



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0118264
 (43) 공개일자 2016년10월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A61K 31/573* (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 31/573 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7021444
- (22) 출원일자(국제) 2015년02월26일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년08월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2015/055650
- (87) 국제공개번호 WO 2015/129812
 국제공개일자 2015년09월03일
- (30) 우선권주장
 JP-P-2014-036780 2014년02월27일 일본(JP)

- (71) 출원인
다이이찌 산쿄 가부시키가이샤
 일본 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 혼쵸 3-5-1
- (72) 발명자
모로즈미 나오미
 일본 효고켄 고베시 주오쿠 미나토지마미나미마치 6쵸메 4방 3고 아스비오파마 가부시키가이샤 나이
- (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애에 대한 의약**

(57) 요약

성장기에 있어서의 스테로이드의 투여에 의해서 유발되는 성장 장애를 경감 및/또는 개선하기 위한 의약으로서, 적어도 한 종류의 나트륨 이노 펩티드 수용체 B(NPR-B) 아고니스트를 유효 성분으로서 함유하는 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애의 경감 및/또는 개선제 등을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/08 (2013.01)

A61K 38/10 (2013.01)

A61K 38/1709 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 47/48215 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

스테로이드제의 지속적인 투여가 필요한 성장기의 개체에 대해서 투여되는 것을 특징으로 하고, 적어도 한 종류의 나트륨 이노 펩티드 수용체 B(NPR-B) 아고니스트를 유효 성분으로서 함유하는, 스테로이드제 투여에 의해서 유발되는 성장 장애를 경감 및/또는 개선하기 위한 의약.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

NPR-B 아고니스트가, C 형 나트륨 이노 펩티드 (CNP), 그 활성 단편, 그것들의 변이체, 그것들의 유도체 또는 그것들의 수식체, 혹은, 항 NPR-B 항체인 의약.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

NPR-B 아고니스트가, hCNP-22 (배열 번호 1), hCNP6-22 (배열 번호 1 의 아미노산 번호 6 내지 22) 또는 hCNP-53 (배열 번호 2), 그것들의 변이체, 그것들의 유도체 또는 그것들의 수식체인 것을 특징으로 하는 의약.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

NPR-B 아고니스트가, hCNP-22 또는 hCNP6-22 의 유도체 또는 수식체인 것을 특징으로 하는 의약.

청구항 5

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

유도체가, 면역 글로블린 Fc 부 유래의 펩티드, 혈청 알부민 및 그렐린의 C 말단측 부분 펩티드에서 선택되는 적어도 하나의 부가 펩티드가, hCNP-22 또는 hCNP6-22 의 N 말단, C 말단 또는 그 양방에 결합된 펩티드인 것을 특징으로 하는 의약.

청구항 6

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

유도체가, 배열 번호 6 내지 15 에서 선택되는 어느 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드인 것을 특징으로 하는 의약.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

유도체가, 배열 번호 8, 13 또는 15 의 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드인 것을 특징으로 하는 의약.

청구항 8

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

수식체가, PEG 또는 그 유연 물질 친수성 폴리머가, hCNP-22, hCNP6-22, 또는 hCNP-53 의 N 말단, C 말단 또는 그 양방에 결합된 것인 것을 특징으로 하는 의약.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

스테로이드제 요법의 개시시 또는 기간 중에 투여되어, 성장 장애를 경감 및/또는 개선하는 것을 특징으로 하는

의약.

청구항 10

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

스테로이드제 요법의 기간 중 또는 종료 후에 있어서, 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애에 의해서 발생된 저신장증의 치료를 위해서 투여되는 것을 특징으로 하는 의약.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 C 형 나트륨 이노 펩티드 (CNP) 또는 CNP 유도체로 대표되는 나트륨 이노 펩티드 수용체 B(NPR-B) 아고니스트를 유효 성분으로서 함유하는 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애를 경감 및/또는 개선하는 의약에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 「스테로이드제」란, 스테로이드 호르몬 혹은 그 개변형의 화학 합성품을 배합한 약품을 나타내는 총칭으로서, 대개의 경우에는 당질 코르티코이드 또는 그 개변형인 화학 합성품을 배합한 의약품을 의미한다. 스테로이드제에는, 항염증 작용, 면역 억제 작용, 림프구 장애 작용, 혈관 수축 작용, 기관지 확장 작용 등의 약리 작용이 있어, 다양한 병에 대해서 극적으로 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 한편으로, 스테로이드제에 의한 치료에는 중대한 부작용의 발현 리스크가 보고되어 있고, 대표적인 것으로는, 과잉 면역 억제 작용에 의한 감염증의 발증 또는 악화, 쿠싱 증후군, 부신 피질 기능 부전, 당뇨병, 골조송증 및 소화성 궤양 등이 알려져 있다 (비특허문헌 1, 비특허문헌 2 등). 또한, 진술한 바와 같은 스테로이드제 치료에 의한 부작용의 발현을 무서워한 나머지, 의사의 지시대로의 사용을 게을리한 경우에는, 치료 대상이 되는 원질환의 병상을 악화(리바운드) 시킬 뿐만 아니라, 구토, 두통, 권태감, 혈압 저하 등의 이른바 「스테로이드 이탈 증후군」을 발증시킬 위험성이 지적되고 있다 (비특허문헌 3).

[0003] 소아에 있어서는, 그것들에 더하여 스테로이드제의 장기 사용에 의한 성장 장애의 발생 리스크가 수반된다. 소아에 있어서 장기간에 걸쳐서 스테로이드제에 의한 치료를 행하면, 체내에서 과잉이 된 당질 코르티코이드류에 의해서, 성장 호르몬 (GROWTH HORMONE) 이나 인슐린형 성장 인자 (IGF-1) 의 생성 및 분비가 방해되거나, 이들 호르몬에 대한 감수성도 저하되거나 한다. 그 결과, 소아의 정상적인 발육이 억제된 상태, 이른바 「성장 장애」를 일으켜, 동일 연령 아동의 표준 성장 곡선과 비교하여 유의하게 키가 작은 상태, 이른바 「저신장증」으로 진단되기에 이를 가능성이 있다 (비특허문헌 4). 소아에 있어서 비교적 장기간에 걸쳐서 스테로이드제에 의한 치료가 필요해지는 질환에는, 천식, 아토피성 피부염, 전신성 홍반 루푸스, 류머티즘열, 약년성 특발성 관절염, 궤양성 대장염, 크론병, 중증 근무력증, 길랑-바레 증후군, 폐 혈철증, 소아 IgA 신증, 특발성 혈소판 감소성 자반병, 자기 면역성 용혈성 빈혈, 재생 불량성 빈혈, 급성 림프성 백혈병, 선천성 부신 과형성 등이 있다. 이것들의 적어도 일부는, 스테로이드제에 의한 치료를 중지하기가 어렵고, 중증화된 경우에는 죽음에 이를 가능성도 상정되는 중독한 질환이다. 그 때문에, 목적으로 하는 효과가 충분히 얻어지는 범위 내에서 스테로이드제를 계속 사용하면서, 그리고 또한, 여러 가지 부작용의 발현을 최소한으로 억제할 것이 요구된다.

[0004] 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애는, 그 후의 투약을 중지하거나 감량하거나 함으로써, 적어도 일부는 회복되지만(비특허문헌 5), 그 한편으로, 소아의 성장 기간은 한정되어 있고, 사춘기를 맞아 골단(骨端)의 성장판이 폐쇄되어 버리면, 스테로이드제의 사용 유무에 관계없이, 이미 그 이상의 성장은 기대할 수 없다. 그 때문에, 소아기에 생명에 관련되는 중독한 질환 때문에, 스테로이드제에 의한 계속적인 치료가 필요하고, 장기간에 걸쳐서 투약 중지나 투여량의 감량이 불가능한 대상에서는, 생애에 걸쳐서 충분한 성장을 기대할 수 없어 저신장증이 될 가능성이 발생된다.

[0005] 이상으로부터, 스테로이드제에 의한 치료를 필요로 하는 소아에 있어서, 스테로이드제의 치료 효과를 감약(減弱) 시키거나 성장 장애 이외의 부작용을 악화시키지 않고, 스테로이드제 치료에 의해서 발생하는 성장 장애를 경감 및/또는 개선할 수 있는 약제, 혹은, 스테로이드제의 치료에 의해서 저신장을 초래한 소아의 성장을 촉진하고, 저신장증을 치료할 수 있는 약제가 있으면, 대상의 생애에 걸친 QOL 향상을 기대할 수 있다. 또한, 성장 장애의 리스크가 경감됨으로써, 원질환에 대해서 충분한 양의 스테로이드제에 의한 치료를 할 수 있게 되

고, 결과적으로 원질환에 대한 치료 성적의 향상으로 이어질 것으로 기대된다.

[0006] 현재, 일부의 질환에서 기인되는 저신장증의 치료약으로서 GROWTH HORMONE 이나 IGF-1 등이 사용되고 있는데, 이들 약제는 매우 고가임과 함께, 여러 가지 부작용의 발현이 우려된다 (비특허문헌 6). 그 때문에, 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애에 대해서 예방적으로 혹은 치료적으로 투여하는 것은 리스크와 이점의 관점에서 권장되고 있지 않다.

[0007] C형 나트륨 이뇨 펩티드 (C-Type Natriuretic Peptide : 이후, CNP 로 기재한다) 는, 구아닐레이트사이클라아제를 함유하는 나트륨 이뇨 펩티드 수용체 B (Natriuretic Peptide Receptor-B, 약칭 : NPR-B, 별칭 : GC-B) 에 특이적으로 결합하여, 구아닐레이트사이클라아제를 활성화시켜, 세포 내 cGMP 레벨을 조정함으로써, 여러 가지 생리 활성을 발현하는 NPR-B 의 아고니스트이다. CNP 는, 연골 세포에 작용하여 골 성장에 있어서 중요한 역할을 담당한다 (비특허문헌 7, 비특허문헌 8 등). 간장 특이적 CNP 트랜스제닉 마우스, 혹은 정상 마우스에 대한 CNP-22 의 지속 정맥 내 투여에 의해서 골 신장이 촉진된다 (비특허문헌 9, 비특허문헌 10). 또, 초기의 기초적인 연구에서는, 연골 조직 이외에도 골아세포에 있어서의 발현이나 골 흡수에 대한 작용이 보고되어 있다 (비특허문헌 11, 비특허문헌 12). 성장판의 조직 화학적 해석에 의해서, CNP 트랜스제닉 마우스에서는, 1) 증식 연골 세포층 및 비대 연골 세포층의 신장에 의해서 성장판이 두꺼워지고, 2) 증식 연골 세포층의 세포의 매트릭스가 증대되며, 3) 성숙 비대 연골 세포의 크기가 증대되는 것이 확인되어 있다. 동일 마우스의 성장판에 있는 비대 연골 세포층에 있어서, BrdU 염색에 의해서 나타내어지는 연골 세포의 증식에는 명확한 변화가 관찰되지 않은 점에서, CNP 는 성장판의 연골 세포의 분화 혹은 증식에 기여한다기보다는, 성장판의 각 분화 단계에 있어서의 연골 세포의 분화 형질의 발현을 촉진한다고 생각되고 있다 (비특허문헌 8). 또한, 저신장 및 사지 장관골 단축의 표현형을 나타내는 연골 무형성증 모델 마우스의 페노타이프가, 연골 특이적 CNP 트랜스제닉 마우스와의 교배에 의해서 레스큐되었다 (비특허문헌 8). 이 점에서, CNP 는 발생 또는 성장 과정에 있어서의 연골 형성 부전과 그에 수반되는 제증상을 개선하는 효과가 있다고 생각되고, 그 중에서도 연골 무형성증을 비롯한 저신장증의 치료약으로서의 임상 응용 가능성이 기대되고 있다 (비특허문헌 13).

[0008] 지금까지, 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애에 대한 CNP 의 유용성에 관해서는 명확하지는 않았다. 덧붙여, 스테로이드제가 CNP 의 생성, 분비 및 그 시그널 전달 경로에 어떠한 영향을 미치는지는 거의 해명되어 있지 않다. 지금까지 이루어진 보고로는, 내인성 CNP 의 분비 마커인 NTproCNP 의 혈장 중농도가, 급성 림프성 백혈병의 소아 (2 ~ 9 세) 에게 치료 목적으로 텍사메타손 혹은 프레드니솔론을 투여했을 때의 골 독성의 바이오 마커가 될 수 있는 것 (비특허문헌 14). 텍사메타손을 배양된 마우스의 연골 세포에 첨가하면, CNP 의 발현량이 증가되는 한편, 연골 세포수 및 GC-B 수용체의 발현량은 저하되는 것 (비특허문헌 15) 등의 보고가 있다. 그러나, 이 보고들은 모두 내인성 CNP 나 NTproCNP 농도가 스테로이드제에 의한 치료에 의해서 성장 장애가 발생된 것의 지표가 될 수 있는 것을 나타내고 있을 뿐이다. 원래 성장 장애의 지표가 될 수 있는 골 대사 마커는 이것들 이외에도, 골형 알칼리포스파타아제, 오스테오칼신, I형 콜라겐 N-프로펩티드 및 I형 콜라겐 C-프로펩티드 등이 복수 존재한다. 생리적·병리적 현상에 수반되는 유전자/단백질의 발현 변동이, 반드시 당해 유전자/단백질의 약리 효과를 시사하는 것은 아닌 것은 지금까지 수많은 분자에 있어서 확립된 대로이고, 이 보고들로부터 스테로이드제의 투여에 의해서 유발되는 성장 장애에 대한 의약으로서의 CNP 혹은 NPR-B 수용체 아고니스트의 유용성을 추정할 수 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Hanaoka BY 등 저, Rev Clin Immunol. (2012), 8 권, 8 호, 695-697 페이지
 (비특허문헌 0002) Curtis JR 등 저, Arthritis Rheum. (2006), 55 권, 3 호, 420-426 페이지
 (비특허문헌 0003) Bhattacharyya A 등 저, Eur J Endocrinol. (2005), 153 권, 2 호, 207-210 페이지
 (비특허문헌 0004) Allen DB 등 저, Endocrinol Metab Clin North Am. (1996), 25 권, 699-717 페이지
 (비특허문헌 0005) Allen DB 등 저, J Clin Endocrinol Metab. (1998 년), 83 권 8 호, 2824-2829 페이지
 (비특허문헌 0006) Bell J 등 저, J Clin Endocrinol Metab. (2010 년), 95 권, 1 호, 167-177 페이지
 (비특허문헌 0007) Chusho H 등 저, Proc Nat Acad Sci. (2001 년), 98 권, 7 호, 4016-4021 페이지

- (비특허문헌 0008) Yasoda A 등 저, Nat Med. (2004 년), 10 권, 1 호, 80-86 페이지
- (비특허문헌 0009) Kake T 등 저, Am J Physiol Endocrinol Metab. (2009 년), 297 권, 6 호, E1339-E1348 페이지
- (비특허문헌 0010) Yasoda A 등 저, Endocrinology (2009 년), 150 권, 7 호, 3138-3144 페이지
- (비특허문헌 0011) Suda M 등 저, Biochem Biophys Res Commun. (1996 년), 223 권, 1 호, 1-6 페이지
- (비특허문헌 0012) Holiday LS 등 저, J Biol Chem. (1995 년), 270 권, 32 호, 18983-18989 페이지
- (비특허문헌 0013) Yasoda A, 등 저, Endocr J. (2010 년), 57 권, 8호, 659-666 페이지
- (비특허문헌 0014) Prickett TC 등 저, Peptides (2012 년), 36 권, 1 호, 54-59 페이지
- (비특허문헌 0015) Agoston H 등 저, BMC Musculoskeletal Disorders. (2006 년), 7 권, 87-93 페이지

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은, 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애를 경감 및/또는 개선하는 의약, 및 스테로이드제 투여로 유발된 성장 장애에 의해서 발생된 저신장증을 치료하는 의약을 제공하는 것을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은, 래트에게 약효 용량의 스테로이드제를 지속 피하 투여함으로써, 인간에 있어서 보고되어 있는 것과 동일한 성장 장애가 발현되는 것을 확인하였다. 또한, 스테로이드제를 지속 피하 투여하여, 성장 장애를 일으킨 래트에게 CNP 유도체를 병용 투여함으로써, 스테로이드제에 의해서 발생된 성장 장애를 경감 및/또는 개선하는 것을 알아내었다. 스테로이드제에 의해서 발생된 성장 장애에 대한 CNP 유도체의 경감 효과는, 기존의 저신장 치료약인 성장 호르몬의 동량 투여보다 명확하게 강력한 것이었다. 또한, CNP 유도체의 성장 장애를 경감 및/또는 개선하는 작용이, 특정 스테로이드제에 의해서 유발되는 성장 장애에 한하여 확인되는 것이 아닌 것을 확인하였다. 또, 이미 스테로이드제 투여에 의해서 발생된 성장 장애를 CNP 유도체의 투여에 의해서 경감하여, 성장 장애에 의해서 발생된 저신장증도 치료할 수 있는 것을 확인하였다. 이들 지견에 기초하여 더욱 연구를 거듭하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0012] 본 발명은, 이하의 발명을 제공하는 것이다.

[0013] (1) 스테로이드제의 계속적인 투여가 필요한 성장기의 개체에 대해서 투여되는 것을 특징으로 하고, 적어도 일 종류의 나트륨 이노 펩티드 수용체 B(NPR-B) 아고니스트를 유효 성분으로서 함유하는, 스테로이드제 투여에 의해서 유발되는 성장 장애를 경감 및/또는 개선하기 위한 의약.

[0014] (2) NPR-B 아고니스트가, C 형 나트륨 이노 펩티드 (CNP), 그 활성 단편, 그것들의 변이체, 그것들의 유도체 또는 그것들의 수식체, 혹은, 항 NPR-B 항체인 (1) 의 의약.

[0015] (3) NPR-B 아고니스트가, hCNP-22 (배열 번호 1), hCNP6-22 (배열 번호 1 의 아미노산 번호 6 내지 22) 또는 hCNP-53 (배열 번호 2), 그것들의 변이체, 그것들의 유도체 또는 그것들의 수식체인 것을 특징으로 하는 (2) 의 의약.

[0016] (4) NPR-B 아고니스트가, hCNP-22 또는 hCNP6-22 의 유도체 또는 수식체인 것을 특징으로 하는 (2) 의 의약.

[0017] (5) 유도체가, 면역 글로블린 Fc 부 유래의 펩티드, 혈청 알부민 및 그렐린의 C 말단측 부분 펩티드에서 선택되는 적어도 하나의 부가 펩티드가, hCNP-22 또는 hCNP6-22 의 N 말단, C 말단 또는 그 양방에 결합된 펩티드인 것을 특징으로 하는 (2) ~ (4) 중 어느 하나의 의약.

[0018] (6) 유도체가, 배열 번호 6 내지 15 에서 선택되는 어느 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드인 것을 특징으로 하는 (2) ~ (5) 중 어느 하나의 의약.

[0019] (7) 유도체가, 배열 번호 8, 13 또는 15 의 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드인 것을 특징으로 하는 (6) 의

의약.

- [0020] (8) 수식체가, PEG 또는 그 유연 물질 친수성 폴리머가, hCNP-22, hCNP6-22, 또는 hCNP-53 의 N 말단, C 말단 또는 그 양방에 결합된 것인 것을 특징으로 하는 (2) ~ (4) 중 어느 하나의 의약.
- [0021] (9) 스테로이드제 요법의 개시시 또는 기간 중에 투여되어, 성장 장애를 경감 및/또는 개선하는 것을 특징으로 하는 (1) ~ (8) 중 어느 하나의 의약.
- [0022] (10) 스테로이드제 요법의 기간 중 또는 종료 후에 있어서, 스테로이드제 투여로 유발된 성장 장애에 의해서 발생한 저신장증의 치료를 위해서 투여하는 것을 특징으로 하는 (1) ~ (8) 중 어느 하나의 의약.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 NPR-B 아고니스트는, 스테로이드제의 투여로 유발되는 성장 장애를 경감 및/또는 개선하여, 당해 성장 장애의 결과 발생하는 저신장증을 치료한다. 또한, 종래의 스테로이드제 치료에 있어서, 당해 성장 장애의 발생 우려로부터 치료 효과가 얻어지는 충분한 용량, 또는, 기간에 있어서의 투여를 할 수 없었던 소아에 대해서, 스테로이드제 치료에 본 발명의 NPR-B 아고니스트를 조합함으로써, 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애를 경감 및/또는 개선함으로써, 스테로이드제에 의한 치료 효과가 충분히 얻어지는 용량 또는 투여 기간의 채용을 가능하게 하여, 원질환의 치료 성적을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1 은, 7 주령의 웅성 Cr1 : CD (SD) 래트에게 텍사메타손을 28 일간 지속 피하 투여했을 때의 체중 추이 (○ △◇ 는 평균치 ± 표준 편차, n = 4 ~ 5) 를 나타낸 그래프이다. 제 1 군 (○) 은 정상 대조군, 제 2 군 (△) 은 0.5 mg/ml 농도의 텍사메타손 용액을, 제 3 군 (◇) 은 1 mg/ml 농도의 텍사메타손 용액을 각각 0.25 μl/hr 의 속도로 28 일간 지속 피하 투여하였다. 정상 대조군 (제 1 군) 과의 사이에 유의차가 있었을 경우, p < 0.05 이면 「*」 를, p < 0.01 이면 「**」 을 각각 나타낸다.

도 2 는, 7 주령의 웅성 Cr1 : CD (SD) 래트에게 텍사메타손을 28 일간 지속 피하 투여 후에 대퇴골의 길이의 분포 (× 는 개별 데이터, ○△◇ 는 평균치 ± 표준 편차) 를 나타낸 그래프이다. 제 1 군 (○) 은 정상 대조군, 제 2 군 (△) 은 0.5 mg/ml 농도의 텍사메타손 용액을, 제 3 군 (◇) 은 1 mg/ml 농도의 텍사메타손 용액을 각각 0.25 μl/hr 의 속도로 28 일간 지속 피하 투여하였다. 「*」 를 붙인 데이터는, 정상 대조군과의 사이에 유의차가 있었던 (p < 0.05) 것을 나타낸다.

도 3 은, 4 주령의 웅성 Cr1 : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손의 0.67 mg/ml 용액을 0.25 μl/hr 의 속도로 28 일간 (그래프 아래의 흑색 바의 기간) 지속 피하 투여하고, 그리고 또한, 텍사메타손에 의한 명확한 성장 장애가 확인된 투여 개시 14 일째부터는 CNP 유도체 (A) 의 병용 지속 피하 투여를 개시하고, 28 일간 (그래프 아래의 회색 바의 기간) 계속했을 때의 체중 (도 3A), 체장 (도 3B) 및 꼬리 길이 (도 3C) 의 추이 (각 데이터는, 평균치 ± 표준 편차, n = 5) 를 나타낸 그래프이다. 제 1 군 (○) 은 정상 대조군, 제 2 군 (△) 은 텍사메타손 단독 투여군, 제 3 군 (▲) 은 텍사메타손과 CNP 유도체 (A) 를 병용 투여한 군이다. 텍사메타손의 투여는 28 일간 계속하고, CNP 유도체 (A) 는 15 mg/ml 용액을 0.25 μl/hr 의 속도로 텍사메타손 투여 개시 14 일째부터 28 일간 지속 피하 투여하였다.

도 4 는, 4 주령의 웅성 Cr1 : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손의 0.67 mg/ml 용액을 0.25 μl/hr 의 속도로 28 일간 지속 피하 투여하고, 그리고 또한, 텍사메타손에 의한 명확한 성장 장애가 확인된 투여 개시 14 일째부터는 CNP 유도체 (A) 의 병용 지속 피하 투여를 개시했을 때의 시험 종료시의 대퇴골 길이의 분포 (× 는 개별 데이터, ◇△▲ 는 평균치 ± 표준 편차) 를 나타낸 것이다. 제 1 군 (○) 은 정상 대조군, 제 2 군 (△) 은 텍사메타손 단독 투여군, 제 3 군 (▲) 은 텍사메타손과 CNP 유도체 (A) 를 병용 투여한 군이다. 텍사메타손의 투여는 28 일간 계속하고, CNP 유도체 (A) 는 15 mg/ml 용액을 0.25 μl/hr 의 속도로 텍사메타손 투여 개시 14 일째부터 28 일간 지속 피하 투여하였다. 「**」 을 붙인 데이터는, 대조군 (제 2 군) 과의 사이에 유의차가 있었던 (p < 0.01) 것을 나타낸다.

도 5 는, 4 주령의 웅성 Cr1 : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손의 0.67 mg/ml 용액을 0.25 μl/hr 의 속도로 28 일간 지속 피하 투여하고, 그리고 또한, 제 3 군에는 CNP 유도체 (A) 를, 제 4 군에는 인간형 성장 호르몬을 각각 1 일 1 회 28 일간 병용 반복 피하 투여했을 때의 시험 종료시의 대퇴골 골 단부의 성장판 조직상 (톨루이딘 블루 염색) 을 나타낸 것이다. 투여를 실시하지 않은 정상군을 제 1 군, 텍사메타손 단독 투여군을 제 2

군으로 하였다. 조직 이미지 중, 증식 연골층을 백색의 양 방향 화살표로, 비대화 연골층을 회색의 양 방향 화살표로 각각 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명에 대해서, 상세하게 설명한다.
- [0026] 본 발명은, 적어도 1 종류의 나트륨 이노 펩티드 수용체 B(NPR-B) 아고니스트를 유효 성분으로서 함유하고, 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애를 경감 및/또는 개선하는 의약 및 스테로이드제 투여로 유발된 성장 장애에 의해서 발생된 저신장증을 치료하는 의약에 관한 것이다.
- [0027] <NPR-B 아고니스트>
- [0028] 본 발명에 있어서, 「나트륨 이노 펩티드 수용체 B 아고니스트」란, B 형 나트륨 이노 펩티드 수용체 NPR-B (Natriuretic Peptide Receptor-B, 별칭 : Guanylate Cyclase B (GC-B), 이하, 간단히 「NPR-B」로 표기하는 경우도 있다) 에 결합되고, 그 구아닐레이트사이클라아제를 활성화하는 작용 (이하, 「NPR-B 아고니스트 활성화」) 을 갖는 물질을 의미하고, 본 명세서에서는 간단히 「NPR-B 아고니스트」로 표기되는 경우도 있다. 대표적인 NPR-B 아고니스트로는, 예를 들어 C 형 나트륨 이노 펩티드 (C-Type Natriuretic Peptide : CNP) 를 들 수 있다. 본 발명의 NPR-B 아고니스트는, NPR-B 아고니스트 활성을 갖는 물질이면 특별히 한정되지 않고, CNP, 그 활성화 단편 및 그것들의 변이체, 그것들의 유도체 그리고 그것들의 수식체 등을 사용할 수 있다. 또, CNP 와는 구조상의 공통성을 갖지 않는 펩티드나 저분자 화합물이어도, NPR-B 아고니스트 활성을 갖는 것이면 본 발명의 아고니스트에 포함된다.
- [0029] 본 발명에 있어서의 CNP 로는, 22 개의 아미노산으로 이루어지는 인간 유래 CNP-22 (hCNP-22 : GLSKGCFGLK LDRIGSMSGL GC : 배열 번호 1, 돼지 및 래트 등 포유류에서는 공통된 아미노산 배열을 갖는다), 인간 유래 CNP-53 (hCNP-53, 아미노산 배열 : DLRVDTKSRA AWARLLQHEP NARKYKGANK KGLSKGCFGL KLDRIIGMSG LGC : 배열 번호 2), 닭 유래 CNP-22 (GLSRSCFGVK LDRIGSMSGL GC : 배열 번호 3), 개구리 유래 CNP-22 (GYSRGCFGVK LDRIGAFSGL GC : 배열 번호 4) 등을 들 수 있다.
- [0030] 각종 CNP 에 있어서, 배열 중에 포함되는 2 개의 C 잔기 사이의 디설파이드 결합에 의해서 형성되는 링 구조 (예를 들어, hCNP-22 에서는, 배열 번호 1 의 6 위치 C 와 22 위치 C 사이에 디설파이드 결합하여 링 구조를 형성) 가 NPR-B 수용체에 대한 결합과 활성화 발현에 중요하다고 생각되고 있다 (Furuya M 등 저, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1992), 183 권, 3 호, 964-969 페이지, Silver MA 저, Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. (2006), 15 권, 14-21 페이지, Calderone A 저, Minerva Endocrinol. (2004), 29 권, 113-127 페이지). Furuya 등의 보고에 의하면, 링 구조만으로 이루어지는 펩티드인 CNP6-22 (배열 번호 1 의 아미노산 번호 6 내지 22 로 이루어지는 펩티드) 나 링 구조의 N 말단에 C 말단에 각각 ANP 의 링 구조의 N 말단측, C 말단측의 배열을 부가해도, hCNP-22 와 거의 동일한 정도의 NPR-B 아고니스트 활성을 나타내는 것, hCNP-22 의 9 위치 L 과 10 위치 K 에 변이를 갖는 펩티드에서는 활성이 감약되지만, 그 이외의 부위 (예를 들어, 16 위치 S, 17 위치 M) 에 변이를 갖는 펩티드나 ANP 의 10 내지 12 위치의 아미노산 배열을 대응하는 hCNP-22 의 배열인 L-K-L (배열 번호 1 의 9 위치 내지 11 위치) 로 치환한 펩티드는, hCNP-22 와 거의 동일한 정도의 NPR-B 아고니스트 활성을 나타내는 것 등이 보고되어 있다. 이 지견들로부터, NPR-B 아고니스트 활성화에 중요한 링 구조의 아미노산 배열은, CFGLKLDRIIG-Xaa1-Xaa2-SGLGC (여기서, Xaa1 은 S 또는 A, Xaa2 는 M, F 또는 E 를 나타낸다 : 배열 번호 5) 이고, 이 배열을 「링 구조 배열」이라고 한다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 생물 활성을 갖는 펩티드 또는 단백질의 「활성 단편」이란, 당해 펩티드 또는 단백질의 생물 활성에 관련되는 부위로 이루어지며, 또한, 당해 펩티드 또는 단백질이 갖는 생물 활성의 적어도 일부를 유지하는 것을 의미한다. 본 발명에 있어서의 CNP 의 활성화 단편으로서, 배열 번호 1 내지 4 의 어느 아미노산 배열의 적어도 일부의 아미노산 배열로 이루어지며, 또한, NPR-B 아고니스트 활성을 갖는 펩티드를 사용할 수 있다. 그러한 활성화 단편으로는, 상기 서술한 링 구조 배열 (배열 번호 5 의 아미노산 배열) 로 이루어지는 펩티드를 들 수 있고, 그 구체예로는, hCNP6-22, 배열 번호 1, 3 또는 4 의 아미노산 배열의 1 위치 내지 5 위치에 있어서, 1 위치를 포함하는 연속되는 아미노산이 일부 또는 전부 결손된 펩티드, 배열 번호 2 의 아미노산 배열의 1 위치 내지 31 위치에 있어서, 1 위치를 포함하는 연속되는 아미노산이 일부 또는 전부 결손된 펩티드 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 링 구조 배열을 갖고, NPR-B 아고니스트 활성을 갖는 것은 본 발명의 CNP 의 활성화 단편으로서 채용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 NPR-B 아고니스트로는, 상기 서술한 활성화 단편 그 자체를 채용할 수도 있고, 또, 활성화 단편의 N

말단, C 말단 또는 그 양방에 1 내지 복수의 아미노산이 부가된 펩티드 (활성 단편의 유도체) 여도, 원하는 아고니스트 활성을 유지하는 한 채용할 수 있다. 이와 같은 펩티드로는, hCNP6-22 의 N 말단, C 말단 및 그 양방에 ANP 의 C 말단, 및 N 말단에서 유래하는 배열을 부가한 펩티드 (Furuya M 등 저, Biochem. BioPhys. Res. Commun., (1992), 183 권, 3 호, 964-969 페이지) 등을 들 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 생물 활성을 갖는 펩티드 또는 단백질의 「변이체」란, 당해 펩티드 또는 단백질의 아미노산 배열의 1 개 지점 내지 수 개 지점에서, 1 개 내지 몇 개의 아미노산이 치환, 결손, 삽입 및/또는 부가 (이하, 「치환 등」이라고 한다) 된 것으로서, 또한, 당해 펩티드 또는 단백질이 갖는 생물 활성이 적어도 일부를 유지하는 것을 의미한다. 「수 개 지점」이란, 통상적으로 3 개 지점, 바람직하게는 2 개 지점이다. 「몇 개」란, 통상적으로 10 개, 바람직하게는 5 개, 보다 바람직하게는 3 개, 더욱 바람직하게는 2 개이다. 복수 지점에서 치환되거나 하는 경우에는, 치환, 결손, 삽입 및 부가의 어느 하나여도 되고, 둘 이상이 조합되어 있어도 된다. 또, 치환되거나 하는 아미노산은, 천연에 존재하는 아미노산이어도 되고, 그 아실화체 등의 수식물이어도 되고, 인공적으로 합성된 아미노산 유사체여도 된다. 또, 치환되거나 하는 부위는, 본래의 펩티드 또는 단백질의 활성의 일부가 유지되는 한, 어느 부위를 선택해도 되나, 당해 원 (元) 펩티드 또는 단백질의 활성 부위 또는 수용체 결합 부위 이외의 지점이 치환되거나 한 것이 바람직하다.

[0034] 예를 들어 CNP 의 변이체로는, NPR-B 아고니스트 활성이 유지되는 한, 원하는 부위에 있어서 치환되거나 한 것을 채용할 수 있지만, 바람직하게는 상기 서술한 링 구조 배열이 유지되고, 그 이외의 부위에서 치환되거나 한 펩티드를 들 수 있다. 구체적인 CNP 의 변이체로는, NPR-B 아고니스트 활성을 갖는 한, 배열 번호 1 내지 4 에 기재된 아미노산 배열 중의 원하는 1 개 내지 복수의 지점에 있어서 1 내지 몇 개의 아미노산이 치환되어 있거나 해도 되지만, 바람직하게는 배열 번호 1 내지 4 의 어느 것에 기재된 아미노산 배열 중의 배열 번호 5 에 표시된 아미노산 이외의 아미노산에 있어서 1 개 지점 ~ 수 개 지점에서 1 개 ~ 몇 개의 아미노산이 치환되거나 한 것이고, 보다 바람직하게는 배열 번호 1, 3 또는 4 에 기재된 아미노산 배열의 1 내지 5 위치의 어느 1 개 지점 ~ 수 개 지점에서 1 개 내지 몇 개의 아미노산이 치환되거나 한 것, 또는, 배열 번호 2 에 기재된 아미노산 배열의 1 내지 31 위치의 어느 1 개 지점 ~ 수 개 지점에서 1 개 내지 몇 개의 아미노산이 치환되거나 한 것이다.

[0035] 본 발명의 NPR-B 아고니스트로는, 상기 서술한 변이체 자체를 채용할 수도 있고, 또 그 N 말단, C 말단 또는 그 양방에 1 내지 복수의 아미노산이 부가된 펩티드 (변이체의 유도체) 여도, 원하는 아고니스트 활성을 유지하는 한 채용할 수 있다.

[0036] CNP 의 변이체의 구체예로는, hCNP-22 의 17 위치와 18 위치에 변이를 갖는 펩티드가 hCNP-22 와 동일한 NPR-B 아고니스트 활성을 갖는 것, 그와 같은 변이체의 링 구조 부분의 N 말단과 C 말단을 ANP 유래의 배열로 치환한 변이체의 유도체여도 hCNP-22 의 활성의 90 % 정도의 NPR-B 아고니스트 활성을 나타내는 것, 9 위치 내지 11 위치의 어느 1 개 지점에 변이를 갖는 펩티드가 hCNP-22 의 50 % 이상의 NPR-B 아고니스트 활성을 나타내는 것, 10 위치와 11 위치의 양방에 변이를 갖는 펩티드가 hCNP-22 의 40 % 이상의 NPR-B 아고니스트 활성을 갖는 것 등이 보고되어 있다 (Furuya M 등 저, Biochem. BioPhys. Res. Commun., (1992), 183 권, 3 호, 964-969 페이지). 또, 다른 문헌에서는, hCNP-22 의 각종 변이체가, NPR-B 아고니스트 활성을 유지하는 것, 또는, 그 중에는 추가로 CNP 의 분해 효소인 중성 엔도펩티다아제 (NEP) 에 의한 절단에 대한 내성을 갖는 것 등이 기재되어 있다 (WO2009/067639호 팜플렛).

[0037] 본 발명에 있어서, 생물 활성을 갖는 펩티드 또는 단백질의 「유도체」란, 당해 펩티드 또는 단백질의 아미노산 배열을 포함하고, 또한 별도의 펩티드 또는 단백질이 부가된 융합 펩티드이며, 또한, 당해 생리 활성 펩티드 또는 단백질이 갖는 생물 활성의 적어도 일부를 유지하는 융합 펩티드를 의미한다. 이와 같은 생물 활성 (본 발명에 있어서는, NPR-B 에 결합되어, 그 구아닐레이트사이클라아제를 활성화하는 작용) 의 적어도 일부를 갖는 융합 펩티드를 생리 활성 펩티드의 유도체라고도 한다. 본 발명의 유도체에 있어서, 바탕이 되는 생리 활성 펩티드 또는 단백질의, C 말단 또는 N 말단의 일방에 부가 펩티드가 융합되어 있어도 되고, C 말단 및 N 말단의 양방에 부가 펩티드가 융합된 것이어도 된다. 부가되는 펩티드로는 특별히 한정되지 않지만, 그 펩티드 자체가 생리 활성을 갖지 않는 것이 바람직하다. 또, 부가 펩티드는 직접 결합되어 있어도 되고, 1 내지 몇 개의 아미노산으로 이루어지는 링커 배열을 개재하여 결합되어 있어도 된다. 링커 배열로는 여러 가지가 알려져 있지만, G, S 등을 많이 포함하는 것이 흔히 사용된다. 그와 같은 부가 펩티드로는, 면역 글로블린 (바람직하게는 IgG) 의 Fc 부위, 혈청 알부민, 그렐린의 C 말단측 부분 배열 등을 들 수 있다. 본 발명의 NPR-B 아고니스트로서 사용되는 유도체로는, CNP (바람직하게는 hCNP-22 또는 hCNP-53) 의 유도체, CNP 의 활성 단편 (바람직하게는 hCNP6-22) 의 유도체 등을 예시할 수 있고, 바람직하게는 hCNP-22 의 유도체 또는 hCNP6-22

의 유도체이다.

[0038] CNP 의 유도체의 구체예로는, 예를 들어 미국 특허공개 US2010-305031 호 (대응 국제 특허공개 WO2009/142 C307호) 에 개시된 각종 CNP 유도체 (당해 미국 특허공개 공보에 있어서의 배열 번호 109, 110, 124 내지 130, 157 및 158 : 본 명세서의 배열표에 있어서의 배열 번호 6 ~ 14) 등을 들 수 있다. 여기서, ANP, CNP, 모틸린 등의 생리 활성 펩티드에, 그렐린의 C 말단측에서 유래하는 부분 배열을 부가한 유도체에 있어서, 원펩티드의 생리 활성을 유지한 채로, 혈중 체류성이 개선되었던 것이 보고되어 있다. 이 보고에서는, CNP 의 N 말단 또는 C 말단의 어느 일방 및 그것들의 양방에 그렐린의 C 말단에서 유래하는 Wk-Xl-Y-Zm-Wn (여기서, W 는 Lys, Arg 등의 염기성 아미노산, Y 는 Asp, Glu 등의 산성 아미노산, X 와 Z 는 동일해도 되고 상이해도 되며, 산성 아미노산, 염기성 아미노산을 제외한 어떠한 아미노산이어도 된다. K 및 n 은 서로 독립적이고, 1 또는 2 의 정수 (整數) 를 나타내고, l 및 m 은 서로 독립적이고, 0, 1 또는 2 의 자연수를 나타낸다. 이와 같은 배열로서, 바람직하게는 RKESKK, RKDSKK, RKSEKK, RKSDKK 등을 들 수 있다) 을 포함하는 펩티드를 부가한 다양한 유도체의 어느 것에 있어서도, NPR-B 아고니스트 활성이 유지되어 그 혈중 반감기가 연장되었다. 본 발명의 실시예에 사용되는 CNP 유도체 (A) (배열 번호 13), CNP 유도체 (C) (배열 번호 8) 는, 모두 당해 공보에서 만들어진 CNP 유도체의 대표예이다. 당해 공보의 기재는 모두 본 명세서의 기재에 포함되는 것이다.

[0039] 또, CNP 또는 그 활성 단편의 유도체로서, hCNP-22 의 C 말단에 ANP 의 C 말단 부분이 부가된 펩티드나, hCNP6-22 의 N 말단 및 C 말단에 ANP 의 N 말단 부분 및 C 말단 부분이 부가된 펩티드 (CNP 활성 단편의 유도체) 에 있어서도, hCNP-22 와 동일 정도의 NPR-B 아고니스트 활성이 유지되어 있었다 (Furuya M 등 저, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1992), 183 권, 3 호, 964-969 페이지). 또한, 다른 문헌에 있어서, hCNP-22 및 hCNP-53 의 각종 유도체가 NPR-B 아고니스트 활성을 유지하는 것이나, 그 중의 복수의 유도체가 추가로 NEP 분해 내성을 갖는 것 등이 기재되어 있다 (WO2009/067639호 팜플렛). 이 국제 공개공보에 기재된 유도체 중에서도, 본 명세서에서 CNP 유도체 (B) 로 정의되는, Pro-Gly-CNP-37 (배열 번호 15) 의 아미노산 배열로 이루어지는 유도체의 연골 무형성증 모델 마우스에 대한 약리 효과가 보고되어 있다 (Florence L 등 저, Am. J. Hum. Genet., (2012), 91 권, 6 호, 1108-1114 페이지, 본문 : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000292971200537X:Supplement> : <http://download.cell.com/AJHG/mmc5/journals/0002-9297/PIIS000292971200537X.mmc1.pdf>).

[0040] 나아가 또, 본 발명의 CNP-22 의 유도체로는, humanCNP-53 의 아미노산 배열 (배열 번호 2) 에 있어서, N 말단으로부터 연속되는 1 개 이상 30 개 이하의 아미노산이 결손된 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드, 구체적으로는, CNP-36 (배열 번호 2 의 아미노산 번호 18 ~ 53) 등을 들 수 있다. 이와 같은 유도체로서 바람직하게는 hCNP-53 (배열 번호 2) 의 N 말단으로부터 연속되는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 개의 아미노산이 결손된 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드이고, 보다 바람직하게는 hCNP-53 의 N 말단으로부터 연속되는 17 개의 아미노산이 결손된 hCNP-36 (배열 번호 2 의 아미노산 번호 18 ~ 53 의 아미노산 배열로 이루어지는 펩티드) 이다.

[0041] 이들 여러 가지 CNP 유도체 및 CNP 활성 단편의 유도체는, 본 발명의 NPR-B 아고니스트로서 바람직하게 이용할 수 있다. 보다 바람직하게는 배열 번호 2 에 있어서, N 말단으로부터 1 개 이상 30 개 이하 (바람직하게는 25 개 이하, 더욱 바람직하게는 20 개 이하) 가 연속되는 아미노산이 결손된 아미노산 배열로 이루어지는 유도체, 또는, 배열 번호 6 내지 15 에서 선택되는 어느 유도체이고, 더욱 바람직하게는 CNP 유도체 (A) (배열 번호 13), CNP 유도체 (C) (배열 번호 8), 또는, CNP 유도체 (B) (배열 번호 15) 이다.

[0042] 본 발명에 있어서, 생물 활성을 갖는 펩티드 또는 단백질의 「수식체」란, 당해 펩티드 또는 단백질에 포함되는 아미노산의 1 개 지점 내지 수 개 지점이, 다른 화학 물질과의 화학 반응에 의해서 수식된 것이며, 또한, 당해 펩티드 또는 단백질이 갖는 생물 활성의 적어도 일부를 유지하는 것을 의미한다. 수식을 받는 부위는, 바탕이 되는 펩티드 또는 단백질의 활성을 유지하는 한, 어느 부위를 선택해도 된다.

[0043] 예를 들어 폴리머와 같은 어느 정도 큰 화학 물질을 부가하는 수식에서는, 펩티드 또는 단백질의 활성 부위, 또는, 수용체 결합 부위 이외의 지점에서 수식되는 것이 바람직하다. 또, 분해 효소에 의한 절단을 방지하기 위한 수식의 경우, 당해 절단되는 지점이 수식되는 것이 바람직하다.

[0044] 예를 들어 CNP 의 수식체는, NPR-B 아고니스트 활성을 갖는 한, 배열 번호 1 내지 4 의 어느 아미노산 배열 중의 원하는 1 개 내지 복수의 지점에서 수식되어 있어도 되지만, 바람직하게는 배열 번호 1 내지 4 의 어느 아미노산 배열 중의 배열 번호 5 에 표시된 아미노산 이외의 아미노산에 있어서 1 개 지점 내지 수 개 지점에서 수식된 것이고, 보다 바람직하게는 배열 번호 1, 3 또는 4 의 아미노산 배열의 1 내지 5 위치의 어느 것이나 1 개

지점 ~ 수 개 지점에서 수식된 것이다. 또, NEP 에 의한 절단에 대한 내성을 부여하는 수식의 경우에는, 각종 CNP 펩티드에 포함되고, 링 구조에 있어서 배열 번호 5 의 1 위치 C 와 2 위치 F 사이에서 절단되는 것이 알려져 있기 때문에, 이 결합을 수식할 수도 있다.

[0045] 또한, 상기 서술한 CNP 의 활성 단편, 변이체 및 그것들의 유도체의 수식체도 본 발명에 포함된다. 이와 같은 각종 수식체도 NPR-B 아고니스트 활성을 유지하는 한, 본 발명에 사용할 수 있다.

[0046] 화학 수식의 방법으로는 여러 가지 방법이 알려져 있는데, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 폴리비닐알코올 (PVA) 등 제약 기술에서 이용되는 (약리상 이용되는) 고분자 폴리머를 부가하는 방법이나, K 잔기 등의 측사슬의 아미노기에 링커가 되는 화합물을 부가시키고, 그것을 통하여 다른 단백질 등 (예를 들어, 혈청 알부민) 과 결합시키는 방법 등이 알려져 있지만, 이에 한정되지 않고 여러 가지 방법을 채용할 수 있다.

[0047] 이와 같은 CNP, 그 활성 단편, 그것들의 변이체 및 그것들의 유도체의 수식체의 구체예로는, 예를 들어 WO2009/067639호 팜플렛에 있어서, hCNP-22 및 hCNP-53 에 PEG 등의 각종 친수성 폴리머를 결합시킨 수식체나, hCNP-22 에 있어서 NEP 에 의한 절단 부위인 Cys6-pHe7 의 펩티드 결합이 -CH₂-NH- 또는 -C(=O)-N(R)- (R 은, 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, 이소부틸기, sec-부틸기, tert-부틸기 등의 저급 알킬기) 등의 유사 펩티드 결합으로 치환된 수식체의 복수가 NPR-B 아고니스트 활성을 유지하고, 또, 그 대부분이 hCNP-22 보다 개선된 혈중 체류성을 갖는 것이 개시되어 있다. 또, 여러 가지 생리 활성 펩티드의 수식체의 제조 방법에 대해서는, 예를 들어 미국 특허공개 US2009-0175821 호 등을 참고로 하여 적절히 만들 수 있다.

[0048] CNP 와 NPR-B 수용체의 결합은 링 구조가 중요하기 때문에, 특히 말단부에 다른 배열 또는 물질이 결합된 유도체나 수식체는, 그 부가 펩티드나 수식물이 링 구조에 영향을 주는 경우가 적고, NPR-B 수용체와의 결합을 저해하지 않고 NPR-B 아고니스트 활성을 유지하는 것이 충분히 기대된다. 이것은 상기 서술한 많은 문헌에 의해서 실증되고 있다.

[0049] 상기의 CNP, 그 활성 단편, 그것들의 변이체, 그것들의 유도체 및 그것들의 수식체는, 천연의 세포 또는 조직으로부터 채취된 것이어도 되고, 유전자 공학적, 세포 공학적인 수법을 사용하여 생산한 것이어도 되며, 화학 합성된 것이어도 되고, 나아가서는 그것들을 효소 처리나 화학 처리하여 아미노산 잔기를 수식 또는 아미노산 배열의 일부를 제거한 것이어도 된다. 이와 같은 물질은, 본 명세서의 기재, 인용 문헌을 참고로 하여, 통상적인 방법에 따라서 적절히 제조할 수 있다.

[0050] 어느 물질이 NPR-B 아고니스트 활성을 갖는지의 여부에 대해서는, 당업자이면 종래 알려져 있는 방법에 의해서 용이하게 측정할 수 있다. 구체적으로는, NPR-B (Suga S 등 저, Endocrinology (1992), 130 권, 1 호, 229-239 페이지) 를 강제 발현시킨 배양 세포에 물질을 첨가하여, 세포 내 cGMP 레벨을 측정함으로써 가능하다. NPR-B 아고니스트 활성의 일부가 유지된다는 것은, 동일한 시험계를 사용하여, NPR-B 아고니스트 물질과 CNP 를 나열하여 NPR-B 아고니스트 활성을 측정할 경우, cGMP 상승 활성의 피크가 적어도 CNP 가 나타내는 cGMP 상승 활성 피크의 10 % 이상을 유지하는 것을 의미하는데, 바람직하게는 30 % 이상을 유지하는 것이고, 보다 바람직하게는 50 % 이상을 유지하는 것이며, 더욱 바람직하게는 70 % 이상을 유지하는 것을 의미한다. 또, 피크에 있어서 활성의 상승이 크지 않아도, 생체에 투여한 경우의 활성 지속 시간·혈중 체류성에 있어서 양호한 결과를 나타내는 것은 본 발명에 사용할 수 있다.

[0051] 또, 이와 같은 평가계에 대해서, 저분자의 화합물을 첨가하여, cGMP 산생능이 향상되는 화합물이면, 나트륨 이노 펩티드와 공통되는 구조를 갖지 않는 것 (예를 들어, 저분자 화합물) 이어도, NPR-B 아고니스트로서 본 발명에 사용할 수 있다.

[0052] 또한, NPR-B 의 리간드 결합 부위를 포함하는 단백질을 항원으로서 사용하고, 동물을 면역시켜 만들어진 항체에 대해서, 상기 서술한 방법으로 NPR-B 아고니스트 활성을 갖는 것을 선별하는 것은, 본 기술 분야의 통상적인 지식에 의해서 실시할 수 있다. 이와 같이 하여 만들어지는 NPR-B 아고니스트 활성을 갖는 항 NPR-B 항체도, 본 발명의 NPR-B 아고니스트로서 이용할 수 있다. 또, 이와 같이 사용되는 항체는, 면역 원동물이 산생하는 항체, 키메라 항체, CDR 이식 항체, 인간화 항체, 완전 인간 항체 등, 공지된 여러 가지 형태로 만들 수 있다. 또 이들 항체에 기초하여 만들어진 Fab, scFv 등의 항체 단편을 이용할 수도 있다.

[0053] 본 발명의 NPR-B 아고니스트로서 바람직한 것은, CNP, 그 링 구조 배열을 갖는 활성 단편, 혹은, 그 링 구조 배열 이외에 있어서 치환되거나 한 변이체, 그것들의 유도체 또는 수식체이고, 보다 바람직하게는 hCNP-22, hCNP-53, hCNP6-22, 그것들의 유도체 또는 그것들의 수식체이고, 보다 더 바람직하게는 hCNP-53, CNP 유도체 (A) : CNP(1-22) Ghrelin (12-28, E17D, 배열 번호 13), CNP 유도체 (B) : Pro-Gly-CNP-37 (배열 번호 15), CNP 유도

체 (C) : CNP(1-22) Ghrelin (12-28, 배열 번호 8) 및 그것들의 부분 펩티드 등을 들 수 있다.

- [0054] <투여 대상>
- [0055] 본 발명의 NPR-B 아고니스트는, 스테로이드제의 계속적인 투여가 필요한 성장기의 개체에 대해서 투여됨으로써, 당해 대상에 있어서의 스테로이드제 투여에 의해서 유발되는 성장 장애를 경감 및/또는 개선하기 위한 의약의 유효 성분으로서 사용할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 「스테로이드제의 계속적인 투여가 필요한 성장기의 개체」란, 스테로이드제에 의해서 치료될 수 있는 질환에 걸리고, 정상적인 성장에 있어서의 골 신장을 억제 혹은 저해할 수 있는 투여량 및/또는 투여 기간에서의 스테로이드제의 투여를 예정하거나, 투여 중이거나, 또는, 투여를 완료한 성장기의 대상을 의미한다. 본 발명의 의약의 투여 대상은 포유 동물이면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 인간, 원숭이, 개, 고양이, 말 등이고, 바람직하게는 인간이다. 본 발명에 있어서, 「성장기」란, 대상의 장골의 골 단선이 폐쇄되지 않고 성장판이 유지되어 있는 시기를 의미하고, 인간인 경우에는 개인차가 있기는 하지만, 통상적으로는 18 세 이하이고, 바람직하게는 15 세 이하이며, 보다 바람직하게는 12 세 이하이다. 본 발명의 의약은 성장 장애를 경감 및/또는 개선하는 점에서, 성장 속도가 빠른 시기의 대상에게 투여됨으로써 현저하게 그 효과가 얻어지기 쉽다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 「스테로이드제」란, 의료 현장에 있어서, 질환의 치료를 목적으로 이용되는 당질 코르티코이드류 또는 그것들의 유연 화합물을 유효 성분으로 하는 약제이다. 대표적인 것으로는, 프레드니솔론, 베키로메타손, 베타메타손, 플루티카손, 텍사메타손, 하이드로코르티손 등을 유효 성분으로 하는 약제 (Payne 등 저, Paediatr Respir Rev., (2001), 2 권, 145-150 페이지, Pelaia G 등 저, Life Sci., (2003), 72 권, 14 호, 1549-1561 페이지) 가 있는데, 이것들에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 스테로이드제는 경구제, 주사제, 외용제 등 제제 형태는 한정되지 않는다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 「스테로이드제 투여에 의해서 유발되는 성장 장애」란, 아래와 같은 사상(事象)의 발생, 진행, 그 결과로서 발현되는 표현형의 전체를 의미한다. 성장기의 대상에 대한 스테로이드제의 장기 사용에는 성장 장애 발생의 리스크가 수반된다. 성장기에 있어서 장기간에 걸쳐서 스테로이드제에 의한 치료를 행하면, 체내에서 과잉이 된 당질 코르티코이드류에 의해서, 성장 호르몬 (GROWTH HORMONE) 이나 인슐린형 성장인자 (IGF-1) 의 생성 및 분비가 방해되거나, 이들 호르몬에 대한 감수성도 저하되거나 한다. 그 결과, 정상적인 발육이 억제된 상태, 이른바 「성장 장애」를 일으키고, 그 결과로서, 동일 연령 대상의 표준 성장 곡선과 비교하여 유의하게 키가 작은 상태, 이른바 「저신장증」으로 진단되기에 이를 가능성이 있다 (Kawaguchi H 등 저, J Bone Miner Res. (2001), 25 권, 12 호, 2735-2743 페이지).
- [0059] 성장기의 대상에 있어서 비교적 장기간에 걸쳐서 스테로이드제에 의한 치료가 필요한 질환, 즉, 본 발명의 의약이 투여될 수 있는 대상이 질병에 걸려 있거나, 또는, 과거에 질병에 걸린 질환으로서, 예를 들어 천식, 아토피성 피부염, 전신성 홍반 루푸스, 류머티즘열, 약년성 특발성 관절염, 궤양성 대장염, 크론병, 중증 근무력증, 길랑-바레 증후군, 폐 혈철증, 소아 IgA 신증, 특발성 혈소판 감소성 자반병, 자기 면역성 용혈성 빈혈, 재생 불량성 빈혈, 급성 림프성 백혈병, 선천성 부신 과형성 등을 들 수 있다. 이것들의 적어도 일부는, 스테로이드제에 의한 치료를 중지하기가 어렵고, 중증화된 경우에는 죽음에 이를 가능성도 상정되는 중독한 질환이다. 그 때문에, 목적으로 하는 효과가 충분히 얻어지는 범위 내에서 스테로이드제를 계속 사용하면서, 그리고 또한, 여러 가지 부작용의 발현을 최소한으로 억제할 것이 요구된다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 당해 성장 장애를 「경감한다」란, 장애의 발생을 억제하는 것, 장애의 진행을 완화·지연시키는 것, 장애의 정도를 경감시키는 것 등의 효과가 적어도 하나 이상이 발현됨으로써, 성장 장애의 결과로서 발생할 수 있는 저신장이 발생되지 않거나, 또는, 저신장의 정도가 완화되는 것이 기대되는 경로를 찾아가는 것을 의미한다. 성장 장애를 경감시키는 목적에 있어서, 본 발명의 의약은, 스테로이드제 치료의 개시 직전, 개시와 동시, 또는, 치료 기간 중에 투여를 개시하는 것이 바람직하고, 나아가 스테로이드제 치료의 종료시 또는 그 일정 기간 경과 후까지 계속적으로 투여되는 것이 바람직하다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 당해 성장 장애를 「개선한다」란, 투여 대상에 있어서의 성장률을 동일 연령의 표준 성장률과 동일 정도 또는 그 이상으로 개선시키는 것, 성장 장애의 진행 과정에 있어서 저신장을 발생시키지 않는 것, 발생된 저신장을 회복시키는 것, 장애를 유발하는 사상의 종료 후에 있어서, 결과적으로 발생된 장애 상태를 정상 상태에 근접시키는 방향으로 회복시키는 것 등의 효과의 적어도 하나 이상이 발현됨으로써, 대상의 신장을 동일 연령의 (개체의) 표준 신장역에 근접시키는 것을 의미한다. 성장 장애를 개선하는 목적에 있어서, 본

발명의 의약은, 스테로이드제 치료를 일정 기간 받거나, 또는, 당해 치료를 종료한 대상이고, 저신장의 경향이 있거나, 또는, 저신장증인 성장기의 대상에 대해서 투여를 개시하게 된다. 스테로이드제 치료의 기간 중에 투여되는 경우에는, 경감 효과와 개선 효과의 양방이 나타나는 것이 기대된다.

[0062] 본 발명의 의약은, 스테로이드제의 지속적인 투여가 필요한 성장기의 대상에 대해서, 당해 대상에 있어서의 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애를 경감하는 및/또는 개선하는, 또는 성장 장애에 의해서 발생된 저신장증을 치료하는 것을 목적으로 하여 처방되고, 본 발명의 NPR-B 아고니스트를 유효 성분으로서 함유하는 의약이면 특별히 한정되지 않지만, 의약품에 첨부된 문서에, 스테로이드제 요법을 받고 있는 대상에게 투여할 수 있는 것, 그것에 따라서 스테로이드제 투여에 의해서 성장 장애가 발생할 우려가 있는 대상, 혹은 성장 장애가 발생된 대상에게 투여하는 것, 본 발명의 의약이 당해 성장 장애를 경감 및/또는 개선시키거나, 또는 당해 성장 장애의 결과 발생된 저신장증의 치료를 목적으로 하여 투여되는 것 등이 기재되어 있는 것이 바람직하다.

[0063] <의약의 형태>

[0064] 본 발명의 의약은, 본 투여 대상에 있어서, 스테로이드제 요법의 개시 직전, 개시와 동시 또는 기간 중에 투여가 개시되고, 스테로이드제 요법의 기간 중 투여가 계속됨으로써, 스테로이드제 투여에 의해서 유발되는 성장 장애를 경감 및/또는 개선하거나, 혹은, 성장 장애에 의해서 발생된 저신장증을 치료할 수 있다. 이 경우에 있어서, 본 발명에 있어서, 본 발명의 의약이 「스테로이드제 요법의 기간 중 계속하여 투여된다」란, 어느 일정 기간에 있어서, 피투여 대상이 모든 유효 성분(스테로이드제 및 본 발명의 NPR-B 아고니스트)을 그 체내에 받아들이는 것을 의미한다. 모든 유효 성분이 단일 제제 중에 함유된 제제가 투여되어도 되고, 또 각각의 유효 성분이 따로 따로 제제화되고, 따로 따로 그것들 모두가 투여되어도 된다. 따로 따로 제제화되는 경우, 그 투여 시기는 특별히 한정되지 않고, 동시에 투여되어도 되고, 시간을 두어 상이한 시간에 또는 상이한 날에 투여되어도 된다. 또한, 복수의 유효 성분 또는 약제가 「조합하여 투여되는」에는, NPR-B 아고니스트로서 작용하는 복수의 활성 물질이 단독으로 투여되는 것도 포함된다. 복수의 유효 성분이 각각 상이한 시간 또는 날에 투여될 경우, 유효 성분의 투여 순서는 특별히 한정되지 않는다. 통상적으로, 각각의 제제는 각각의 투여 방법에 따라서 투여되기 때문에, 그것들의 투여는 동일 횟수가 되는 경우도 있고, 상이한 횟수가 되는 경우도 있다. 또, 각각의 유효 성분이 따로 따로 제제화될 경우, 각 제제의 투여 방법(투여 경로)은 동일해도 되고, 상이한 투여 방법(투여 경로)으로 투여되어도 된다. 또, 모든 유효 성분이 동시에 체내에 존재할 필요는 없고, 어느 일정 기간(예를 들어, 1 개월간, 바람직하게는 1 주일간, 더욱 바람직하게는 수일간, 보다 더 바람직하게는 1 일간) 동안에, 모든 유효 성분이 체내에 받아들여져 있으면 되고, 하나의 유효 성분의 투여시에 다른 유효 성분이 체내로부터 소실되어 있어도 된다.

[0065] 또, 본 발명의 의약은 스테로이드제 요법의 기간 중 또는 종료 후에 투여됨으로써, 스테로이드제 투여로 유발되는 성장 장애에 의해서 발생된 저신장증을 치료할 수 있다. 「저신장증」이란, 일반적으로는 동일 인종 동성 동일 연령의 신장과 비교하여, 표준 신장 -2 SD 이하, 혹은 2 년간의 성장 속도가 -1.5 SD 이하인 경우에 저신장증으로 정의된다. 이 경우의 투여는 대상이 성장기의 기간 중이고, 통상적으로는 당해 대상의 연령에 있어서의 표준 신장 +2 SD 를 초과하지 않는 범위에서 행해진다. 또, 상기한 저신장증의 정의에 합치되지 않는 경우여도, 지속적인 스테로이드 치료를 받고 있거나, 또는 치료력이 있는 성장기의 환자로서, 동일 인종 동성 동일 연령의 표준 신장보다 명확하게 낮은 신장인 경우, 또는, 성장 속도가 현저하게 저하되어 있는 경우에는, 성장 장애가 의심되기 때문에, 본 발명의 의약의 투여 대상이 될 수 있다.

[0066] 또한, 상기 서술한 바와 같은 본 발명의 의약의 작용에 의해서, 스테로이드제 투약에 의한 성장 장애의 리스크가 저감된 결과, 원질환의 치료에 필요로 하는 스테로이드제의 사용량의 증가 또는 치료 기간의 연장이 가능해짐으로써, 원질환의 치료 성적을 향상시킬 가능성이 있고, 본 발명은 이와 같은 약제도 제공하는 것이다.

[0067] 본 발명의 의약의 유효 성분으로서 사용할 수 있는 물질은, 상기 서술한 NPR-B 아고니스트의 약학적으로 허용되는 염이어도 된다. 즉, 본 발명에 있어서는, 상기 서술한 NPR-B 아고니스트의 무기산, 예를 들어 염산, 황산, 인산, 또는 유기산, 예를 들어 포름산, 아세트산, 부티르산, 숙신산, 시트르산 등의 산부가 염을 유효 성분으로서 사용할 수도 있다. 혹은, 본 발명에 있어서는, 상기 서술한 NPR-B 아고니스트의, 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘 등의 금속염, 유기 염기에 의한 염의 형태를 유효 성분으로서 사용할 수도 있다. 또, 본 발명에 관련된 의약 조성물은, 그 유효 성분에 관련된 물질의 유리형으로 하거나, 또는 그 약학상으로 허용할 수 있는 염이어도 된다.

[0068] 본 발명의 의약 조성물은, NPR-B 아고니스트 또는 그 약학상 허용되는 염을 유효 성분으로서 함유하고, 또한 통상적인 제제화시에 사용되는 담체나 부형제, 그 밖의 첨가제, 희석제 등을 사용하여 조제된다. 제제용의 담

체나 부형제로는, 예를 들어 젓당, 스테아르산마그네슘, 전분, 톨크, 젤라틴, 한천, 펙틴, 아라비아 검, 올리브유, 참기름, 카카오 버터, 에틸렌글리콜 등, 또는, 그 밖에 상용되는 것을 들 수 있다.

[0069] 경구 투여를 위한 고체 조성물로는 정제, 환제, 캡슐제, 산제, 과립제 등이 사용된다. 이와 같은 고체 조성물에 있어서는, 적어도 하나의 유효 성분이 적어도 하나의 불활성인 희석제, 예를 들어 젓당, 만니톨, 포도당, 하이드록시프로필셀룰로오스, 미결정성 셀룰로오스, 전분, 폴리비닐피롤리돈, 메타규산알루미늄산마그네슘 등과 혼합된다. 조성물은 통상적인 방법에 따라서 불활성인 희석제 이외의 첨가물, 예를 들어 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제, 섬유소 글리콜산칼슘과 같은 붕괴제, 글루타민산 또는 아스파르트산과 같은 용해 보조제를 함유하고 있어도 된다. 정제 또는 환제는 필요에 따라서 자당, 젤라틴, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스프탈레이트 등의 당이나 위용성 또는 장용성 물질의 필름으로 피복해도 되고, 2 개 이상의 층으로 피복해도 된다. 또한, 젤라틴과 같은 흡수될 수 있는 물질의 캡슐도 포함된다.

[0070] 경구 투여를 위한 액체 조성물은, 약제적으로 허용되는 유타제, 용액제, 현탁제, 시럽제, 엘릭시르제 등을 함유하고, 일반적으로 사용되는 불활성인 희석제, 예를 들어 정제수, 에탄올 등을 함유하고 있어도 된다. 이 조성물은 불활성인 희석제 이외에, 습윤제, 현탁제와 같은 보조제, 감미제, 풍미제, 방향제, 방부제 등을 함유하고 있어도 된다.

[0071] 비경구 투여를 위한 주사제로는, 무균의 수성 또는 비수성의 용액제, 현탁제, 유타제가 포함된다. 수성의 용액제, 현탁제로는, 예를 들어 주사용 수 (水) 및 주사용 생리 식염액이 포함된다. 비수성의 용액제, 현탁제로는, 예를 들어 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브유와 같은 식물유, 에탄올과 같은 알코올류, 폴리소르베이트 80 (등록 상표) 등이 포함된다. 이와 같은 조성물은 추가로 방부제, 습윤제, 유타제, 분산제, 안정화제 (예를 들어, 젓당), 용해 보조제 (예를 들어, 글루타민산, 아스파르트산) 와 같은 보조제를 함유하고 있어도 된다. 이것들은, 예를 들어 정밀 여과막에 의한 여과 멸균, 고압 증기 멸균과 같은 가열 멸균, 혹은, 살균제의 배합 등의 통상적인 멸균 방법에 의해서 무균화하는 것이 가능하다. 주사제는 용액 제제여도 되고, 사용 전에 용해 재구성하기 위해서 동결 건조된 것이어도 된다. 동결 건조를 위한 부형제로는, 예를 들어 만니톨, 포도당 등의 당알코올이나 당류를 사용할 수 있다.

[0072] 본 발명의 의약 조성물은, 의약에 일반적으로 사용되는 투여 방법, 예를 들어 경구 투여 방법, 또는, 경점막 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여 혹은 피하 투여 등의 비경구 투여 방법에 의해서 투여하는 것이 바람직하다. 유효 성분이 NPR-B 아고니스트 항체인 경우에는 통상적으로 비경구 투여 경로이고, 예를 들어 주사제 (피하주 (皮下注), 정주, 근육주, 복강내주 등), 경피, 경점막, 경비, 경폐 등에 의해서 투여되지만, 경구 투여도 가능하다.

[0073] 유효 성분이 펩티드성 물질인 경우, 소화관 내에서 분해되기 어려운 제제, 예를 들어 활성 성분인 펩티드를 리보솜 중에 포용한 마이크로 캡슐제로서 경구 투여할 수도 있다. 또, 직장, 비 (鼻) 내, 설하 등의 소화관 이외의 점막으로부터 흡수시키는 투여 방법도 가능하다. 이 경우에는 좌제, 점비 스프레이, 흡입약, 설하정 등의 형태로 개체에 투여할 수 있다.

[0074] 본 발명에 관련된 의약 조성물의 유효 성분으로서 사용할 수 있는 물질의 투여량은, 원질환의 종류, 개체 (대상) 의 연령, 체중, 증상의 정도 및 투여 경로 등에 따라서도 상이한데, 인간에 대해서는, 일반적으로 1 일당 투여량의 상한으로는, 예를 들어 약 100 mg/kg 이하이고, 바람직하게는 약 50 mg/kg 이하이며, 더욱 바람직하게는 5 mg/kg 이하이다. 또, 1 일당 투여량의 하한으로는, 예를 들어 약 0.005 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이상이고, 바람직하게는 0.025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이상이며, 보다 바람직하게는 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이상이다.

[0075] 본 발명의 CNP 의 투여량은, 대상 개체의 체중, 적응 질환, 증상 등에 따라서 상이한데, 국소 투여에서는 조직 레벨로 10^{-15} M 내지 10^{-6} M 정도이고, 바람직하게는 10^{-12} M 내지 10^{-8} M 정도이다. 전신 투여에서는 0.01 $\mu\text{g}/\text{head}$ 내지 10000 $\mu\text{g}/\text{head}$ 정도이고, 바람직하게는 1 $\mu\text{g}/\text{head}$ 내지 5000 $\mu\text{g}/\text{head}$ 이다.

[0076] 본 발명의 의약 조성물은, 스테로이드제와의 병용, 혹은, 과거에 스테로이드제가 투약된 대상에 투여되는 것이다. 또, 본 발명의 의약 조성물은, 다른 골 형성 촉진제, 골 흡수 억제제 또는 저신장증 치료약과 병용해도 된다. 이와 같은 병용 상대의 약제로는, 예를 들어 비스포스포네이트 제제, 골 형성 단백질 (BMP) 제제, 부갑상선 호르몬 (PTH) 제제, 염기성 선유아세포 증식 인자 (bFGF) 제제, 항과골 세포 분화 인자 (RANKL) 항체 제제, 성장 호르몬 (GROWTH HORMONE) 제제나 인슐린형 성장 인자 (IGF-1) 제제 등을 들 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0077] 또, 본 발명의 치료제를 유전자 치료에 사용하는 경우에는, 바이러스 벡터, 바람직하게는 렌티바이러스 벡터,

아데노 수반 바이러스 벡터, 더욱 바람직하게는 아데노바이러스 벡터, 또는 화학 합성 리포솜, 바이러스 엔벨로프, 혹은 바이러스 엔벨로프와 합성 리포솜의 복합체 등 공지된 유전자 치료에 적절한 매체에, 숙주 세포 내에서 기능하는 프로모터 배열, 예를 들어 사이토메갈로바이러스 프로모터 (CMV promoter) 등의 하류에, NPR-B 아고니스트펩티드의 아미노산 배열을 코딩하는 핵산을 집어 넣은 것을 사용할 수 있다. CNP 를 코딩하는 유전자로는, 배열 번호 1 내지 5 의 어느 아미노산 배열을 코딩하는 뉴클레오티드 배열을 포함하는 유전자를 사용하면 된다. 구체적인 유전자 치료 방법에 대해서는, 실험 의학, 12 권, 303 페이지, 1994년에 기재된 방법 또는 그것에 인용되어 있는 문헌의 방법 등을 이용하면 된다.

[0078]

실시에

[0079]

이하에 실시예에 의해서 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 본 발명의 실시양태의 일례를 나타내는 것으로서, 본 발명은 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0080]

또한, 본 실시예에 있어서 사용하는 CNP 유도체 (A) (배열 번호 13) 및 CNP 유도체 (C) (배열 번호 8) 는, 미국 특허공개 US2010-305031 호에 기재된 것에 기초하여 조제되었다. 또, CNP 유도체 (B) (배열 번호 15) 는, W02009/067639호 팜플렛의 기재에 기초하여 조제되었다.

[0081]

<실시예 1> : 텍사메타손 유발 성장 장애 모델 래트의 제조

[0082]

[방법]

[0083]

삼투압 펌프 (MINI-OSMOTIC PUMP Model 2004, DURECT 사 제조, 유량 : 0.25 μ l/hr, 28 일용) 에 0.5 mg/ml (제 2 군) 또는 1 mg/ml (제 3 군) 농도의 텍사메타손 (텍사메타손주 「KS」, 교리츠 제약 주식회사 제조) 을 충전하고, 7 주령의 웅성 Cr1 : CD (SD) 래트 (5 마리/군, 합계 10 마리) 의 배부 (背部) 피하에 1 개씩 매립하였다. 덧붙여, 컨트롤군 (제 1 군, 5 마리) 에는, 생리 식염수를 충전한 삼투압 펌프 (상동) 를 배부 피하에 1 개씩 매립하였다. 그 후 28 일간 사육하고, 2 - 3 회/주의 빈도로 체중을 측정하였다. 또, 최종일에는, 이소플루란 마취 하에서 채혈 치사시킨 후, 우대퇴골을 적출하여 길이를 측정하였다. 채취한 혈액은 혈장으로 한 후, 콜레스테롤 E-테스트 와코 (와코 순약 공업 주식회사 제조) 를 사용하여 콜레스테롤 농도를, 및 Corticosterone, ELISA Kit, AssayMax (96 well) (EC3001-1, ASSAYPRO 사 제조) 를 사용하여 혈장 중의 코르티코스테론 농도를 각각 측정하였다.

[0084]

[결과]

[0085]

텍사메타손 투여 기간 중의 래트의 체중 추이를 도 1 에, 최종일의 우대퇴골 길이를 도 2 에 나타내었다. 텍사메타손의 지속 피하 투여에 의해서, 체중이 용량 의존적으로 저하됨과 함께 대퇴골 길이가 용량 의존적으로 단축되었다. 또, 최종일에 채취한 혈장 중의 코르티코스테론 및 콜레스테롤 농도를 표 1 에 나타내었다. 텍사메타손의 지속 피하 투여에 의해서, 제 2 군 및 제 3 군에 있어서 코르티코스테론 농도가 제 1 군과 비교하여 유의하게 저하되고, 제 3 군에 있어서는 코르티코스테론의 생합성에 이용되는 콜레스테롤 농도의 상승이 확인되었다.

[0086]

본 시험에 있어서, 텍사메타손의 투여량은 0.009 ~ 0.027 mg/kg/일이고 (표 2), 텍사메타손주 「KS」 의 첨부 문서에 기재되어 있는 개, 고양이에 대한 투여량 (체중 1 kg 당 텍사메타손으로서 0.05 ~ 0.1 mg 을 1 일 1 회 피하 또는 근육 내에 주사한다) 보다 낮았다. 텍사메타손은 래트에 있어서도 약효 용량에 의해서 성장 장애를 유발하는 것을 확인하였다.

[0087]

[표 1 : 웅성 Cr1 : CD (SD) 래트에게 텍사메타손의 28 일간 지속 피하 투여 종료시의 혈장 중 코르티코스테론 및 콜레스테롤 농도]

표 1

(평균치 ± 표준 편차, n = 4 - 5)

군	덱사메타손 투여액 농도	코르티코스테론 (ng/ml)	콜레스테롤 (mg/dl)
제 1 군	매체만	324.1 ± 142.7	61.0 ± 4.1
제 2 군	0.5mg/ml	32.3 ± 10.9**	53.5 ± 7.0 ^{NS}
제 3 군	1 mg/ml	36.6 ± 36.3**	78.8 ± 11.6*

** : 제 1 군과의 사이에서 유의차 있음 (p < 0.01), * : 제 1 군과의 사이에서 유의차 있음 (p < 0.05), NS : 제 1 군과의 사이에서 유의차 없음 (p > 0.05),

[0088]

[표 2 : 각 군의 덱사메타손의 평균 투여량]

표 2

군	추정 투여량 (mg/kg/day)								
	1 일째	4 일째	7 일째	10 일째	14 일째	16 일째	18 일째	22 일째	28 일째
제 1 군	-	-	-	-	-	-	-	-	-
제 2 군	0.013	0.013	0.012	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.009
제 3 군	0.027	0.026	0.024	0.023	0.023	0.022	0.022	0.022	0.021

- : 매체만.

[0090]

[0091] <실시에 2> 덱사메타손으로 유발된 래트 성장 장애에 대한 CNP 유도체 (A) 의 동시 병용 투여 시험

[0092] [방법]

[0093] 삼투압 펌프 (MINI-OSMOTIC PUMP Model 2004, DURECT 사 제조, 유량 : 0.25 μl/hr, 28 일용) 에 1 mg/ml 농도의 덱사메타손 (덱사메타손주 「KS」, 료리츠 제약 주식회사 제조, 제 2 군 및 제 3 군), 또는, 컨트롤로서 생리 식염수 (제 1 군) 를 충전하고, 7 주령의 웅성 Cr1j : WI (Wistar) 래트의 배부 피하에 1 개씩 매립하였다.

그 때, 제 3 군에는 CNP 유도체 (A) 의 20 mg/ml 용액, 제 1 군 및 제 2 군에는 매체 1 (0.03 mol/l 아세트산 완충액 (pH 4.0)/1 % 벤질알코올/10 % 정제 백당) 을 충전한 삼투압 펌프 (상동) 를, 덱사메타손 또는 생리 식염수를 함유한 펌프와 동시에 배부 피하에 1 개씩 매립하였다. 그 후 28 일간 사육하고, 최종일에 체중, 체장 (코끝부터 항문까지의 길이) 및 꼬리 길이를 측정하고, 이소플루란 마취 하에서 복대동맥으로부터 채혈 후, 우대퇴골 및 주요 조직 (비장, 흉선, 간장, 심장 및 폐) 을 추출하였다. 대퇴골에 대해서는, 노기스를 사용하여 골 길이 및 골 폭을 측정하고, 주요 조직에 대해서는 중량을 측정하였다. 채취한 혈액은 혈장으로 한 후, 콜레스테롤 E-테스트 와코 (와코 순약 공업 주식회사 제조) 및 Quantikine (R) ELISA Mouse/Rat IGF-I Immunoassay (MG100, R&D Systems 제) 를 사용하여 콜레스테롤 및 IGF-1 농도를 측정하였다.

[0094] [결과]

[0095] 덱사메타손 및 CNP 유도체 (A) 를 28 일간 지속 피하 투여했을 때의 최종일의 체중, 체장 및 꼬리 길이를 표 3 에, 대퇴골의 길이와 굵기를 표 4 에 각각 나타내었다. 최종일의 체중은 덱사메타손을 투여한 제 2 군 및 제 3 군에서 제 1 군보다 유의하게 저하되고 (p < 0.01), CNP 유도체 (A) 병용 투여의 영향은 확인되지 않았다.

한편으로, 체장, 꼬리 길이 및 대퇴골 길이는 덱사메타손의 단독 투여 (제 2 군) 에서 유의하게 단축되고 (p < 0.01), CNP 유도체 (A) 의 병용 (제 3 군) 으로 제 1 군과 동일 레벨까지 회복하였다. 대퇴골 폭에 관해서는, 덱사메타손 투여로 단축되는 경향은 있었지만, 유의차는 없고 (p > 0.05), CNP 유도체 (A) 의 병용 영향도 확인되지 않았다. 최종일의 콜레스테롤 농도, IGF-1 농도를 표 5 에 나타내었다. 최종일에 채취한 혈장 중의 콜레스테롤 농도는, 덱사메타손의 단독 투여 (제 2 군) 에 의해서 유의하게 상승하였다 (p < 0.01).

제 3 군은 개체간에 편차가 확인되어, 제 1 및 제 2 군의 어느 쪽이나 유의차는 없었다. 혈장 중 IGF-1 농도는, 덱사메타손을 투여한 제 2 군 및 제 3 군에서 제 1 군보다 유의하게 저하되어 있었다 (p < 0.05).

최종일의 주요 조직 중량을 표 6 에 나타내었다. 텍사메타손을 투여한 제 2 및 제 3 군의 비장 및 흉선 중량 (체중비 (%)) 은 제 1 군과 비교하여 유의하게 저하되고, CNP 유도체 (A) 의 병용 투여 영향은 확인되지 않은 점에서, 텍사메타손의 면역 억제 효과는 CNP 유도체 (A) 의 병용 투여에 의해서 저해되지 않는 것으로 생각되었다.

[0096] 이상과 같이, 텍사메타손 투여 (제 2, 3 군) 에 의해서 유발된 골 신장 억제는 CNP 유도체의 병용 투여 (제 3 군) 에 의해서 명확하게 개선되는 것이 나타났다. 한편으로, 래트에게 텍사메타손을 투여하면, 체중 감소, 혈장 중 콜레스테롤 농도 상승, IGF-1 농도 저하, 비장 및 흉선 중량 저하 등의 증상이 관찰되었지만, 그것들에 대해서 CNP 유도체 (A) 를 병용 투여한 영향은 확인되지 않았다.

[0097] [표 3 : 웅성 CrIj : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손 및 CNP 유도체 (A) 를 28 일간 지속 피하 투여 종료시의 체중, 체장 및 꼬리 길이]

표 3

(평균치 ± 표준 편차, n = 6)

군	텍사메타손 투여액 농도	CNP 유도체 (A) 투여액 농도	해부시		
			체중 (g)	체장 (mm)	꼬리 길이 (mm)
제 1 군	생리 식염수	매체 1	445 ± 28	233 ± 5	210 ± 7
제 2 군	1 mg/ml	매체 1	352 ± 24**	219 ± 5**	195 ± 6**
제 3 군	1 mg/ml	20 mg/ml	344 ± 34**	233 ± 3 ^{NS}	211 ± 10 ^{NS}

매체 1 : 0.03 mol/l 아세트산 완충액 (pH 4.0)/1 % 벤질알코올/10 % 정제 백당
 ** : 제 1 군과의 사이에서 유의차 있음 (p < 0.01), NS : 제 1 군과의 사이에서 유의차 없음 (p > 0.05)

[0098]

[0099] [표 4 웅성 CrIj : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손 및 CNP 유도체 (A) 를 28 일간 지속 피하 투여 종료시의 우대퇴골의 길이 및 굵기]

표 4

(평균치 ± 표준 편차, n = 6)

군	우대퇴골	
	길이 (mm)	두께 (mm)
제 1 군	38.1 ± 0.4	8.1 ± 0.3
제 2 군	35.6 ± 0.6**	7.7 ± 0.4 ^{NS}
제 3 군	37.9 ± 0.6 ^{NS}	7.8 ± 0.2 ^{NS}

두께는 골단부 (최대 폭) 로 나타내었다
 ** : 제 1 군과의 사이에서 유의차 있음 (p < 0.01), NS : 제 1 군과의 사이에서 유의차 없음 (p > 0.05)

[0100]

[0101] [표 5 웅성 CrIj : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손 및 CNP 유도체 (A) 를 28 일간 지속 피하 투여 종료시의 혈장 중 콜레스테롤 및 IGF-1 농도]

표 5

(평균치 ± 표준 편차, n = 5 - 6)

군	혈장 중 농도	
	콜레스테롤 (mg/dl)	I G F - 1 (ng/ml)
제 1 군	69.7 ± 9.1	1452 ± 133
제 2 군	85.3 ± 5.9**	1207 ± 195*
제 3 군	77.0 ± 13.3 ^{NS}	1207 ± 132*

** : 제 1 군과의 사이에서 유의차 있음 (p < 0.01), * : 제 1 군과의 사이에서 유의차 있음 (p < 0.05)
NS : 제 1 군과의 사이에서 유의차 없음 (p > 0.05)

[0102]

[0103]

[표 6 음성 Cr1j : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손 및 CNP 유도체 (A) 를 28 일간 지속 피하 투여 종료시의 주요 조직 중량]

표 6

(평균치 ± 표준 편차, n = 6)
(平均値 ± 標準偏差, n=6)

군	상단 : 해부시 조직 중량 (g) [하단 : 체중비 (%)]				
	비장	흉선	간장	심장	폐
제 1 군	1.29 ± 0.22 (0.29 ± 0.04%)	0.45 ± 0.09 (0.10 ± 0.02%)	16.67 ± 1.29 (3.75 ± 0.22%)	1.19 ± 0.10 (0.27 ± 0.02%)	1.57 ± 0.10 (0.35 ± 0.03%)
제 2 군	0.79 ± 0.09 (0.22 ± 0.04%)	0.21 ± 0.05 (0.06 ± 0.01% ^{**})	14.48 ± 2.37 (3.80 ± 0.31% ^{NS})	1.05 ± 0.09 (0.29 ± 0.02% ^{NS})	1.29 ± 0.09 (0.36 ± 0.01% ^{NS})
제 3 군	0.76 ± 0.08 (0.23 ± 0.03% [*])	0.17 ± 0.04 (0.05 ± 0.01% ^{**})	15.03 ± 5.04 (3.91 ± 0.20% ^{NS})	0.93 ± 0.06 (0.28 ± 0.02% ^{NS})	1.26 ± 0.10 (0.37 ± 0.01% ^{NS})

** : 제 1 군과의 사이에서 유의차 있음 (p < 0.01), * : 제 1 군과의 사이에서 유의차 있음 (p < 0.05),
NS : 제 1 군과의 사이에서 유의차 없음 (p > 0.05)

[0104]

[0105]

<실시예 3> 텍사메타손 유발 성장 장애 모델 래트에 있어서의 인간형 CNP-53 또는 각종 CNP 유도체의 동시 병용 투여 시험

[0106]

[방법]

[0107]

삼투압 펌프 (MINI-OSMOTIC PUMP Model 2004, DURECT 사 제조, 유량 : 0.25 μ l/hr, 28 일용) 에 0.67 mg/ml 농도의 텍사메타손 (텍사메타손주 「KS」, 코리츠 제약 주식회사 제조) 을 충전하고, 5 주령의 음성 Cr1j : WI (Wistar) 래트 (5 마리/군, 제 2 ~ 제 6 군, 합계 25 마리) 의 배부 피하에 1 개씩 매립하였다. 그 때, 제 3 군에는 각각 CNP 유도체 (A), 제 4 군에는 인간형 CNP-53, 제 5 군에는 CNP 유도체 (B) 및 제 6 군에는 CNP 유도체 (C) 의 15 mg/ml 용액을 충전한 삼투압 펌프 (상동) 를 각각 동시에 배부 피하에 1 개씩 매립하였다. 정상 대조군 (제 1 군, 5 마리) 에는 아무것도 투여하지 않았다. 그 후, 28 일간 사육하여, 체중, 체장 및 꼬리 길이의 추이를 측정하였다. 최종일에, 이소플루란 마취 하에서 복대동맥으로부터 채혈 치사시키고, 채취한 혈액은 혈장으로 한 후, 레버러토리 어세이TM 콜레스테롤 (와코 순약 공업 주식회사 제조) 을 사용하여 콜레스테롤 농도를 측정하였다. 또, 채혈 치사 후에 우대퇴골 및 흉선을 적출하여 우대퇴골 길이 및 흉선 중량을 측정하였다.

[0108]

[결과]

[0109]

텍사메타손의 지속 피하 투여와 동일 시기에, 인간형 CNP-53, CNP 유도체 (A), (B) 또는 (C) 중 어느 것을 28 일간 병용 지속 피하 투여했을 때의 최종일의 체중, 체장 꼬리 길이 및 대퇴골 길이를 표 7 에 나타내었다. 텍사메타손의 단독 투여군 (제 2 군) 에서는, 래트의 체중의 증가, 그리고 체장 및 꼬리 길이의 신장이 유의하게 억제되고, 인간형 CNP-53, CNP 유도체 (A), (B) 또는 (C) 중 어느 것을 병용 투여한 군 (제 3 ~ 제 6 군)

에서는, 텍사메타손을 단독 투여한 군 (제 2 군) 과 비교하여, 체장 및 꼬리 길이의 신장이 유의하게 촉진되었다 (p < 0.05 또는 0.01). 대퇴골 길이는 텍사메타손의 투여로 유의하게 단축되고, 인간형 CNP-53, CNP 유도체 (A), (B) 또는 (C) 중 어느 것을 병용 투여한 군 (제 3 ~제 6 군) 에서는, 텍사메타손을 단독 투여한 군 (제 2 군) 보다 길어지는 경향이 확인되었다. 한편으로, 혈장 중 콜레스테롤 농도나 흉선 중량은, 텍사메타손을 단독 투여한 군 (제 2 군) 과, 인간형 CNP-53, CNP 유도체 (A), (B) 또는 (C) 중 어느 것을 병용 투여한 군 (제 3 군 ~제 6 군) 사이에서 명확한 차이는 확인되지 않았다 (표 8).

[0110] [표 7 : 5 주령의 웅성 Cr1j : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손 및 각종 CNP 유도체를 28 일간 지속 피하 투여했을 때의 투여 종료시의 체중, 신장, 꼬리 길이 및 우대퇴골 길이]

표 7

(평균치 ± 표준 편차, n = 5)

군	상단 : 해부시 (28 일간 투여 다음날) 하단 : () 안 : 투여전 값으로부터의 변화량 (Δ 값)			
	체중 (g)	체장 (mm)	꼬리 길이 (mm)	우대퇴골 길이 (mm)
제 1 군 정상 대조군	389 ± 27 -	219 ± 6 -	224 ± 8 -	36.5 ± 0.7 -
	(215 ± 24) **	(44.6 ± 5.4) **	(58.0 ± 4.5) **	**
제 2 군 텍사메타손 단독 투여	286 ± 17 **	199 ± 2 **	202 ± 3 **	32.7 ± 0.3 **
	(118 ± 15) **	(23.8 ± 2.4) **	(35.2 ± 3.7) **	-
제 3 군 텍사메타손 + CNP 유도체 (A)	307 ± 27 **	212 ± 12 NS	216 ± 13 NS	34.1 ± 1.5 †
	(136 ± 24) ** NS	(36.8 ± 10.4) NS †	(48.4 ± 11.4) NS †	NS
제 4 군 텍사메타손 + 인간형 CNP-53	302 ± 7 **	208 ± 4 **	210 ± 4 **	34.1 ± 1.3 †
	(130 ± 12) ** NS	(34.4 ± 6.0) † **	(44.6 ± 7.5) ** †	†
제 5 군 텍사메타손 + CNP 유도체 (B)	304 ± 23 **	210 ± 10 NS	205 ± 6 **	34.1 ± 1.7 †
	(133 ± 18) ** NS	(36.2 ± 9.3) NS †	(41.6 ± 4.3) ** †	NS
제 6 군 텍사메타손 + CNP 유도체 (C)	305 ± 12 **	208 ± 6 †	205 ± 1 **	34.1 ± 0.2 **
	(135 ± 11) ** NS	(34.2 ± 7.4) † †	(41.6 ± 1.9) ** **	**

제 1 군에 대해서,
 ## : 유의차 있음 (p < 0.01), # : 유의차 있음 (p < 0.05), NS : 유의차 없음 (p > 0.05)
 제 2 군에 대해서,
 ** : 유의차 있음 (p < 0.01), * : 유의차 있음 (p < 0.05), NS : 유의차 없음 (p > 0.05)

[0111]

[0112] [표 8 : 5 주령의 웅성 Cr1j : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손 및 각종 CNP 유도체를 28 일간 지속 피하 투여했을 때의 투여 종료시의 혈장 중 콜레스테롤 농도 및 흉선 중량]

표 8

(평균치 ± 표준 편차, n = 5)

군	혈장 중 콜레스테롤 농도 (mg/d l)	상단 : 해부시 흉선 중량 (g) [하단 : 체중비 (%)]
제 1 군 정상 대조군	55.8 ± 3.8 **	0.77 ± 0.08 (0.20 ± 0.01% **)
제 2 군 텍사메타손 단독 투여	65.1 ± 5.9	0.36 ± 0.04 (0.11 ± 0.02%)
제 3 군 텍사메타손 + CNP 유도체 (A)	61.3 ± 3.0 NS	0.41 ± 0.15 (0.13 ± 0.04% NS)
제 4 군 텍사메타손 + 인간형 CNP-53	62.1 ± 2.2 NS	0.33 ± 0.03 (0.11 ± 0.01% NS)
제 5 군 텍사메타손 + CNP 유도체 (B)	64.4 ± 0.8 NS	0.42 ± 0.14 (0.14 ± 0.04% †)
제 6 군 텍사메타손 + CNP 유도체 (C)	59.2 ± 7.4 NS	0.35 ± 0.06 (0.11 ± 0.02% NS)

** : 제 2 군과의 사이에서 유의차 있음 (p < 0.01), * : 제 2 군과의 사이에서 유의차 있음 (p < 0.05), NS : 제 2 군과의 사이에서 유의차 없음 (p > 0.05)

[0113]

[0114] <실시예 4> 텍사메타손으로 유발된 래트 성장 장애에 대한 CNP 유도체 (A) 의 추적 투여 시험

[0115] [방법]

[0116] 삼투압 펌프 (MINI-OSMOTIC PUMP Model 2004, DURECT 사 제조, 유량 : 0.25 μ l/hr, 28 일용) 에 0.67 mg/ml 농도의 텍사메타손 (텍사메타손주 「KS」, 교리츠 제약 주식회사 제조) 을 충전하고, 4 주령의 웅성 CrIj : WI (Wistar) 래트 (5 마리/군, 제 2 및 제 3 군) 의 배부 피하에 1 개씩 매립하고, 14 일간 사육하였다. 텍사메타손의 투여에 의해서 유의한 왜소화 (체중 저하, 체장 및 꼬리 길이 축소) 를 확인한 후, 제 3 군에만 CNP 유도체 (A) 의 15 mg/ml 용액을 충전한 삼투압 펌프 (상동) 를 추가로 배부 피하에 매립하고, 다시 28 일간 사육하였다. 사육 기간 중의 체중, 체장 및 꼬리 길이의 추이를 측정함과 함께, 최종일에 이소플루란 마취 하에서 복대동맥으로부터 채혈 치사시키고, 우대퇴골을 적출하여 길이를 측정하였다.

[0117] [결과]

[0118] 시험 기간 중의 래트의 체중, 체장 및 꼬리 길이의 추이를 도 3 에 나타내었다. 텍사메타손의 투여 개시 14 일 후에는, 제 1 군과 비교하여 제 2 군에서 유의한 체중 저하, 체장 및 꼬리 길이의 축소를 관찰하였다 (표 9). 그 후, 제 3 군에서만 CNP 유도체 (A) 의 투여를 개시한 결과, 투여하지 않는 군 (제 2 군) 에 비하여 체장 및 꼬리 길이의 신장이 커지고, CNP 유도체 (A) 투여 개시 28 일 후의 체장 및 꼬리 길이는 제 3 군에서 제 2 군보다 유의하게 길었다 ($p < 0.01$). 또, CNP 유도체 (A) 투여 개시 28 일 후의 대퇴골도, 병용하지 않은 군보다 유의하게 길고 ($p < 0.01$) (도 4), 체중 추이에는 CNP 유도체 (A) 의 병용 투여에 의한 유의한 변화는 확인되지 않았다.

[0119] [표 9 텍사메타손의 지속 피하 투여에 의해서 성장 장애를 유발한 웅성 CrIj : WI (Wistar) 래트에게 CNP 유도체 (A) 를 28 일간 지속 피하 투여했을 때의 체중, 체장 꼬리 길이 및 대퇴골 길이]

표 9

(평균치 ± 표준 편차, n = 5)

군		상단 : 텍사메타손 투여 14 일째 (CNP 유도체 (A) 투여전) 중단 : 해부시 (CNP 유도체 (A) 투여 28 일째) 하단 () 안 : 변화량 (Δ 값)			
		체중 (g)	체장 (mm)	꼬리 길이 (mm)	우대퇴골 길이 (mm) 해부시만
제 1 군	정상 대조군	229 ± 8**	195 ± 1**	188 ± 6**	36.7 ± 0.4**
		405 ± 8** (176 ± 4**)	227 ± 5** (32 ± 4**)	229 ± 6** (41 ± 3)	
제 2 군	텍사메타손 단독 투여	179 ± 12	174 ± 4	177 ± 7	32.9 ± 0.7
		308 ± 20 (129 ± 9)	204 ± 3 (30 ± 1)	202 ± 8 (25 ± 7)	
제 3 군	텍사메타손 + CNP 유도체 (A)	179 ± 15 ^{NS}	175 ± 5 ^{NS}	172 ± 6 ^{NS}	36.4 ± 0.2**
		333 ± 23 ^{NS} (154 ± 9**)	223 ± 6** (47 ± 5**)	219 ± 5 ** (47 ± 6**)	

() 안은 CNP 유도체 (A) 투여 개시부터의 증가분
** : 제 2 군과의 사이에서 유의차 있음 ($p < 0.01$), * : 제 2 군과의 사이에서 유의차 있음 ($p < 0.05$),
NS : 제 2 군과의 사이에서 유의차 없음 ($p > 0.05$)

[0120]

[0121] <실시예 5> 래트에 있어서의 각종 스테로이드제와 CNP 유도체 (A) 의 동시 병용 투여 시험

[0122] [방법]

[0123] 0.3 mg/ml 농도의 텍사메타손 (텍사메타손주 「KS」, 교리츠 제약 주식회사 제조를 생리 식염수로 희석), 0.1 % 폴리소르베이트 함유 식염수에 현탁한 숙신산프레드니솔론 (와코 순약 공업 주식회사 제조, 프레드니솔론으로서 5 mg/ml 농도), 또는 0.1 % 폴리소르베이트 함유 식염수에 현탁한 2 프로피온산베타메타손 (와코 순약 공업 주식회사 제조, 베타메타손으로서 0.3 mg/ml 농도) 를, 4 주령의 웅성 CrIj : WI (Wistar) 래트 각 10 마리의 배부 피하에 1 ml/kg 의 용량으로 1 일 1 회 28 일간 투여하였다. 컨트롤군 (5 마리, 1 군) 에는 아무 것도 투여하지 않았다. 그 때, 각 10 마리 중 5 마리 (제 2, 제 4, 제 6 군) 에는, 매체 (0.03 mol/l 아세트산 완충액 (pH 4.0)/1 % 벤질알코올/10 % 정제 백당) 을, 나머지 5 마리 (제 3, 제 5, 제 7 군) 에는 CNP 유도체 (A) 의 1 mg/ml 용액을 배부 피하에 1 ml/kg 의 용량으로 1 일 1 회 28 일간 병용 투여하였다. 최종 투여 다음날에, 이소플루란 마취 하에서 체중, 체장 및 꼬리 길이를 측정 후, 복대동맥으로부터 채혈 치사시키고, 우대퇴골을 적출하여 대퇴골 길이를 측정하였다.

[0124] [결과]

[0125] 텍사메타손, 프레드니솔론 및 베타메타손의 어느 것에 있어서도, 28 일간의 반복 투여에 의해서, 래트의 체중 증가의 유의한 억제, 그리고 체장, 꼬리 길이 및 대퇴골의 신장의 유의한 저하가 관찰된 ($p < 0.05$ 또는 0.01) (표 10) 점에서, 이들 스테로이드제는, 래트에 있어서 성장 장애를 유발하는 것으로 생각되었다. 이들 스테로이드제를 반복 투여한 것과 동일 시기에 CNP 유도체 (A) 를 1 mg/kg 의 용량으로 병용 반복 피하 투여한 결과, CNP 유도체 (A) 를 투여하지 않은 군과 비교하여, 체장, 꼬리 길이 및 대퇴골의 유의한 신장이 확인되었다 ($p < 0.05$ 또는 0.01). 이러한 것들로부터, CNP 유도체 (A) 는 텍사메타손뿐만 아니라, 프레드니솔론이나 베타메타손과 같은 다른 스테로이드제의 투약에 의해서 유발된 성장 장애를 경감 및/또는 개선하는 것이 나타났다.

[0126] [표 10 웅성 Crlj : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손, 프레드니솔론 또는 베타메타손을 하루 1 회 28 일간 반복 피하 투여한 후의 체중, 체장, 꼬리 길이 및 우대퇴골 길이]

표 10

(평균치 ± 표준 편차, n = 5)

군		상단 : 해부시 (CNP 유도체 (A) 28 일간 투여 다음날) 하단 () 안 : 투여전 값으로부터의 변화량 (Δ 값)			
		체중 (g)	체장 (mm)	꼬리 길이 (mm)	우대퇴골 길이 (mm)
제 1 군	정상 대조군	356 ± 18	218 ± 6	218 ± 2	34.9 ± 0.5
		(250 ± 17)	(68 ± 6)	(92 ± 7)	-
제 2 군	텍사메타손 + 매체	176 ± 5 **	177 ± 4 **	174 ± 4 **	28.3 ± 0.4 **
		(69 ± 5) **	(27 ± 5) **	(47 ± 7) **	-
제 3 군	텍사메타손 + CNP 유도체 (A)	187 ± 10 **	189 ± 3 **	184 ± 4 **	29.6 ± 0.3 **
		(81 ± 8) **	(39 ± 3) **	(56 ± 3) **	-
제 4 군	프레드니솔론 + 매체	298 ± 14 **	209 ± 4 †	206 ± 6 **	33.3 ± 0.3 **
		(191 ± 14) **	(58 ± 4) †	(79 ± 9) †	-
제 5 군	프레드니솔론 + CNP 유도체 (A)	315 ± 21 †	221 ± 3 NS	225 ± 7 ND	34.2 ± 0.5 NS †
		(208 ± 17) **	(71 ± 4) NS **	(97 ± 5) NS **	-
제 6 군	베타메타손 + 매체	315 ± 11 **	211 ± 2 †	213 ± 4 †	33.9 ± 0.5 †
		(208 ± 10) **	(59 ± 5) †	(82 ± 3) †	-
제 7 군	베타메타손 + CNP 유도체 (A)	331 ± 20 NS	230 ± 4 **	229 ± 1 **	35.6 ± 0.5 NS **
		(224 ± 18) † NS	(78 ± 6) **	(101 ± 4) **	-

제 1 군에 대해서,
 ## : 유의차 있음 ($p < 0.01$), # : 유의차 있음 ($p < 0.05$), NS : 유의차 없음 ($p > 0.05$)
 제 2 군 vs 제 3 군, 제 4 vs 제 5 군, 제 6 vs 제 7 군의 2 군간에서의 유의차 검정에서 제 2, 제 4 또는 제 6 군에 대해서
 **: 유의차 있음 ($p < 0.01$), *: 유의차 있음 ($p < 0.05$), NS : 제 1 군과의 사이에서 유의차 없음 ($p > 0.05$)

[0127]

[0128] <실시예 6> 텍사메타손으로 유발된 래트 성장 장애에 대한 CNP 유도체 (A) 와 인간 성장 호르몬의 작용 비교 시험

[0129] [방법]

[0130] 삼투압 펌프 (MINI-OSMOTIC PUMP Model 2004, DURECT 사 제조, 유량 : $0.25 \mu\text{l/hr}$, 28 일용) 에 0.67 mg/ml 농도의 텍사메타손 (텍사메타손주 「KS」, 코리츠 제약 주식회사 제조) 을 충전하고, 4 주령의 웅성 Crlj : WI (Wistar) 래트 (5 마리/군, 제 2 ~ 제 4 군, 합계 15 마리) 의 배부 피하에 1 개씩 매립하였다. 또, 제 3 군에는 CNP 유도체 (A) 의 1 mg/ml 용액 (매체는 0.03 mol/l 아세트산 완충액 ($\text{pH } 4.0$)/ 1% 벤질알코올/ 10% 정제 백당) 을, 제 4 군에는 인간형 성장 호르몬 제제 (소마트로핀 BS 피하주 10 mg 「산도」) 를 인산 완충액으로 1 mg/ml 로 희석한 용액을 래트 각 5 마리의 배부 피하에 2 ml/kg 의 용량으로 1 일 1 회 28 일간 투여하였다. 정상 대조군 (5 마리, 1 군) 에는 아무것도 투여하지 않았다. 최종일에, 체중, 체장 및 꼬리 길이를 측정 후, 이소플루란 마취 하에서 복대동맥으로부터 채혈 치사시킨 후, 좌대퇴골을 적출하여 골 길이를 측정 후, 골 단부의 병리 조직 표본을 만들었다.

[0131] [결과]

[0132] 텍사메타손과 CNP 유도체 (A) 또는 인간형 성장 호르몬을 병용 투여했을 때의 체중, 체장, 꼬리 길이 및 좌대퇴골 길이를 표 11 에 나타내었다. 텍사메타손의 단독 투여군 (제 2 군) 에서는, 체중의 증가, 그리고 체장 및 꼬리 길이의 신장이 유의하게 억제되었다 ($p < 0.01$). CNP 유도체 (A) 를 병용 투여한 군 (제 3 군) 에

서는, 텍사메타손을 단독 투여한 군 (제 2 군) 과 비교하여, 체장 및 꼬리 길이의 신장 장애가 유의하게 개선되었다 ($p < 0.01$ 및 $p < 0.05$). 인간형 성장 호르몬을 병용 투여한 군 (제 4 군) 에서는, 텍사메타손을 단독 투여한 군 (제 2 군) 과 비교하여, 체장 및 꼬리 길이의 신장에 유의한 차이는 확인되지 않았다 ($p > 0.05$).

최종일의 좌대퇴골 길이는, 제 1 군과 비교하여, 텍사메타손의 투여 (제 2 군) 로 유의하게 짧고 ($p < 0.01$), CNP 유도체 (A) 를 병용 투여한 군 (제 3 군) 에서는, 텍사메타손을 단독 투여한 군 (제 2 군) 보다 유의하게 길었다 ($p < 0.01$). 인간형 성장 호르몬을 병용 투여한 군 (제 4 군) 과 텍사메타손을 단독 투여한 군 (제 2 군) 사이에서 유의차는 없었다 ($p > 0.05$). 좌대퇴골의 골 단부의 성장판 연골층은, 텍사메타손의 단독 투여에 의해서 협소화되고, CNP 유도체 (A) 또는 인간형 성장 호르몬의 병용 투여에 의해서, 텍사메타손을 단독 투여시에 비해서 비후한 경향이 확인되었다 (도 5).

[0133] [표 11 : 4 주령의 옹성 Cr1j : WI (Wistar) 래트에게 텍사메타손을 28 일간 지속 피하 투여했을 때의 투여 종료시의 체중, 신장, 꼬리 길이 및 우대퇴골 길이와 그에 대한 CNP 유도체 (A) 또는 인간형 성장 호르몬 병용 반복 피하 투여의 영향]

표 11

(평균치 ± 표준 편차, n = 4 또는 5)

군	상단 : 해부시 (28 일간 투여 다음날) 하단 () 안 : 투여전 값으로부터의 변화량 (Δ 값)	체중 (g)	체장 (mm)	꼬리 길이 (mm)	우대퇴골 길이 (mm)
제 1 군 정상 대조군		339 ± 24 -	219 ± 3 -	218 ± 6 -	33.8 ± 0.4 -
		(232 ± 25) **	(66.8 ± 3.4) **	(85.8 ± 3.4) **	**
제 2 군 텍사메타손 단독 투여		245 ± 12 **	199 ± 4 **	197 ± 5 **	31.3 ± 0.2 **
		(139 ± 13) **	(46.8 ± 4.7) **	(65.0 ± 4.9) **	-
제 3 군 텍사메타손 + CNP 유도체 (A)		250 ± 20 **	210 ± 5 **	209 ± 2 †	32.7 ± 0.4 **
		(145 ± 15) † NS	(56.3 ± 2.9) **	(73.5 ± 1.3) ** †	**
제 4 군 텍사메타손 + 인간형 성장 호르몬		255 ± 7 **	199 ± 5 **	199 ± 3 **	31.7 ± 0.6 **
		(149 ± 3) ** NS	(44.8 ± 3.7) ** NS	(66.8 ± 5.0) ** NS	NS

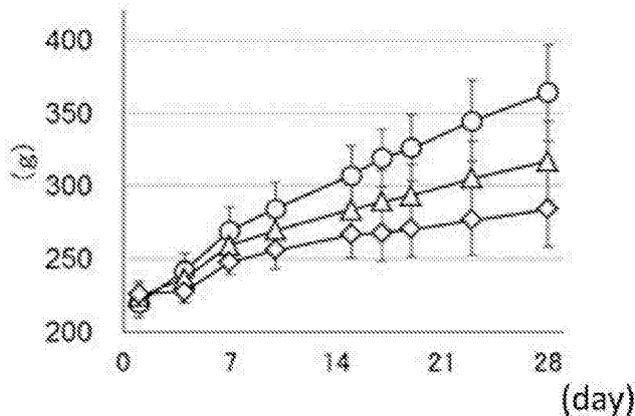
†) 시험 도중에서 텍사메타손을 충전한 펌프가 피하로부터 탈락한 1 예를 제외했기 때문에, 4 예로 되었음

제 1 군에 대해서, ## : 유의차 있음 ($p < 0.01$), # : 유의차 있음 ($p < 0.05$), NS : 유의차 없음 ($p > 0.05$)
제 2 군에 대해서, ** : 유의차 있음 ($p < 0.01$), * : 유의차 있음 ($p < 0.05$), ns : 유의차 없음 ($p > 0.05$)

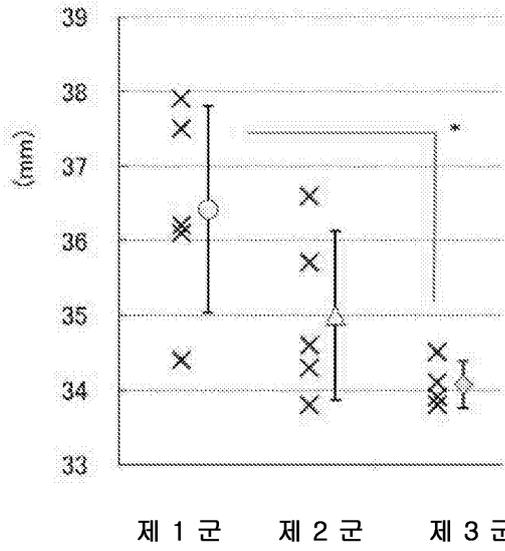
[0134]

도면

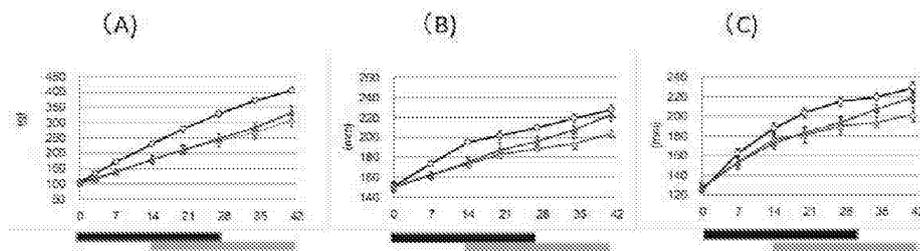
도면1



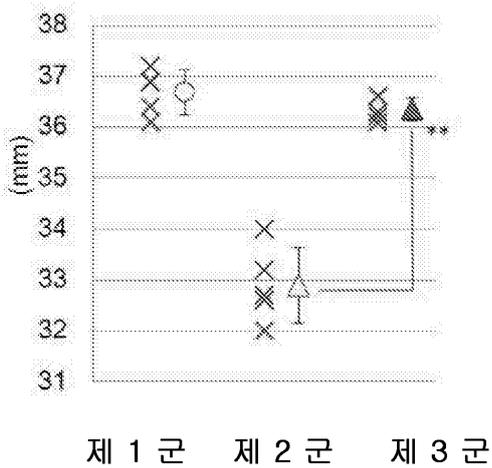
도면2



도면3



도면4



20 25 30
 Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
 35 40 45

Ser Gly Leu Gly Cys
 50

<210

> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 3

Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Rana sp.

<400> 4

Gly Tyr Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
 1 5 10 15

Phe Ser Gly Leu Gly Cys
 20

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> A ring structure portion of CNP

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(12)

<223> the amino acid could be Ser or Ala on position 11 and Met, Phe or
 Glu on position 12

<400> 5

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Xaa Xaa Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

Cys

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric CNP A of US2010-305031 and W02009/142307

<400> 6

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

1 5 10 15

Val Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu

 20 25 30

Gly Cys

<210> 7

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric CNP B (SEQ ID NO:110) of US2010-305031 and W02009/142307

<400> 7

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

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

 20 25 30

Pro Arg

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric CNP D (SEQ ID NO:125) of US2010-305031 and W02009/142307

<400> 8

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro
 20 25 30

Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
 35

<210> 9

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric CNP E (SEQ ID NO:126) of US2010-305031 and W02009/142307

<400> 9

Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro
 1 5 10 15
 Arg Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu
 20 25 30

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

Gln Pro Arg
 50

<210> 10

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric CNP F (SEQ ID NO:127) of US2010-305031 and W02009/142307

<400> 10

Arg Pro Gln Leu Lys Ala Pro Pro Lys Lys Ser Glu Lys Arg Gln Gln
 1 5 10 15
 Val Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu
 20 25 30

Gly Cys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu

35 40 45

Gln Pro Arg

50

<210> 11

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric CNP G (SEQ ID NO:128) of US2010-305031 and WO2009/142307

<400> 11

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

1 5 10 15

Arg Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu

20 25 30

Gly Cys

<210> 12

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric CNP I (SEQ ID NO:130) of US2010-305031 and WO2009/142307

<220><221> Amidation

<222> (34)..(34)

<223> The Arg residue on C-terminal is amidated

<220><221> Amidation

<222> (34)..(34)

<223> The 34Arg residue on C-terminal end is amidated

<400> 12

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Arg

<210> 13

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric CNP J (SEQ ID NO:157) of US2010-305031 and
WO2009/142307, and CNP derivative A of current invention.

<400> 13

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys Val Gln Gln Arg Lys Asp Ser Lys Lys Pro

 20 25 30

Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

 35

<210> 14

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric CNP K (SEQ ID NO:158) of US2010-305031 and
WO2009/142C307

<400> 14

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

Cys Ala Gly Ser Val Asp His Lys Gly Lys Gln Arg Lys Val Val Asp

 20 25 30

His Pro Lys Arg

 35

<210> 15

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CNP derivative B of current invention, which is disclosed in Am. J. Hum. Gent.(2012),
91(6), 1108-1114

<400> 15

Pro Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys
1 5 10 15
Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
 20 25 30
Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35