 비경구 투여에 적합한 제제 형태가 바람직하고, 예를 들어, 주사제, 점적제, 또는 흡입제 등의 제제 형태가 바람직하다. 이들의 제제 형태는 당업자에게 여러 가지 알려져 있어, 당업자는 원하는 투여 경로에 적합한 제제 형태를 적절히 선택하고, 필요에 따라 당업계에서 이용 가능한 1 또는 2 이상의 제제용 첨가물을 사용하여 의약품 조성물의 형태의 제제를 제조하는 것이 가능하다. 예를 들어, 주사제 또는 점적제 형태의 의약품은 유효 성분인 GHS-R 작동약과 함께 등장화제, pH 조절제, 무통화제, 방부제 등의 1 또는 2 이상의 제제용 첨가물을 주사용 증류수에 용해하여 멸균함으로써 조제할 수 있다. 또, 주사제 또는 점적제 형태의 의약품은 동결 건조 형태의 의약품으로서 제공할 수도 있다. 이와 같은 제제는 사용시에 주사용 증류수나 생리 식염수 등을 첨가하여 용해함으로써 주사제 또는 점적제로서 사용할 수 있다.

[0114] 인간 그렐린은 피하 투여에서 ALS 모델 동물에 있어서 근력 저하 억제 작용이나 생존 기간 연장 작용을 나타내는 점에서, 그렐린, 그 유도체 혹은 그들의 약리학적으로 허용할 수 있는 염, 또는 펩티드계 혹은 비펩티드계의 GHS-R 작동약은 피하 주사제와 같은 주사제로서 투여할 수 있다.

[0115] 유효 성분이 펩티드계 화합물의 경우, 소화관 내에서 분해되기 어려운 제제, 예를 들어 활성 성분인 펩티드를 리보솜 중에 포용한 마이크로 캡슐제로서 경구 투여하는 것도 가능하다. 또, 직장, 비내, 설하 등의 소화관 이외의 점막으로부터 흡수시키는 투여 방법도 가능하다. 이 경우에는 좌제, 점비 스프레이, 흡입약, 설하정과 같은 형태로 개체에 투여할 수 있다. 또, 텍스트란 등의 다당류, 폴리아민, PEG 등으로 대표되는 생분해성 고분자를 캐리어로 한 각종 방출 제어 제제, 지속화 제제 등을 채용함으로써, 펩티드의 혈중 체류성을 개선시킨 제제에 대해서도, 본 발명에 있어서 사용할 수 있다.

[0116] 유효 성분이 비펩티드계 화합물로, 경구 투여에서 사용된다면, 부형제, 활택제, 결합제, 붕괴제 등의 고체 담체와 함께 정제화, 분말 또는 소환약 형태로 경캡슐 내에 충전되거나 혹은 트로치의 형태로 할 수 있다. 고체 담체의 양은 넓게 변화하겠지만, 통상적으로 약 25 mg ~ 약 1 g 이다. 액체 담체가 사용된다면, 유효 성분과 액체 담체로 이루어지는 조제물은 시럽, 유화제, 연캡슐, 수성 혹은 비수성의 액상 현탁액 또는 용액의 형태로서 투여할 수 있다.

[0117] 본 발명에 관련된 ALS 치료제의 유효 성분으로서 사용할 수 있는 GHS-R 작동약의 투여량은 개체 (환자)의 연령, 체중, 증상의 정도 및 투여 경로에 따라 적절히 선택 가능하지만, ALS 이환 개체인 인간 성인에 대해 일반적으로 1 일당 투여량의 상한으로서는, 물질의 중량으로서 예를 들어 상한으로서는 약 100 mg/kg 이하이며, 바람직하게는 약 10 mg/kg 이하이며, 더욱 바람직하게는 1 mg/kg 이하이다. 또, 1 일당 투여량의 하한으로서는, 예를 들어 약 0.1 μ g/kg 이상이며, 바람직하게는 1 μ g/kg 이상, 보다 바람직하게는 10 μ g/kg 이상이다. 본 발명에 관련된 의약품 조성물의 유효 성분으로서 사용할 수 있는 물질은, 그 섭식 행진을 실현하는 조건으로 ALS의 병태 진전을 억제하는 점에서, 투여 기간의 종기는 ALS 이환 개체의 연하 장애가 현저해져, 이미 연하 장애가 중독이 아닌 상태가 아니게 되어, 경관 영양 등의 비자발적 경구 섭취의 수단이 필요하게 될 때까지로 하지만, 그 때까지의 수 개월 ~ 수 년간, 1 일 1 ~ 2 회 정도의 반복 투여 또는 연속 투여할 수 있다. 또, 물질을 반복 투여할 때에는, 매일 조식 및/또는 매일 석식 전에 투여하는 것이 바람직하다.

[0118] 실시예

[0119] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 구체적으로 설명한다. 실시예에 나타낸 것은 본 발명의 실시형태의 일례이며, 본 발명은 이것으로 한정되는 것은 아니다.

[0120] 이하의 실시예에서는, ALS 모델 동물로서 SOD1^{G93A} 마우스를 사용했다. 먼저, The Jackson Laboratory (ME, USA) 에서 B6SJL-Tg(SOD1-G93A) 1 Gur/J 마우스 (SOD1^{G93A} 마우스) 및 야생형 동계통 마우스를 구입하고, 이들을 교배하여 산자(産仔)를 얻었다. 얻어진 SOD1^{G93A} 마우스 및 야생형 동복자 (WT 마우스) 를 다시 교배 번식시켜, 출생한 SOD1^{G93A} 마우스를 실험에 사용했다. 일부의 실시예에서는 WT 마우스도 사용했다.

[0121] SOD1^{G93A} 마우스 및 WT 마우스는 수도물과 설치류 표준 사료 펠릿 (CRF-1, 총 칼로리 중 13.6 %의 칼로리가 지방 유래, 3570 kcal/kg, 오리엔탈 효모 공업 주식회사)의 자유 섭취에 의해 사육했다. 또한, SOD1^{G93A} 마우스의 하지 기능이 저하되고, 먹이 상자로부터의 섭이가 곤란해지는 18 주령 이후는 먹이를 바닥에도 뿌려, 마우스가 먹이를 먹을 수 있도록 보조했다.

[0122] <실시예 1> 10 주령의 SOD1^{G93A} 마우스와 WT 마우스의 체중 및 전지 근력의 비교

[0123] SOD1^{G93A} 마우스는, 인간의 ALS 와 마찬가지로, 성숙기에 운동 신경 세포의 선택적인 사멸을 발생하게 되어, 골격근 위축이나 근력의 저하를 나타내고, 이윽고 죽음에 이른다. 그래서, 먼저 10 주령의 SOD1^{G93A} 마우스의 체중 및 전지 근력을 WT 마우스와 비교해서, 본 주령에 있어서의 ALS 의 발증을 확인했다.

[0124] 1. 재료 및 방법

[0125] 본 실시예에는 10 주령의 WT 마우스 및 SOD1^{G93A} 마우스를 사용하여, 체중 및 전지 근력을 측정했다. 전지 근력은 래트·마우스 간이 근력 측정기 ; 200 g 계 (오하라 의과 산업 주식회사) 를 사용하여 측정했다.

[0126] 2. 결과

[0127] 각 군의 체중 및 전지 근력을 표 1 에 나타낸다.

[0128] SOD1^{G93A} 마우스에서는 WT 마우스와 비교해서 평균 체중이 약 1 g 적고, 전지 근력이 평균 약 0.1 N 낮아, 유의하게 저치(低値)였다. 이 점에서, SOD1^{G93A} 마우스는 10 주령의 시점에서 이미 근력이 저하되어, ALS 를 발증하는 것을 확인했다.

표 1

	WT 마우스	SOD1 ^{G93A} 마우스
체중 (g)	25.2 ± 0.7 (18)	24.1 ± 0.7 (10)
전지 근력 (N)	1.04 ± 0.04 (18)	0.91 ± 0.04 (10)*

[0129] 수치는 평균치 ± SE (예 수)

[0130] * : P < 0.05. WT 마우스와의 비교 (Student 의 t 검정)

[0131] <실시예 2> 릴루졸의 SOD1^{G93A} 마우스에 대한 작용

[0132] 1. 재료 및 방법

[0133] 기존의 ALS 치료제인 릴루졸은, SOD1^{G93A} 마우스의 발증 전인 4 주령 및 7 주령부터 투여했을 때에, 연명 효과를 나타냈다고 보고되어 있다 (Amyotrophic Lateral Sclerosis (2009 년) 10 권, 85-94 페이지, Annals of Neurology (1996 년) 39 권, 147-157 페이지). 실시예 1 에서, SOD1^{G93A} 마우스가 10 주령에 있어서 ALS 증상인 근력 저하를 나타내는 것을 확인했다.

[0134] 본 실시예에서는, SOD1^{G93A} 마우스를 10 주령의 시점에서 용매 (생리 식염액) 군 및 릴루졸군의 2 군으로 나누어, 생리 식염액, 또는 릴루졸 (시그마·알드리치, 16 mg/kg) 을 사망할 때까지 복강 내에 1 일 1 회 투여하고, 각 개체의 생존 기간을 해석했다. 릴루졸의 용량은 선행 보고에 준하여 설정했다 (Amyotrophic Lateral Sclerosis (2009 년) 10 권, 85-94 페이지).

[0135] 2. 결과

[0136] 각 군의 평균 생존 기간을 표 2 에 나타낸다.

[0137] 용매군과 릴루졸군의 평균 생존 기간은 동일한 정도이며, 10 주령부터의 투여 조건에 있어서, 릴루졸의 연명 효과는 확인되지 않았다.

표 2

	용매군	릴루졸군
생존 기간 (일)	137 ± 3 (7)	134 ± 3 (6)

[0138] 수치는 평균치 ± SE (예 수)

[0139]

[0140]

[0141] <실시예 3> 인간 유래 그렐린 (이하, 인간 그렐린) 의 SOD1^{G93A} 마우스에 대한 작용 (1) : 지속 피하 투여 시의 골격근량, 근력 및 생존 기간에 대한 작용

[0142] 실시예 2 에서 SOD1^{G93A} 마우스의 10 주령부터 릴루졸을 투여해도 생존 기간의 연장 작용을 볼 수 없는 것을 확인했다. 이와 같이 SOD1^{G93A} 마우스가 이미 ALS 증상인 근력 저하를 나타내어, 릴루졸이 생존 기간에 대한 효과를 나타내지 않는 조건에 있어서, 인간 그렐린 (배열 번호 1) 의 작용에 대해 검토했다.

[0143] 1. 재료 및 방법

[0144] 실험에는 10 주령의 SOD1^{G93A} 마우스를 사용하여, 용매군 및 인간 그렐린군의 2 군을 형성했다. 인간 그렐린 (50 μ g/day, 약 2 mg/kg/day) 을 용매 (생리 식염액) 에 용해하여 투여액으로 했다. 투여액, 또는 생리 식염액을 충전한 침투압 펌프 (alzet (등록상표) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL1004, DURECT Corporation) 를 등부 피하에 매립하여 지속 피하 투여했다. 10 주령부터 투여를 개시하고, 생존하고 있던 개체에 대해 4 주간마다 침투압 펌프를 교환하고, 투여를 계속했다.

[0145] 체중 및 먹이 중량을 투여 개시 전 및 8 주간 투여 후에 측정하고, 체중 변화량 및 섭이량을 산출했다. 투여 8 주 후에 마우스 하반신의 골격근량을 X 선 CT (Latheta LCT-200, 히타치 아로카메디칼 주식회사) 를 사용하여 측정했다. 혈장 중 총 콜레스테롤 농도는 8 주간 투여 후에 꼬리 정맥에서 채취한 혈액에서 분리한 혈장을 사용하여, 콜레스테롤 E - 테스트 와코 (와코 준야쿠 공업 주식회사) 에 의해 측정했다. 전지 근력은 래트·마우스 간이 근력 측정기 ; 200 g 계 (오하라 의과 산업 주식회사) 를 사용하여 16 주째에 측정했다. 또, 각 개체의 생존 기간을 해석했다.

[0146] 2. 결과

[0147] 각 군의 8 주간 투여 후의 평균 체중 변화량, 섭이량, 및 하반신 골격근량을 표 3 에 나타낸다.

[0148] 인간 그렐린군에서는 용매군과 비교해서 8 주간 투여 후의 체중 변화량, 섭이량, 및 하반신 골격근량이 유의하게 증가했다.

표 3

	용매군	인간 그렐린군
체중 변화량 (g)	0.4 \pm 0.4 (15)	2.6 \pm 0.4 (15) ^{**}
섭이량 (g)	177.0 \pm 2.9 (15)	188.2 \pm 3.6 (15) [*]
하반신 골격근량 (g)	4.8 \pm 0.3 (15)	5.7 \pm 0.3 (15) [*]

[0149]

[0150] 수치는 평균치 \pm SE (예 수)

[0151] *, ** : P < 0.05, 0.01. 용매군과의 비교 (Student 의 t 검정)

[0152] 각 군의 8 주간 투여 후의 혈장 중 총 콜레스테롤 농도를 표 4 에 나타낸다.

[0153] 용매군과 인간 그렐린군의 사이에 차는 없었다.

표 4

	용매군	인간 그렐린군
혈장 중 총 콜레스테롤 농도 (mg/dL)	86.5 \pm 5.6 (15)	85.8 \pm 4.0 (15)

[0154]

[0155] 수치는 평균치 \pm SE (예 수)

[0156] 각 군의 6 주간 투여 후의 평균 전지 근력을 표 5 에 나타낸다.

[0157] 인간 그렐린군에서는 용매군에 비해 전지 근력이 유의하게 강했던 점에서, 근력의 저하가 억제된 것이 나타났다.

표 5

	용매군	인간 그렐린군
전지 근력 (N)	0.74 ± 0.05 (15)	0.96 ± 0.05 (15) **

수치는 평균치 ± SE (예 수)

** : P < 0.01. 용매군과의 비교 (Student 의 t 검정)

다음으로 각 군의 평균 생존 기간을 표 6 에 나타낸다.

인간 그렐린군에서는 용매군에 비해 생존 기간이 유의하게 연장되어, 평균 생존일수는 용매군과 비교해서 인간 그렐린군에서 13.8 % 길었다.

표 6

	용매군	인간 그렐린군
생존 기간 (일)	152 ± 5 (15)	173 ± 4 (15) **

수치는 평균치 ± SE (예 수)

** : P < 0.01. 용매군과의 비교 (로그랭크 검정)

이상의 결과로부터, SOD1^{G93A} 마우스가 이미 근력 저하를 나타내고, 릴루졸이 생존 기간에 대해 작용을 나타내지 않는 10 주령부터 인간 그렐린을 지속 피하 투여했을 때, 용매군에 비해 체중 및 섭이량이 증가하고, 혈장 중 총 콜레스테롤 농도에 영향을 미치지 않았지만, 전지 근력의 저하를 억제하고, 생존 기간을 연장시키는 것이 분명해졌다. 이 점에서, 기존의 ALS 치료제인 릴루졸이 유효성을 나타내지 않는 조건에 있어서도, 인간 그렐린이 ALS 증상의 진전을 억제하는 것이 판명되었다.

<실시에 4> 인간 그렐린의 SOD1^{G93A} 마우스에 대한 작용 (2) : 지속 피하 투여 시의 운동 신경 세포 보호 작용

실시에 3 에서 SOD1^{G93A} 마우스에 대해 10 주령부터 인간 그렐린을 투여함으로써 전지 근력의 저하를 억제하고, 생존 기간을 연장시키는 것을 확인했다. ALS 는 운동 신경 세포가 사멸함으로써 근육이 위축되고, 최종적으로는 죽음에 이르는 질환이므로, 인간 그렐린이 운동 신경 세포 보호 작용을 갖는지에 대해서 검토했다.

1. 재료 및 방법

실험에는 10 주령의 SOD1^{G93A} 마우스 및 WT 마우스를 사용했다. SOD1^{G93A} 마우스를 용매군 및 인간 그렐린군의 2 군으로 나누고, 용매를 투여한 WT 마우스를 Control 군으로 했다. 인간 그렐린 (50 µg/day, 약 2 mg/kg/day) 을 용매 (생리 식염액) 에 용해하여 투여액으로 했다. 투여액, 또는 생리 식염액을 충전한 침투압 펌프 (alzet (등록상표) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL1004, DURECT Corporation) 를 등부 피하에 매립하여 지속 피하 투여했다. 10 주령부터 투여를 개시하고, 4 주 후에 침투압 펌프를 교환하여 투여를 계속했다. 투여 개시부터 7 주간 후에 해부하고, T9 영역의 척수를 적출했다. 넷슬 염색 절편을 제작하여, 조직학적으로 운동 신경 세포수를 동정했다. 각 개체당 인접하지 않은 3 매의 절편을 사용하여, 전각에 존재하는 운동 신경 세포수를 계측했다. 측정치는 Control 군의 운동 신경 세포수의 평균치를 100 % 로 했을 때의 상대치로서 산출했다.

2. 결과

Control 군과 비교했을 때의 각 군의 운동 신경 세포수 상대치를 표 7 에 나타낸다.

용매군에서는 Control 군과 비교해서 운동 신경 세포수가 약 1/2 로 유의하게 적었다. 한편, 인간 그렐린군에서는 용매군과 비교해서 운동 신경 세포수가 유의하게 많았다.

표 7

	Control 군	용매군	인간 그렐린군
마우스 유전자형	WT	SOD1 ^{G93A}	SOD1 ^{G93A}
피험물질	용매	용매	인간 그렐린
운동 신경 세포수 (%)	100 ± 4 (9)	51 ± 3 (8) **	84 ± 7 (7) *, **

수치는 평균치 ± SE (예 수)

*, ** : P < 0.05, 0.01. Control 군과의 비교 (Dunnett 의 다중 비교 검정)

: P < 0.01 ; 용매군과의 비교 (Student 의 t 검정)

이상의 결과로부터, SOD1^{G93A} 마우스에 있어서, 인간 그렐린 투여에 의해 운동 신경 세포수의 감소가 억제되는 것, 즉, 운동 신경 세포가 보호되는 것이 나타났다.

<실시예 5> 인간 그렐린의 SOD1^{G93A} 마우스에 대한 작용 (3) : 반복 피하 투여 시의 근력 및 생존 기간에 대한 작용

실시예 3 및 실시예 4 에서 SOD1^{G93A} 마우스에 대해 10 주령부터 인간 그렐린을 지속 피하 투여함으로써, 전지 근력의 저하가 억제되고, 생존 기간이 연장, 그리고 운동 신경 세포가 보호되는 것을 확인했다.

본 실시예에서는, 10 주령의 SOD1^{G93A} 마우스에 인간 그렐린을 반복 피하 투여했을 때의 전지 근력 및 생존 기간에 대한 작용을 검토했다.

1. 재료 및 방법

실험에는 10 주령의 SOD1^{G93A} 마우스를 사용하여, 용매군 및 인간 그렐린군의 2 군을 형성했다. 인간 그렐린 (1 mg/kg) 또는 용매 (5 % 만니톨 용액) 를 10 주령부터 사망할 때까지 피하에 1 일 2 회 투여했다. 체중 및 먹이 중량을 투여 개시 전 및 8 주간 투여 후에 측정하고, 체중 변화량 및 섭이량을 산출했다. 전지 근력은 래트·마우스 간이 근력 측정기 ; 200 g 계 (오하라 의과 산업 주식회사) 를 사용하여 투여 개시 전 및 8 주간 투여 후에 측정했다. 또, 각 개체의 생존 기간을 해석했다.

2. 결과

각 군의 8 주간 투여 후의 평균 체중 변화량 및 섭이량을 표 8 에 나타낸다.

인간 그렐린군에서는 용매군과 비교해서 8 주간 투여 후의 체중 변화량 및 섭이량이 유의하게 증가했다.

표 8

	용매군	인간 그렐린군
체중 변화량 (g)	0.1 ± 0.7 (12)	2.1 ± 0.4 (13) **
섭이량 (g)	160.8 ± 3.9 (12)	176.2 ± 3.5 (13) **

수치는 평균치 ± SE (예 수)

** : P < 0.01. 용매군과의 비교 (Student 의 t 검정)

각 군에 있어서의 10 주령부터 8 주간 투여 후의 전지 근력의 변화의 평균치를 표 9 에 나타낸다. 인간 그렐린군에서는 용매군과 비교해서 전지 근력의 저하가 유의하게 억제되었다.

표 9

	용매군	인간 그렐린군
전지 근력의 변화 (N)	-0.34 ± 0.05 (12)	-0.08 ± 0.07 (13) **

수치는 평균치 ± SE (예 수)

** : P < 0.01. 용매군과의 비교 (Student 의 t 검정)

다음으로 각 군의 평균 생존 기간을 표 10 에 나타낸다.

인간 그렐린군에서는 용매군과 비교해서 생존 기간이 유의하게 연장되어, 평균 생존일수는 용매군에 비해, 인간 그렐린군에서 21.8 % 길었다.

표 10

	용매군	인간 그렐린군
생존 기간 (일)	147 ± 5 (13)	179 ± 8 (13) **

수치는 평균치 ± SE (예 수)

** : P < 0.01 ; 용매군과의 비교 (로그랭크 검정)

이상의 결과로부터, 인간 그렐린의 반복 피하 투여가 지속 피하 투여 시와 마찬가지로 SOD1^{G93A} 마우스의 ALS 병태 진전을 억제하는 것이 나타났다. 이 점에서, 인간 그렐린을 반복 피하 투여함으로써 인간 ALS 환자의 병태 진전을 억제하여, 치료 효과를 나타낼 가능성이 나타났다.

<실시예 6> 인간 그렐린의 SOD1^{G93A} 마우스에 대한 작용 (4) : 제한 급이하에서의 체중, 골격근량, 근력 및 운동 신경 세포수에 대한 작용

실시예 3 및 실시예 5 에서 SOD1^{G93A} 마우스에 대해 10 주령부터 인간 그렐린을 지속 피하 투여 또는 반복 투여함으로써, 전지 근력의 저하가 억제되고, 생존 기간이 연장되는 것을 나타냈다. 또, 실시예 4 에서 그렐린을 SOD1^{G93A} 마우스에 지속 피하 투여하면 운동 신경 세포가 보호되는 것을 확인했다.

본 실시예에서는 SOD1^{G93A} 마우스의 자유 섭이 조건하에서의 1 일 섭이량의 약 90 % 로 한 제한 급이하에서 SOD1^{G93A} 마우스를 사육하고, 그 이상 섭이할 수 없는, 즉, 그렐린의 섭식 항진 작용이 발현되지 않는 조건에서 인간 그렐린을 지속 피하 투여했을 때의, 체중, 골격근량, 근력, 운동 신경 세포수, 그리고 골격근 위축에 관련되는 Atrogin1 및 Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) 의 mRNA 발현에 대한 작용을 검토했다.

1. 재료 및 방법

실험에는 10 주령의 SOD1^{G93A} 마우스 및 WT 마우스를 사용했다. WT 마우스를 2 군으로 나누고, 1 군은 자유 섭이 조건에서 사육하고 (WT-Control 군), 다른 1 군은 SOD1^{G93A} 마우스의 자유 섭이 조건하에서의 1 일 섭이량의 약 90 % 인 2.8 ~ 2.9 g 의 먹이를 매일 섭취시켰다 (WT-제한 급이군). SOD1^{G93A} 마우스는 용매군 및 인간 그렐린군의 2 군으로 나누고, 모두 1 일당 2.8 ~ 2.9 g 의 먹이를 주는 제한 급이 조건에서 사육했다 (G93A-용매군, 및 G93A-인간 그렐린군).

인간 그렐린 (50 µg/day, 약 2 mg/kg/day) 을 용매 (생리 식염액) 에 용해하여 투여액으로 했다. 투여액 또는 생리 식염액을 충전한 침투압 펌프 (alzet (등록상표) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL1004, DURECT Corporation) 를 등부 피하에 매립하여 지속 피하 투여했다. 10 주령부터 투여를 개시하고, 4 주 후에 침투압 펌프를 교환했다.

- [0206] 투여 개시일 및 6 주간 후에 체중을 측정하여, 체중 변화량을 산출했다.
- [0207] 전지 근력은 래트·마우스 간이 근력 측정기 ; 200 g 계 (오하라 의과 산업 주식회사) 를 사용하여 투여 개시 7 주간 후에 측정했다.
- [0208] 또, 투여 개시 전 (10 주령) 및 7 주 후에 마우스 하반신의 골격근량을 X 선 CT (Latheta LCT-200, 히타치 아로 카메디칼 주식회사) 를 사용하여 측정하고, 골격근량의 변화량을 구했다.
- [0209] 그 후, 마우스를 해부하여, T9 영역의 척수를 적출했다. 닛슬 염색 절편을 제작하고, 조직학적으로 운동 신경 세포수를 동정했다. 각 개체당 인접하지 않은 3 매의 절편을 사용하여, 전각에 존재하는 운동 신경 세포수를 측정했다. 측정치는 WT-Control 군의 운동 신경 세포수의 평균치를 100 % 로 했을 때의 상대치로서 산출했다.
- [0210] 또한, 비복근을 적출하고, mRNA 를 추출 후 정량 PCR 법으로 Atrogin1 및 MuRF1 mRNA 발현량을 측정했다. 측정치는 WT-Control 군의 mRNA 발현량을 100 % 로 했을 때의 상대치로서 산출했다.
- [0211] 2. 결과
- [0212] 어느 군에 있어서도, 제한 급이한 마우스의 전례가 시험 기간 중 부여한 먹이를 모두 섭취했다. 이 점에서, 제한 급이시킨 WT-제한 급이군, G93A-용매군 및 G93A-인간 그렐린군의 섭취량은 동일한 것을 확인했다.
- [0213] 각 군의 마우스의 투여 개시 6 주 후의 체중 변화량, 및 투여 개시 7 주 후의 하반신 골격근량을 표 11 에 나타냈다.
- [0214] 자유 섭이시킨 WT-Control 군에서는 체중이 증가했지만, 제한 급이하면, WT 마우스에서도 $SOD1^{G93A}$ 마우스에서도 체중은 감소하고, 특히 제한 급이한 $SOD1^{G93A}$ 마우스에서 감소가 현저했다. $SOD1^{G93A}$ 마우스에 용매를 투여했을 때 (G93A-용매군) 와 비교해서, 인간 그렐린군 (G93A-인간 그렐린군) 에서는 그 체중 감소가 유의하게 작았다. 마찬가지로, 자유 섭이시킨 WT 마우스에서는 하반신 골격근량도 증가했지만, 제한 급이군에서는 감소했다. G93A-용매군과 비교해서, G93A-인간 그렐린군에서는 골격근의 감소가 유의하게 억제되었다. 이와 같이, 제한 급이에 의해 그렐린의 섭식 항진 작용이 발현되지 않는 조건하에도, 그렐린의 투여에 의해 $SOD1^{G93A}$ 마우스의 체중이나 골격근량의 감소가 억제되었다.

표 11

	체중 변화량 (g)	하반신 골격근 변화량 (g)
WT-Control 군 (9)	3.5 ± 1.1	0.3 ± 0.2
WT-제한 급이군 (8)	$-2.5 \pm 0.9^{**}$	$-1.3 \pm 0.1^{**}$
G93A-용매군 (13)	$-4.7 \pm 0.6^{**}$	$-1.6 \pm 0.2^{**}$
G93A-인간 그렐린군 (15)	$-1.4 \pm 0.7^{**}, ^{**}$	$-0.9 \pm 0.2^{**}, ^{*}$

- [0215]
- [0216] () : N 수, ** : $P < 0.01$; WT-Control 군과의 비교 (Dunnett 의 다중 비교 검정)
- [0217] #, ## : $P < 0.05, 0.01$; G93A-용매군과의 비교 (Student 의 t 검정)
- [0218] 투여 개시 7 주 후의 골격근에 있어서의 Atrogin1 및 MuRF1 의 mRNA 발현량을 표 12 에 나타냈다.
- [0219] WT 마우스에서는 제한 급이하에서 사육해도 이들의 유전자 발현에 큰 변동은 없었지만, 제한 급이하에서 용매를 투여한 $SOD1^{G93A}$ 마우스 (G93A-용매군) 에서는, 자유 섭이시킨 WT 마우스 (Control 군) 에 비해 양 유전자 발현이 유의하게 상승했다.
- [0220] 한편, 제한 급이하에서 인간 그렐린을 투여한 $SOD1^{G93A}$ 마우스 (G93A-그렐린군) 에서는, Atrogin1 및 MuRF1 mRNA 의 발현이 용매군에 비해 유의하게 낮았던 점에서, 인간 그렐린군에서는 골격근 위축이 억제된 것이 시사되었다. 이것은, 표 11 에서 골격근량의 감소가 인간 그렐린군에서 적었던 것과 일치한다.

표 12

	Atrogin 1 mRNA 발현량 (%)	MuRF1 mRNA 발현량 (%)
WT-Control 군 (9)	100 ± 11	100 ± 8
WT-제한 급이군 (8)	113 ± 19	142 ± 24
G93A-용매군 (13)	528 ± 143**	613 ± 196*
G93A-인간 그렐린군 (15)	205 ± 34**	207 ± 36**

() : N 수, *,** : P < 0.05, 0.01 ; WT-Control 군과의 비교 (Dunnett 의 다중 비교 검정) ## : P < 0.01 ; G93A-용매군과의 비교 (Student 의 t 검정)

이와 같이, 인간 그렐린은 제한 급이하에 있어서도 SOD1^{G93A} 마우스의 골격근 위축을 억제했다.

다음으로, 본 조건에서의 마우스의 전지 근력 및 척수 운동 신경 세포수를 표 13 에 나타냈다.

WT 마우스에 있어서는, 제한 급이하에서 사육해도 전지 근력이나 운동 신경 세포수는 자유 섭이군과 동일한 정도였다. 제한 급이한 SOD1^{G93A} 마우스에서는, 자유 섭이하의 WT-Control 군에 비해 전지 근력이나 운동 신경 세포수가 유의하게 저하되고, 인간 그렐린 투여군에서도 동일했다. 이와 같이, 인간 그렐린은 제한 급이하에서는, 운동 신경 세포사나 전지 근력의 저하를 억제하지 않았다.

표 13

	운동 신경 세포수 (%)	전지 근력 (N)
WT-Control 군 (9)	100 ± 11	1.02 ± 0.05
WT-제한 급이군 (8)	93 ± 10	0.99 ± 0.07
G93A-용매군 (13)	63 ± 4**	0.74 ± 0.06**
G93A-인간 그렐린군 (15)	66 ± 5**	0.77 ± 0.06**

() : N 수, ** : P < 0.01 ; WT-Control 군과의 비교 (Dunnett 의 다중 비교 검정)

이들의 점에서, 그렐린은 제한 급이하에 있어서도, 그 섭식 항진 작용과 독립된 작용에 의해, SOD1^{G93A} 마우스의 체중 감소나 골격근 위축을 억제했다.

한편, 운동 신경 세포사나 근력의 저하를 억제하기 위해서는, 그렐린이 섭식 항진을 실현하는 것, 바꾸어 말하면, 그렐린 투여에 의해 섭식량이 증가할 수 있는 개체에 투여할 필요가 있는 것이 나타났다. 즉, 그렐린은 섭식 항진 작용에 의해 전신의 에너지 상태를 개선함으로써 간접적으로 운동 신경 세포사를 억제하여, ALS 병태의 진전을 억제하는 것을 알 수 있었다.

<실시예 7> 16 주령의 SOD1^{G93A} 마우스와 WT 마우스의 체중 및 전지 근력의 비교

실시예 3, 4 및 5 에서, 인간 그렐린은 SOD1^{G93A} 마우스가 이미 전지 근력 저하를 나타낸 10 주령부터의 투여로, 섭이량이나 체중을 증가시켜, 운동 신경 세포사나 근력의 저하를 억제하고, 생존 기간을 연장시키는 것을 나타냈다.

임상에서는, 환자가 ALS 를 발증 후, 임상가에 의한 확정 진단이 이루어져 비로소 치료가 개시된다. ALS 의 확정 진단에는 만년 내지 1 년 이상을 필요로 하므로 (ALS 치료 가이드 라인 2002, 닛폰 신경학회 치료 가이드 라인), 치료 개시까지 증상이 진전된다고 생각된다.

그래서, 인간 그렐린을 SOD1^{G93A} 마우스의 ALS 병태가 보다 진전된 시기로부터 투여했을 때의 효과를 검토하기로 했다. 그를 위해서, 본 실시예에서는 16 주령의 SOD1^{G93A} 마우스의 체중 및 전지 근력을 WT 마우스와 비교했다.

1. 재료 및 방법

실험에는 16 주령의 WT 마우스 및 SOD1^{G93A} 마우스를 사용하여, 체중 및 전지 근력을 측정했다. 전지 근력은 래트·마우스 간이 근력 측정기 ; 200 g 계 (오하라 의과 산업 주식회사) 를 사용하여 측정했다.

2. 결과

각 군의 체중 및 전지 근력을 표 14 에 나타낸다.

SOD1^{G93A} 마우스에서는 WT 마우스와 비교해서 평균 체중이 2 g 이상 적고, 전지 근력은 평균 약 0.5 N 저치를 나타내고, 이들의 WT 마우스와의 차는 10 주령 시 (표 1) 에 비해 보다 현저했다. 또, 16 주령의 SOD1^{G93A} 마우스의 전지 근력은 10 주령일 때 (0.91 N) 와 비교해서 저치였다 (표 1).

표 14

	WT 마우스	SOD1 ^{G93A} 마우스
체중 (g)	28.0 ± 0.5 (5)	25.3 ± 0.9 (8) *
전지 근력	1.21 ± 0.06 (5)	0.68 ± 0.06 (8) **

수치는 평균치 ± SE (예 수)

*, ** : P < 0.05, P < 0.01. WT 마우스와의 비교 (Student 의 t 검정)

이와 같이, 16 주령의 SOD1^{G93A} 마우스는 동주령의 WT 마우스나 10 주령의 SOD1^{G93A} 마우스 (표 1) 와 비교해서 전지 근력이 낮았던 점에서, ALS 병태가 보다 진전된 상태인 것을 확인했다.

<실시예 8> 인간 그렐린의 SOD1^{G93A} 마우스에 대한 작용 (5) : 16 주령부터 지속 피하 투여했을 때의 생존 기간에 대한 작용

본 실시예에서는, 근력 저하가 현저하여 ALS 병태가 보다 진전된 16 주령의 SOD1^{G93A} 마우스에 대한 인간 그렐린의 ALS 병태 진전 억제 작용을, 생존 기간을 지표로 검토했다.

1. 재료 및 방법

실험에는 16 주령의 SOD1^{G93A} 마우스를 사용하여, 용매군 및 인간 그렐린군의 2 군을 형성했다. 인간 그렐린 (50 µg/day, 약 2 mg/kg/day) 을 용매 (생리 식염액) 에 용해하여 투여액으로 했다. 투여액 또는 생리 식염액을 충전한 침투압 펌프 (alzet (등록상표) MINI-OSMOTIC PUMP MODEL1004, DURECT Corporation) 를 등부 피하에 매립하여 지속 피하 투여했다. 16 주령부터 투여를 개시하고, 생존하고 있던 개체에는 4 주간마다 침투압 펌프를 교환하고, 투여를 계속했다. 각 개체의 생존 기간을 해석했다.

2. 결과

각 군의 평균 생존 기간을 표 15 에 나타낸다.

인간 그렐린군에서는 용매군과 비교해서 생존 기간이 유의하게 연장되어, 평균 생존일수는 용매군에 비해 인간 그렐린군에서 17.6 % 길었다.

표 15

	용매군	인간 그렐린군
생존 기간 (일)	153 ± 7 (9)	180 ± 11 (9) *

수치는 평균치 ± SE (예 수)

* : P < 0.05. 용매군과의 비교 (로그랭크 검정)

이와 같이, SOD1^{G93A} 마우스에 있어서 근력 저하가 현저하여 ALS 병태가 보다 진전된 16 주령부터 투여를 개시한 경우에도, 인간 그렐린은 용매군에 비해 유의하게 생존 기간을 연장시켰다.

실시에 2 에서 나타낸 바와 같이, 기존의 ALS 치료제인 릴루졸은 10 주령부터의 투여에서도 생존 기간을 연장시키지 않았다. 즉, 기존의 ALS 치료제와 비교해서, 그렐린은 SOD1^{G93A} 마우스의 16 주령부터 투여한 경우에도, 생존 기간을 유의하게 연장시킨다는 현저한 효과를 나타내는 것이 판명되었다.

이 점에서, 그렐린이 ALS 병태 진전을 현저하게 억제하여, 치료 효과를 갖는 것이 나타났다.

<실시에 9> 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약인 GHRP-6 및 아나모렐린의 SOD1^{G93A} 마우스에 대한 작용 : 반복 피하 투여 시의 생존 기간에 대한 작용

실시에 5 에서 SOD1^{G93A} 마우스에 대해 10 주령부터 인간 그렐린을 반복 피하 투여함으로써, 생존 기간이 연장되는 것을 확인했다.

본 실시예에서는, 10 주령의 SOD1^{G93A} 마우스에 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약인 GHRP-6 및 아나모렐린을 반복 피하 투여했을 때의 생존 기간에 대한 작용을 검토했다.

1. 재료 및 방법

실험에는 10 주령의 SOD1^{G93A} 마우스를 사용하여, 용매군, GHRP-6 군 및 아나모렐린군의 3 군을 형성했다. GHRP-6 (1 mg/kg), 아나모렐린 (1 mg/kg) 또는 용매 (5 % 만니톨 용액) 를 10 주령부터 사망할 때까지 피하에 1 일 2 회 투여했다. 체중 및 먹이 중량을 투여 개시 전 및 5 주간 투여 후에 측정하여, 체중 변화량 및 섭이량을 산출했다. 또, 각 개체의 생존 기간을 해석했다.

2. 결과

각 군의 5 주간 투여 후의 평균 체중 변화량 및 섭이량을 표 16 에 나타낸다.

GHRP-6 군에서는 용매군과 비교해서 5 주간 투여 후의 체중 변화량 및 섭이량이 유의하게 증가했다. 또, 아나모렐린군에서는 용매군과 비교해서 5 주간 투여 후의 체중 변화량이 유의하게 증가하고, 섭이량이 증가 경향을 나타냈다.

표 16

	용매군	GHRP-6 군	아나모렐린군
체중 변화량 (g)	0.0 ± 0.4 (31)	1.9 ± 0.2 (30) **	0.9 ± 0.2 (31) *
섭이량 (g)	132.0 ± 2.6 (31)	142.7 ± 2.1 (30) **	139.5 ± 2.5 (31) *

수치는 평균치 ± SE (예 수)

†, *, ** : P < 0.1, P < 0.05, P < 0.01. 용매군과의 비교 (Dunnet 의 다중 비교 검정)

다음으로 각 군의 평균 생존 기간을 표 17 에 나타낸다.

GHRP-6 군 및 아나모렐린군에서는 용매군과 비교해서 생존 기간이 유의하게 연장되었다.

표 17

	용매군	GHRP-6 군	아나모렐린군
생존 기간 (일)	130 ± 2 (31)	138 ± 2 (30) *	136 ± 2 (31) *

수치는 평균치 ± SE (예 수)

* : P < 0.05 ; 용매군과의 비교 (윌콕슨 검정)

이상의 결과로부터, 성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약인 GHRP-6 및 아나모렐린의 반복 피하 투여가 인

간 그렐린과 마찬가지로 SOD1^{G93A} 마우스의 ALS 병태 진전을 억제하는 것이 나타났다.

[0273]

산업상 이용가능성

[0274]

성장 호르몬 분비 촉진 인자 수용체 작용약 또는 그 약학적으로 허용되는 염을 함유하는 의약 조성물은 연하 장애가 증독이 아닌 근위축성 측삭 경화증에 이환하고 있는 개체에 대해 근위축성 측삭 경화증 치료제가 될 수 있다.

[0275]

배열표 프리텍스트

[0276]

배열 번호 1-인간 그렐린의 아미노산 배열

[0277]

배열 번호 2-인간 그렐린 (스플라이스 배리언트, 아미노산 27 개) 의 아미노산 배열

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Daiichi Sankyo Company, Limited

<120> A therapeutic agent for amyotrophic lateral sclerosis

<130> DSPCT-FP1341

<150>?JP 2012-234300

<151>?2012-10-24

<160> 2

<210> 1

<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> 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

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

20 25

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(27)

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

<400> 2

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu

1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25