

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-521984

(P2012-521984A)

(43) 公表日 平成24年9月20日 (2012.9.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 36/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 W	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	4 C 0 8 8
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-501967 (P2012-501967)
 (86) (22) 出願日 平成22年3月29日 (2010.3.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年11月28日 (2011.11.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/SG2010/000122
 (87) 国際公開番号 W02010/110755
 (87) 国際公開日 平成22年9月30日 (2010.9.30)
 (31) 優先権主張番号 61/164, 352
 (32) 優先日 平成21年3月27日 (2009.3.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511233681
 モリーク ビーティーイー リミテッド
 MOLEAC PTE. LTD.
 シンガポール国 シンガポール 1 3 8 6
 6 7 ヘリオス ナンバー09-08 バ
 イオポリス ウェイ 1 1
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100119530
 弁理士 富田 和幸
 (74) 代理人 100136858
 弁理士 池田 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞成長を促進するための治療

(57) 【要約】

中枢神経系または末梢神経系の組織における神経細胞の神経細胞成長のための組成物の使用の開示がある。また神経細胞の増殖または分化を誘発するための方法の開示もある。

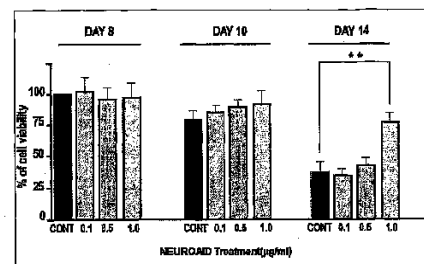


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（レッド・サゲルーツまたはダン・シェン）、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウィルド、ポリガラ・シビリカ・エル、またはユアンジの根）およびリゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフスイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）およびそれらの組合せからなる群より選ばれる少なくとも 2 つの成分を含む組成物の、中枢または末梢の神経系の組織での神経伸長および神経細胞の増加を促進するための薬の製造における使用。

【請求項 2】

さらに、組成物は、ラディックス・アストラガリ（メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根）、ラディックス・ペオニア・ルブラ（レッド・ピオニールーツ、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）のフラワー、ラディックスアンジェリカシネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）およびそれらの組合せからなる群より選ばれる成分を含む、請求項 1 に請求する使用。

【請求項 3】

さらに、組成物は、バタス・マルテンシ（サソリまたはクアンキシの乾燥体）、ユーポリファーガ・セウ・セテレオフィーガ（オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオフィーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体）、カルクラス・ボビス・アーティファクタス（ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウファン）、コルヌ・サイガ・タタリカ（アンテロープホルンまたはリングヤングジャオ）およびヒルの乾燥体（ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ）からなる群より選ばれる成分を含む、請求項 1 または請求項 2 に請求するような使用。

【請求項 4】

前記組成物は、ヒトに薬として組み合わせて、順次にまたは別々に投与するのに適切である、先行する請求項のいずれかに請求する使用。

【請求項 5】

組成物は、少なくとも 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, または 14 の成分を含む、請求項 2～4 のいずれかに請求する使用。

【請求項 6】

薬は、傷つけられたかまたは病気にかかった組織での、神経伸長および神経細胞の増加を促進する、先行する請求項のいずれかに請求する使用。

【請求項 7】

病気は、筋萎縮性側索硬化（ALS）、脳膿瘍、脳虚血、糖尿病に関係する脳萎縮、皮質下梗塞および白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症（CADASIL）、脳血管障害、皮質基底核神経節変性（CBGD）、慢性虚血、クロイツフェルトーヤコブ症候群、ダンディ・ウォーカー症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、老年性認知症、後天性免疫不全症候群（エイズ）に関係する認知症、脳脊髄炎、本態性振戦、フリードライヒ失調症、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハンチントン病、水頭症、低酸素症、致死性家族性不眠症、一過性脳虚血発作、クールー病、ランドウ・クレフナー症候群、レビー小体病、マチャド-ジョセフ病、細菌性およびウイルス性髄膜炎、片頭痛障害、骨髄炎、オリブ橋小脳萎縮症（olivopontocerebellar atrophies、olivopontocerebellar atrophies）、パントテン酸キナーゼ関連の神経変性、灰白髄炎、ポリオ後症候群、プリオン病、偽脳腫瘍、シャイ・ドレーガー症候群、シュタイネルト病、乳児痙攣、進行性核上麻痺、脊髄空洞症、視床病、チック障害、トゥレット症候群およびぶどう膜髄膜脳炎症候群のいずれか 1 つの病気から選ばれる、請求項 6 に請求する使用。

【請求項 8】

さらに、中枢または末梢の神経系の組織での神経伸長および神経細胞の増加を促進するために西洋薬で用いられる薬剤が包含される、先行する請求項のいずれかに請求する使用。

【請求項 9】

前記組成物および前記西洋薬は、ヒトに薬として組み合わせて、順次にまたは別々に投与するのに適切である、請求項 8 に請求する使用。

【請求項 10】

西洋薬は、骨形成タンパク質 (BMPs)、上皮増殖因子 (EGF)、エリトロポエチン (EPO)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、顆粒球-コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様増殖因子 (IGF)、ミオスタチン (GDF-8)、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン、血小板由来増殖因子 (PDGF)、トロンボポエチン (TPO)、形質転換増殖因子アルファ (TGF- α)、形質転換増殖因子ベータ (TGF- β)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、インターロイキン 1 β (IL-1 β)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-21、IL-33、M-CSF、ノギン、インターフェロン (IFN)- α 、IFN- β および IFN- γ のような増殖因子からなる群より選ばれる、請求項 8 または 9 に請求する使用。

【請求項 11】

ラディックス・アストラガリ (メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ (レッド・サゲルートまたはダン・シェン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ (レッド・ピオニールート、ペオニア・ラクチフロラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング (チュアン・キシオング) の根茎、ラディックスアンジェリカシネンシス (チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根)、カーサマス・ティンクトリアス (サフラワーまたはホンヒュア) のフラワー、プラナス・パーシカ (ピーチシードまたはタオレン)、ラディックス・ポリガラ (シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウィルド、ポリガラ・シビリカ・エル、またはユアンジの根) およびリゾマ・アコリ・タタリノビ (グラスリーフスイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎) の少なくとも 2 つの成分を含む組成物の、うつ、精神医学的な徴候、自然老化および外傷性脳細胞死の群から選ばれる状態を有する受動体を処置するための薬の製造における使用。

【請求項 12】

さらに、組成物は、バタス・マルテンシ (サソリまたはクアンキシの乾燥体)、ヒルの乾燥体 (ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ)、ユーポリファーガ・セウ・セテレオファーガ (オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオファーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体)、カルクラス・ボビス・アーティファクタス (ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウフアン)、およびコルヌ・サイガ・タタリカ (アンテロープホルンまたはリングヤングジャオ) からなる群より選ばれる成分を含む、請求項 11 に請求する使用。

【請求項 13】

組成物は、少なくとも 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, または 14 の成分を含む、請求項 11 または 12 に請求する使用。

【請求項 14】

さらに、うつ、精神医学的な徴候、自然老化および外傷性脳細胞死の群から選ばれる状態を有する受動体を処置するために西洋薬で用いられる薬剤が包含される、請求項 11 ~ 13 のいずれかに請求する使用。

【請求項 15】

前記組成物および前記西洋薬は、ヒトに薬として組み合わせて、順次にまたは別々に投与するのに適切である、請求項 14 に請求する使用。

【請求項 16】

西洋薬は、カルシウムチャンネル遮断薬（D-600、ジルチアゼム、ニトレンジピン、ニモジピン、ニフェジピン、フルナリジン、フルスピリレン、イスラジピン、ニカルジピン、PY 108-068、ベラパミルおよびトリアパミル）、遊離基捕捉剤（エブセレン、チリラザド、NXY-059）、増殖因子で、骨形成タンパク質（BMPs）、上皮増殖因子（EGF）、エリトロポエチン（EPO）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子（GM-CSF）、肝細胞増殖因子（HGF）、インスリン様増殖因子（IGF）、ミオスタチン（GDF-8）、神経成長因子（NGF）、ニューロトロフィン、血小板由来増殖因子（PDGF）、トロンプオエチン（TPO）、形質転換増殖因子アルファ（TGF- α ）、形質転換増殖因子ベータ（TGF- β ）、血管内皮増殖因子（VEGF）、インターロイキン1 β （IL-1 β ）、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-21、IL-33、M-CSF、ノギン、インターフェロン（IFN）- α 、IFN- β およびIFN- γ のようなもの、ソルリン、ピクロゾタン、S-18986、AL-208、ピリドキサル5-リン酸、ONO-2231およびカリウムチャンネルTREK-1を活性化することが可能な薬剤からなる群より選ばれる、請求項14または15に請求する使用。

10

【請求項 17】

ラディックス・アストラガリ（メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根）、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（レッド・サゲルートまたはダン・シェン）、ラディックス・ペオニア・ルブラ（レッド・ピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、ラディックスアンジェリカシネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）のフラワー、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウィルド、ポリガラ・シビリカ・エル、またはユアンジの根）およびリゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフスイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）の少なくとも3つの成分を含む組成物の、発作または神経変性の傾向がある対象体またはその危険性のある対象体での発作または神経変性の影響を減らすための薬の製造における使用。

20

30

【請求項 18】

さらに、組成物は、バタス・マルテンシ（サソリまたはクアンキシの乾燥体）、ヒルの乾燥体（ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ）、ユーポリファーガ・セウ・セテレオファーガ（オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオファーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体）、カルクラス・ボビス・アーティファクタス（ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアルまたはレンゴン・ニウフアン）、およびコルヌ・サイガ・タタリカ（アンテロープホルンまたはリングヤングジャオ）からなる群より選ばれる成分を含む、請求項17に請求する使用。

【請求項 19】

組成物は、少なくとも4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, または14の成分を含む、請求項17または18に請求する使用。

40

【請求項 20】

神経変性は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化（ALS）、脳膿瘍、脳虚血、糖尿病に関係する脳萎縮、皮質下梗塞および白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症（CADASIL）、脳血管障害、皮質基底核神経節変性（CBGD）、慢性虚血、クロイツフェルト-ヤコブ症候群、ダンディ・ウォーカー症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、老年性認知症、後天性免疫不全症候群（エイズ）に関係する認知症、脳脊髄炎、本態性振戦、フリードライヒ失調症、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハンチントン病、水頭症、低酸素症、致死性家族性不眠症、一過性脳虚血発作、クーラー病、ラン

50

ドウ・クレフナー症候群、レビー小体病、マチャド-ジョセフ病、細菌性およびウイルス性髄膜炎、片頭痛障害、骨髄炎、オリブ橋小脳萎縮症 (olivopontocerebellar atrophies、olivopontocerebellar atrophies)、パントテン酸キナーゼ関連の神経変性、灰白髄炎、ポリオ後症候群、プリオン病、偽脳腫瘍、シャイ・ドレーガー症候群、乳児痙攣、パーキンソン病、進行性核上麻痺、シュタイネルト病、脊髄空洞症、視床病、チック障害、トゥレット症候群、ぶどう膜髄膜脳炎症候群、全虚血および局所虚血および他の心血管病のいずれか1つの病気によって生じる、請求項17～19のいずれかに請求する使用。

【請求項21】

さらに、発作または神経変性の傾向がある対象体またはその危険性のある対象体での発作または神経変性の影響を減らすために西洋薬で用いられる薬剤が包含される、請求項17～20のいずれかに請求する使用。

10

【請求項22】

前記組成物および前記西洋薬は、ヒトに薬として組み合わせて、順次にまたは別々に投与するのに適切である、請求項21に請求する使用。

【請求項23】

西洋薬は、カルシウムチャンネル遮断薬 (D-600、ジルチアゼム、ニトレンジピン、ニモジピン、ニフェジピン、フルナリジン、フルスピリレン、イスラジピン、ニカルジピン、PY 108-068、ベラパミルおよびトリアパミル)、遊離基捕捉剤 (エブセレン、チリラザド、NXY-059)、ガングリオシドGM (非NMDAアンタゴニスト)、シナプス前グルタミン酸放出インヒビター、リルゾール、およびジスフェントナトリウム (NXY059)、カンデサルタン (candesaran、candesartan)、カフェイノール (カフェイン+エタノール)、RVX-208、SUN-N4057、SUN-N8075、スタチン (atatsins、statins) および他のコレステロール低下薬物の併用、エリトロポエチン、セレブロライシン、CDP-コリン (CDP-cholin、CDP-choline) (シチジン5'-ジホスホコリン) およびカリウムチャンネルTREK-1を活性化することが可能な薬剤からなる群より選ばれる、請求項21または22に請求する使用。

20

【請求項24】

ラディックス・アストラガリ (メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ (レッド・サゲルーツまたはダン・シェン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ (レッド・ピオニールーツ、ペオニア・ラクチフローラ・バル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング (チュアン・キシオング) の根茎、ラディックスアンジェリカシネンシス (チャイニーズ・アンジェリカまたはタンゲイの根)、カーサマス・ティンクトリアス (サフラワーまたはホンヒュア) のフラワー、プラナス・パーシカ (ピーチシードまたはタオレン)、ラディックス・ポリガラ (シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウィルド、ポリガラ・シビリカ・エル、またはユアンジの根) およびリゾマ・アコリ・タタリノビ (グラスリーフスイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎) の少なくとも3つの成分を含む組成物の、細胞増殖を促進するための薬の製造における使用。

30

【請求項25】

さらに、組成物は、バタス・マルテンシ (サソリまたはクアンキシの乾燥体)、ヒルの乾燥体 (ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ)、ユーポリファーガ・セウ・セテレオフィーガ (オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオフィーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体)、カルクラス・ボビス・アーティファクタス (ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウファン)、およびコルヌ・サイガ・タタリカ (アンテロープホルンまたはリングヤングジャオ) からなる群より選ばれる成分を含む、請求項24に請求する使用。

40

【請求項26】

組成物は、少なくとも4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, または14の成分を含む、請求項24または25に請求する使用。

50

【請求項 27】

前記薬は、幹細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、心筋、平滑筋細胞、肝細胞、腎細胞、ランゲルハンス島および上皮性皮膚細胞からなる群より選ばれる細胞の増殖を促進する、請求項 23～24 のいずれかに請求する使用。

【請求項 28】

さらに細胞増殖を促進するために西洋薬で用いられる薬剤が包含される、請求項 24～27 のいずれかに請求する使用。

【請求項 29】

前記組成物および前記西洋薬は、薬として組み合わせて、順次にまたは別々に投与するのに適切である、請求項 28 に請求する使用。

10

【請求項 30】

西洋薬は、骨形成タンパク質 (BMPs)、上皮増殖因子 (EGF)、エリトロポエチン (EPO)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、顆粒球-コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、インスリン様増殖因子 (IGF)、ミオスタチン (GDF-8)、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン、血小板由来増殖因子 (PDGF)、トロンボポエチン (TPO)、形質転換増殖因子アルファ (TGF- α)、形質転換増殖因子ベータ (TGF- β)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、インターロイキン 1 β (IL-1 β)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-21、IL-33、M-CSF、ノギン、インターフェロン (IFN)- α 、IFN- β および IFN- γ のような増殖因子からなる群より選ばれる、請求項 28 または 29 に請求する使用。

20

【請求項 31】

ラディックス・アストラガリ (メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ (レッド・サゲルートまたはダン・シェン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ (レッド・ピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・バル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング (チュアン・キシオング) の根茎、ラディックスアンジェリカシネンシス (チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根)、カーサマス・ティンクトリアス (サフラワーまたはホンヒュア) のフラワー、プラナス・パーシカ (ピーチシードまたはタオレン)、ラディックス・ポリガラ (シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウィルド、ポリガラ・シビリカ・エル、またはユアンジの根) およびリゾマ・アコリ・タタリノビ (グラスリーフスイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎) の少なくとも 1 つの成分を含む組成物の、中枢または末梢の神経系の傷つけられたかまたは病気にかかった組織を有する受動体を処置するための薬、および補助剤の製造における使用。

30

【請求項 32】

さらに、組成物は、バタス・マルテンシ (サソリまたはクアンキシの乾燥体)、ヒルの乾燥体 (ヒルド・ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ)、ユーポリファーガ・セウ・セテレオフィーガ (オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオフィーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体)、カルクラス・ボビス・アーティファクタス (ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウファン)、およびコルヌ・サイガ・タタリカ (アンテロープホルンまたはリングヤングジャオ) からなる群より選ばれる成分を含む、請求項 31 に請求する使用。

40

【請求項 33】

薬および補助剤は、受動体に組み合わせて、順次にまたは別々に投与するのに適切である、請求項 31 または 32 に請求する使用。

【請求項 34】

組成物は、少なくとも 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 または 14 の成分を含む、請求項 31～33 のいずれかに請求する使用。

【請求項 35】

50

さらに、中枢または末梢の神経系の傷つけられたかまたは病気にかかった組織を有する受動体を処置するための西洋薬で用いられる薬剤が包含される、請求項 31～34 のいずれかに請求する使用。

【請求項 36】

前記組成物および前記西洋薬の薬は、受動体に組み合わせて、別々にまたは順次に投与するのに適切である、請求項 35 に請求する使用。

【請求項 37】

西洋薬は、カルシウムチャネル遮断薬（D-600、ジルチアゼム、ニトレンジピン、ニモジピン、ニフェジピン、フルナリジン、フルスピリレン、イスラジピン、ニカルジピン、PY 108-068、ベラパミルおよびトリアパミル）、カルシウムキレート剤（DP-b99）、遊離基捕捉剤（エブセレン、チリラザド、NXY-059）、GABA 受容体アゴニスト（ジアゼパム、バクロフェン）、AMPA アゴニスト（ZK 200775/MPQX）、競合的 NMDA アンタゴニスト（アプチガネル/セレステイト、CP 101, 606、デキストロルファン（dextrophan、dextrorphan）、MK 801/ジゾシルピン、レマセミド）、グリシン部位アンタゴニスト（GV 150526、ACEA 1021）、ポリアミン部位アンタゴニスト（エリプロディル）、増殖因子で、骨形成タンパク質（BMPs）、上皮増殖因子（EGF）、エリトロポエチン（EPO）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子（GM-CSF）、肝細胞増殖因子（HGF）、インスリン様増殖因子（IGF）、ミオスタチン（GDF-8）、神経成長因子（NGF）、ニューロトロフィン、血小板由来増殖因子（PDGF）、トロンボポエチン（TPO）、形質転換増殖因子アルファ（TGF- α ）、形質転換増殖因子ベータ（TGF- β ）、血管内皮増殖因子（VEGF）、インターロイキン 1 β （IL-1 β ）、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-21、IL-33、M-CSF、ノギン、インターフェロン（IFN）- α 、IFN- β および IFN- γ のようなもの、ナトリウムチャネル遮断薬（ホスフェニトイン、619C89）、カリウムチャネル開口薬（BMS 204352、クロマカリム、レブクロマカリム、アプリカリム、ピナシジル、ジアゾキシド、ニコランジル、ミノキシジル）、ピラセタム、アデノシン輸送インヒビター（プロペントフィリン）、ガングリオシド GM（非 NMDA アンタゴニスト）、シナプス前グルタミン酸放出インヒビター、クラゾセンタン、デスモテプララーゼ、ビプリネックス（アンクロッド）、テネクテプララーゼ（TNKase; メタライズ）、アルテプララーゼ、サイクリックニトロン、トウィークブロッカー（TWEAK BLOCKERS）（アポトーシスの TNF 様弱インデューサー）受容体、血栓溶解性（thrombolytica、thrombolytic）処置薬（ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、t-PA/組織プラスミノゲン活性化因子または組換えウロキナーゼ）、アニストレプララーゼ、リルゾール、およびジスフェントナトリウム（NXY 059）、カンデサルタン、AX-200（G-CSF、フィルグラスチム（Fligrastim、Filgrastim））、カフェイノール（カフェイン+エタノール）、エネカディン、マイクロプラスミン、ソノリシス+tPA、V-10153、HTUPA、ソルリン、ピクロゾタン、S-0139、S-18986、AEOL-10150、AL-208、KN-38-7271、ピリドキサル 5-リン酸塩、Neu-2000KL、ONO-2231、PGX-100、RVX-208、SUN-N4057、SUN-N8075、TAT-NR2B9c、GLP-1 発現幹細胞治療薬、Msc-1（SA-4503、AGY-94806）、NH-02D、S-0139 259、組織保護サイトカイン（LuAA24493）、V10153 270（BB-10153、TAPgen）、スタチンおよび他のコレステロール低下薬物の併用、エリトロポエチン、セレプロライシン、CDP-コリン（シチジン 5'-ジホスホコリン）およびカリウムチャネル TREK-1 を活性化することが可能な薬剤からなる群より選ばれる、請求項 35 または 36 の使用。

【請求項 38】

培養培地、および次の成分、すなわち、ラディックス・アストラガリ（メンブラナウス

10

20

30

40

50

・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ(レッド・サゲルートまたはダン・シェン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ(レッド・ピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング(チュアン・キシオング)の根茎、ラディックスアンジェリカシネンシス(チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根)、カーサマス・ティンクトリアス(サフラワーまたはホンヒュア)のフラワー、プラナス・パーシカ(ビーチシードまたはタオレン)、ラディックス・ポリガラ(シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウイルド、ポリガラ・シビリカ・エル、またはユアンジの根)およびリゾマ・アコリ・タタリノビ(グラスリーフスイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎)の少なくとも1つを含む、細胞増殖を促進するための細胞培養試薬。

10

【請求項39】

さらに、組成物は、バタス・マルテンシ(サソリまたはクアンキシの乾燥体)、ヒルの乾燥体(ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ)、ユーポリファーガ・セウ・セテレオフアーガ(オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオフアーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体)、カルクラス・ボビス・アーティファクタス(ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウフアン、およびコイヌ・サイガ・タタリカ(アンテロープホルンまたはリングヤングジャオ)からなる群より選ばれる成分を含む、請求項38に請求する細胞培養試薬。

20

【請求項40】

少なくとも2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13または14の成分を含む、請求項38または39に請求する細胞培養試薬。

【請求項41】

前記細胞培養試薬は、神経伸長および増加、および幹細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、心筋、平滑筋細胞、肝細胞、腎細胞、ランゲルハンス島および上皮性皮膚細胞の増殖を促進する、請求項38～40のいずれかに請求する細胞培養試薬。

【請求項42】

さらに、細胞増殖を促進するために西洋薬が包含される、請求項38～41のいずれかに請求する細胞培養試薬。

30

【請求項43】

西洋薬は、骨形成タンパク質(BMPs)、上皮増殖因子(EGF)、エリトロポエチン(EPO)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)、肝細胞増殖因子(HGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、ミオスタチン(GDF-8)、神経成長因子(NGF)、ニューロトロフィン、血小板由来増殖因子(PDGF)、トロンボポエチン(TPO)、形質転換増殖因子アルファ(TGF- α)、形質転換増殖因子ベータ(TGF- β)、血管内皮増殖因子(VEGF)、インターロイキン 1β (IL- 1β)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-21、IL-33、M-CSF、ノギン、インターフェロン(IFN)- α 、IFN- β およびIFN- γ 、AX-200(G-CSF、フィルグラスチム(Fligrastim、Filgrastim))、スタチンおよび他のコレステロール低下薬の併用、エリトロポエチン、セレプロライシンおよびCDP-コリン(シチジン5'-ジホスホコリン)のような増殖因子からなる群より選ばれる、請求項42に請求する細胞培養試薬。

40

【請求項44】

ラディックス・アストラガリ(メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ(レッド・サゲルートまたはダン・シェン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ(レッド・ピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング(チュアン・キシオング)の根茎、ラディックスアンジェリカシネ

50

ンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）のフラワー、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウィルド、ポリガラ・シビリカ・エル、またはユアンジの根）およびリゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフスイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）の少なくとも3つの成分の有効量と細胞を接触させることを含む、細胞の生存、増殖、増加または細胞の分化を誘導するための方法。

【請求項45】

さらに、バタス・マルテンシ（サソリまたはクアンキシの乾燥体）、ヒルの乾燥体（ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ）、ユーポリファーガ・セウ・セテレオファーガ（オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオファーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体）、カルクラス・ボビス・アーティファクタス（ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウフアン）、およびコルヌ・サイガ・タタリカ（アンテロープホルンまたはリングヤングジャオ）の少なくとも1つの成分の有効量と前記細胞とを接触させることを含む、請求項44に請求する方法。

【請求項46】

前記細胞は、神経細胞、幹細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、心筋、平滑筋細胞、肝細胞、腎細胞、ランゲルハンス島および上皮性皮膚細胞の群から選ばれる、請求項44および45に請求する方法。

【請求項47】

前記接触ステップは生体外で行われる、請求項44～46のいずれかに請求する方法。

【請求項48】

前記有効量は1 g～8 gである、請求項44～47のいずれか一項に請求する方法。

【請求項49】

神経細胞は脊椎動物神経細胞である、請求項44～48のいずれか一項に請求する方法。

【請求項50】

脊椎動物神経細胞はヒト神経細胞である、請求項49に請求する方法。

【請求項51】

神経細胞は皮質神経細胞から導き出される、請求項46～48のいずれか一項に請求する方法。

【請求項52】

さらに、方法は、細胞の生存、増殖、増加または細胞の分化を誘導するために西洋薬で用いられる薬剤と前記細胞とを接触させることを含む、請求項44～51のいずれかに請求する方法。

【請求項53】

西洋薬は、骨形成タンパク質（BMPs）、上皮増殖因子（EGF）、エリトロポエチン（EPO）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子（GM-CSF）、肝細胞増殖因子（HGF）、インスリン様増殖因子（IGF）、ミオスタチン（GDF-8）、神経成長因子（NGF）、ニューロトロフィン、血小板由来増殖因子（PDGF）、トロンボポエチン（TPO）、形質転換増殖因子アルファ（TGF- α ）、形質転換増殖因子ベータ（TGF- β ）、血管内皮増殖因子（VEGF）、インターロイキン1 β （IL-1 β ）、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-21、IL-33、M-CSF、ノギン、インターフェロン（IFN）- α 、IFN- β およびIFN- γ 、スタチンおよび他のコレステロール低下薬の併用、エリトロポエチン、セレブロライシンおよびCDP-コリン（シチジン5'-ジホスホコリン）のような増殖因子からなる群より選ばれる、請求項52に請求する方法。

【請求項 5 4】

ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（レッド・サゲルートまたはダン・シェン）、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウイルド、ポリガラ・シビリカ・エル、またはユアンジの根）およびリゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフスイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）およびそれらの組合せからなる群より選ばれる少なくとも 2 つの成分を含む組成物を対象体に投与することを含む、中枢または末梢の神経系の組織での神経伸長および神経細胞の増加を促進する方法。

【請求項 5 5】

さらに、組成物は、ラディックス・アストラガリ（メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根）、ラディックス・ペオニア・ルブラ（レッド・ピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）のフラワーおよびラディックスアンジェリカシネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）およびそれらの組合せからなる群より選ばれる成分を含む、請求項 5 4 に請求する方法。

【請求項 5 6】

さらに、組成物は、バタス・マルテンシ（サソリまたはクアンキシの乾燥体）、ユーポリファーガ・セウ・セテレオフアーガ（オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオフアーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体）、カルクラス・ボビス・アーティファクタス（ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウフアン）、コルヌ・サイガ・タタリカ（アンテロープホルンまたはリングヤングジャオ）およびヒルの乾燥体（ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ）からなる群より選ばれる成分を含む、請求項 5 4 または 5 5 に請求する方法。

【請求項 5 7】

前記成分はヒトに組み合わせて、順次にまたは別々に投与される、請求項 5 4～5 6 のいずれかに請求する方法。

【請求項 5 8】

組成物は、少なくとも 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, または 14 の成分を含む、請求項 5 4～5 7 のいずれかに請求する方法。

【請求項 5 9】

組成物は、傷つけられたかまたは病気にかかった組織での神経伸長および神経細胞の増加を促進する、請求項 5 4～5 8 のいずれかに請求する方法。

【請求項 6 0】

病気は、筋萎縮性側索硬化（ALS）、脳膿瘍、脳虚血、糖尿病に関係する脳萎縮、皮質下梗塞および白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症（CADASIL）、脳血管障害、皮質基底核神経節変性（CBGD）、慢性虚血、クロイツフェルトーヤコブ症候群、ダンディ・ウォーカー症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、老年性認知症、後天性免疫不全症候群（エイズ）に関係する認知症、脳脊髄炎、本態性振戦、フリードライヒ失調症、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハンチントン病、水頭症、低酸素症、致死性家族性不眠症、一過性脳虚血発作、クーラー病、ランドウ・クレフナー症候群、レビー小体病、マチャド-ジョセフ病、細菌性およびウイルス性髄膜炎、片頭痛障害、骨髄炎、オリーブ橋小脳萎縮症（olivopontocerebellar atrophies、olivopontocerebellar atrophies）、パントテン酸キナーゼ関連の神経変性、灰白髄炎、ポリオ後症候群、プリオン病、偽脳腫瘍、シャイ・ドレーガー症候群、シュタイネルト病、乳児痙攣、進行性核上麻痺、脊髓空洞症、視床病、チック障害、トゥレット症候群およびぶどう膜髄膜脳炎症候群のいずれか 1 つの病気から選ばれる、請求項 5 9 に請求する方法。

【請求項 6 1】

さらに、方法は、中枢または末梢の神経系の組織での神経伸張および神経細胞の増加を促進するために西洋薬で用いられる薬剤の投与が包含される、請求項54～60のいずれかに請求する方法。

【請求項62】

西洋薬は、骨形成タンパク質（BMPs）、上皮増殖因子（EGF）、エリトロポエチン（EPO）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子（GM-CSF）、肝細胞増殖因子（HGF）、インスリン様増殖因子（IGF）、ミオスタチン（GDF-8）、神経成長因子（NGF）、ニューロトロフィン、血小板由来増殖因子（PDGF）、トロンプオエチン（TPO）、形質転換増殖因子アルファ（TGF- α ）、形質転換増殖因子ベータ（TGF- β ）、血管内皮増殖因子（VEGF）、インターロイキン1 β （IL-1 β ）、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-21、IL-33、M-CSF、ノギン、インターフェロン（IFN）- α 、IFN- β およびIFN- γ のような増殖因子からなる群より選ばれる、請求項61に請求する方法。

10

【請求項63】

ラディックス・アストラガリ（メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根）、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（レッド・サゲルートまたはダン・シェン）、ラディックス・ペオニア・ルブラ（レッド・ピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・バル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、ラディックスアンジェリカシネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）のフラワー、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウィルド、ポリガラ・シビリカ・エル、またはユアンジの根）、およびリゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフスイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）の少なくとも2つの成分を含む組成物を受動体に投与することを含む、うつ、精神医学的な徴候、自然老化および外傷性脳細胞死の群から選ばれる状態を有する受動体を処置する方法。

20

【請求項64】

さらに、組成物は、バタス・マルテンシ（サソリまたはクアンキシの乾燥体）、ヒルの乾燥体（ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ）、ユーポリファーガ・セウ・セテレオフィーガ（オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオフィーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体）、カルクラス・ボビス・アーティファクタス（ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウフアン、およびコイヌ・サイガ・タタリカ（アンテロープホルンまたはリングヤングジャオ）からなる群より選ばれる成分を含む、請求項63に請求する方法。

30

【請求項65】

組成物は、少なくとも3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, または14の成分を含む、請求項63または64に請求する方法。

【請求項66】

さらに、方法は、うつ、精神医学的な徴候、自然老化および外傷性脳細胞死の群から選ばれる状態を有する受動体を処置するために西洋薬で用いられる薬剤が投与されることを含む、請求項63～65のいずれかに請求する方法。

40

【請求項67】

西洋薬は、カルシウムチャネル遮断薬（D-600、ジルチアゼム、ニトレンジピン、ニモジピン、ニフェジピン、フルナリジン、フルスピリレン、イスラジピン、ニカルジピン、PY 108-068、ベラパミルおよびトリアパミル）、遊離基捕捉剤（エブセレン、チリラザド、NXY-059）、増殖因子で、骨形成タンパク質（BMPs）、上皮増殖因子（EGF）、エリトロポエチン（EPO）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子（

50

GM-CSF)、肝細胞増殖因子(HGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、ミオスタチン(GDF-8)、神経成長因子(NGF)、ニューロトロフィン、血小板由来増殖因子(PDGF)、トロンボポエチン(TPO)、形質転換増殖因子アルファ(TGF- α)、形質転換増殖因子ベータ(TGF- β)、血管内皮増殖因子(VEGF)、インターロイキン1 β (IL-1 β)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-21、IL-33、M-CSF、ノギン、インターフェロン(IFN)- α 、IFN- β およびIFN- γ のようなもの、ソルリン、ピクロゾタン、S-18986、AL-208、ピリドキサル5-リン酸、ONO-2231およびカリウムチャネルTREK-1を活性化することが可能な薬剤からなる群より選ばれる、請求項66に請求する方法。

10

【請求項68】

ラディックス・アストラガリ(メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ(レッド・サゲルートまたはダン・シェン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ(レッド・ピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング(チュアン・キシオング)の根茎、ラディックスアンジェリカシネンシス(チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根)、カーサマス・ティンクトリアス(サフラワーまたはホンヒュア)のフラワー、プラナス・パーシカ(ピーチシードまたはタオレン)、ラディックス・ポリガラ(シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウィルド、ポリガラ・シビリカ・エル、またはユアンジの根)およびリゾマ・アコリ・タタリノビ(グラスリーフスイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎)の少なくとも3つの成分を含む組成物を受動体に投与することを含む、発作または神経変性の傾向がある対象体またはその危険性のある対象体での発作または神経変性の影響を減らすための方法。

20

【請求項69】

さらに、組成物は、バタス・マルテンシ(サソリまたはクアンキシの乾燥体)、ヒルの乾燥体(ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ)、ユーポリファーガ・セウ・セテレオフアーガ(オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオフアーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体)、カルクラス・ボビス・アーティファクタス(ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウフアン、およびコイヌ・サイガ・タタリカ(アンテロープホルンまたはリングヤングジャオ)からなる群より選ばれる成分を含む、請求項68に請求する方法。

30

【請求項70】

組成物は、少なくとも4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13、または14の成分を含む、請求項68または69に請求する方法。

【請求項71】

神経変性は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化(ALS)、脳膿瘍、脳虚血、糖尿病に関係する脳萎縮、皮質下梗塞および白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症(CADASIL)、脳血管障害、皮質基底核神経節変性(CBGD)、慢性虚血、クロイツフェルトーヤコブ症候群、ダンディ・ウォーカー症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、老年性認知症、後天性免疫不全症候群(エイズ)に関係する認知症、脳脊髄炎、本態性振戦、フリードライヒ失調症、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、ハンチントン病、水頭症、低酸素症、致死性家族性不眠症、一過性脳虚血発作、クールー病、ランドウ・クレフナー症候群、レビー小体病、マチャド-ジョセフ病、細菌性およびウイルス性髄膜炎、片頭痛障害、骨髄炎、オリブ橋小脳萎縮症(olivopontocerebellar atrophies, olivopontocerebellar atrophies)、パントテン酸キナーゼ関連の神経変性、灰白髄炎、ポリオ後症候群、プリオン病、偽脳腫瘍、シャイ・ドレーガー症候群、シュタイネルト病、乳児痙攣、パーキンソン病、進行性核上麻痺、脊髄空洞症、視床病、チック障害、トゥレット症候群、ぶどう膜髄膜脳炎症候群、全虚血および局所虚血および他の心血管病

40

50

のいずれか 1 つの病気によって生じる、請求項 68～70 のいずれかに請求する方法。

【請求項 72】

さらに、方法は、発作または神経変性の傾向がある対象体またはその危険性のある対象体での発作または神経変性の影響を減らすために西洋薬で用いられる薬剤が投与されることを含む、請求項 68～71 のいずれかに請求する方法。

【請求項 73】

西洋薬は、カルシウムチャネル遮断薬（D-600、ジルチアゼム、ニトレンジピン、ニモジピン、ニフェジピン、フルナリジン、フルスピリレン、イスラジピン、ニカルジピン、PY 108-068、ベラパミルおよびトリアパミル）、遊離基捕捉剤（エブセレン、チリラザド、NXY-059）、ガングリオシド GM（非 NMDA アンタゴニスト）、シナプス前（presynaptic、presynaptic）グルタミン酸放出インヒビター、リルゾール、およびジスフェントナトリウム（NXY059）、カンデサルタン（candesaran、candesartan）、カフェイノール（カフェイン+エタノール）、RVX-208、SUN-N4057、SUN-N8075、スタチン（atamins、statins）および他のコレステロール低下薬物の併用、エリトロポエチン、セレブロライシン、CDP-コリン（CDP-cholin、CDP-choline）（シチジン 5'-ジホスホコリン）およびカリウムチャネル TREK-1 を活性化することが可能な薬剤からなる群より選ばれる、請求項 72 に請求する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して、神経伸長および増殖を促進するための方法および組成物に関する。また本発明は、細胞成長を促進するためのインビトロ法に関する。

【背景技術】

【0002】

神経系損傷は、毎年多くの人々に影響がある。この神経損傷の高い確率の結果として、神経再生および修復は、損傷後の神経機能を回復する新規発見に貢献する急速に発展している分野となっている。しかしながら、今まで神経系損傷を患った患者への中枢神経系（CNS）病変の臨床的治療および神経機能の回復は、解決の難しいものであった。従って、様々な種類の神経系疾患、例えば筋萎縮性側索硬化症（ALS）および老年性認知症は、常に医師からそれらの神経機能を回復することが困難であると言われてきた。

【0003】

神経突起を伸張する（例えば軸索および樹状突起）神経細胞の性能は、発達の間、ニューロン結合を確立する際に最も重要である。それはまた神経再生の間、病変のため破壊された結合を再確立するために必要である。しかしながら、中枢神経系の軸索は、病変後に再成長するのに非常に限られた能力を有する。従って、疾患、例えば神経細胞の進行性変性がある老年性認知症のため、神経細胞の神経伸長および増殖を刺激することが可能な治療薬または、分子の研究が、ニューロン修復および神経機能の回復に集中した新規治療計画を開くであろう。

【0004】

神経系損傷および神経系の疾患を治療する方法を改善する必要性がある。より詳細には、神経伸長および神経細胞の増殖を促進することができ、損傷または罹患神経が再び機能できるような再生治療を提供する必要性がある。

【0005】

第 1 の態様によると、中枢神経系または末梢神経系の組織における神経伸長および神経細胞の増殖を促進するための薬の製造であって、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae）（ランタナ（Red Sage、レッド・サゲ）ルートまたはタンジン（Dan Shen、ダン・シェン））、プラナス・パーシカ（Prunus Persica、ハナモモ）（ピーチ（Peach）シードまたはタオレン（Taoren、桃仁））、ラディックス・ポリガラ（Radix Polygalae、ヒメハギ）（シンリーフヒメハギ（t

hinleaf milkwort)、ポリガラ・テヌイフォリア・ウイルド (*Polygala tenuifolia* Willd、イトヒメハギ)、ポリガラ・シビリカ・エル (*Polygala sibirica* L.、ヒロハオンジ) またはユアンジ (Yuanzhi、遠志) の根)、リゾマ・アコリ・タタリノビ (*Rhizoma aconitidis* Tatarinowii、石菖蒲) (グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプ (*Shichangpu*) の根茎) およびそれらの組み合わせからなるグループから選択される少なくとも2つの成分並びにラディックス・アストラガリ (*Radix Astragali*、黄耆) (メンブラナウス・ミルクベッチ (*Membranous Milkvetch*、黄花黄耆) またはホワン・キ (*Huang Qi*) の根)、ラディックス・ペオニア・ルブラ (*Radix Paeoniae Rubra*、芍薬) (レッドピオニー (*Red Peony*、芍薬) ルート、ペオニア・ラクチフロラ・パル (*Paeonia lactiflora* Pall、シャクヤク)、ペオニア・ビーチ・リンチ (*Paeonia veitchii* Lynch、赤芍) またはカイ・シャオ (*Chi Shao*))、リグスチカム・チュアンキシオング (*Ligusticum Chuanxiong*、川弓) (チュアン・キシオング (*Chuan Xiong*)) の根茎、カーサマス・ティンクトリアス (*Carthamus Tinctorius*、ベニバナ (サフラワーまたはホンヒュア (*Honghua*)) のフラワー (Flower、花)、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス (*radix angelicae sinensis*、当帰尾) (チャイニーズ・アンジェリカ (*Chinese Angelica*、白根川弓) またはタングイ (*DanGui*) の根) およびそれらの組み合わせからなる群から選択される任意の成分を含む組成物の使用を提供する。

【0006】

1つの実施形態において、第1態様の組成物は、さらにバタス・マルテンシ (サソリまたはクアンキシの乾燥体)、ユーポリファーガ・セウ・セテレオファーガ (*Eupolyphaga Seu Seteleophaga*、しゃちゅう) (オサムシ (*ground beetle*)、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー (*Eupolyphaga sinensis* Walker、歩行虫)、ステレオファーガ・プランシー (*Steleophaga plancyi*、箴虫) またはチュビコン (*Tubiechong*) の乾燥体)、カルクラス・ボビス・アーティファクタス (*Calculus Bovis Artifactus*、牛胃石) (ナチュラル (天然) またはアーティフィシャル (人工) のカウベゾアール (*cow-bezoar*、牛胃石) またはレンゴン・ニウフアン (*Rengong Niu Huang*、人口牛黄))、コルヌ・サイガ・タタリカ (*Cornu Saigae Tataricae*、サイガの角) (アンテロープの角またはリングヤングジャオ (*Lingyangjiao*)) およびヒルの乾燥体 (ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン (*Whitmania pigra* Whitman))、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマン (*Hirudo nipponica* Whitman *Whitmania acranulata* Whitman) またはシュイジ (*Shizhi*) からなる群から選択される任意の成分を含む。

【0007】

有利に、薬は罹患または損傷のある組織であり、著しい組織の収縮、欠失、萎縮または細胞死が生じている部位における神経細胞の神経伸長および増殖を誘発することができる。神経細胞の神経伸長および増殖は、損傷または罹患の神経が有利なシナプス結合を導入するか、新しい機能細胞に切り替えることができる外向き成長を行うことを可能とする。組成物は、幹細胞分化および罹患または損傷のある組織へのリクルートも促進することができる。

【0008】

1つの実施形態において、うつ病、精神医学的な徴候、天然老化および外傷性脳細胞死の群から選択される状態にある患者を治療するため、発作もしくは神経変性の体質の対象または発作もしくは神経変性の危険な状態にある対象への影響を減少するため、中枢神経系および末梢神経系の罹患または損傷のある組織を治療するため、細胞成長を促進するための薬の製造方法であって、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ (ランタナルートまたはタンジン)、プラナス・パーシカ (ピーチシードまたはタオレン)、ラディックス・ポリガラ (シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ウイルド)、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根)、バタス・マルテンシ (サソリまたはクアンキシの乾燥体)、リゾマ・アコリ・タタリノビ (グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎)、ユーポリファーガ・セウ・セテレオファーガ (オサムシ、ユー

ポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオファーガ・ブランシーまたはチュビコンの乾燥体)、カルクラス・ボビス・アーティファクタス(ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウファン、コイヌ・サイガ・タタリカ(アンテロープの角またはリングヤングジャオ)およびそれらの組み合わせからなる群から選択される第1の成分ならびにラディックス・アストラガリ(メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・ペオニア・ルブラ(レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング(チュアン・キシオング)の根茎、カーサマス・ティンクトリアス(サフラワーまたはホンヒュア)のフラワー、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス(チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根)、ヒルの乾燥体(ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ)からなる群から選択される任意の第2成分を含む組成物の使用を提供する。

10

【0009】

第2の態様によると、うつ病、精神医学的な徴候、天然老化および外傷性脳細胞死の群から選択される状態にある患者を治療するための薬の製造において、ラディックス・アストラガリ(メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ(ランタナルートまたはタンジン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ(レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング(チュアン・キシオング)の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス(チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根)、カーサマス・ティンクトリアス(サフラワーまたはホンヒュア)のフラワー、プラナス・パーシカ(ピーチシードまたはタオレン)、ラディックス・ポリガラ(シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド)、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根)、リゾマ・アコリ・タタリノビ(グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎)の少なくとも2つの成分を含む組成物の使用を提供する。

20

【0010】

理論にとらわれず、ここに開示の薬は、細胞機能の欠失によって途絶されていることがあり得るホルモンバランスの調節を助長することによって、うつ病または他の精神医学的な徴候、例えば精神分裂症、不安障害である患者への治療に実用的である可能性があると考えられる。

30

【0011】

第3の態様によると、発作もしくは神経変性の体質の対象または発作もしくは神経変性の危険な状態にある対象への影響を減少するための薬の製造において、ラディックス・アストラガリ(メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ(ランタナルートまたはタンジン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ(レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング(チュアン・キシオング)の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス(チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根)、カーサマス・ティンクトリアス(サフラワーまたはホンヒュア)のフラワー、プラナス・パーシカ(ピーチシードまたはタオレン)、ラディックス・ポリガラ(シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド)、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根)、リゾマ・アコリ・タタリノビ(グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎)の少なくとも3つの成分を含む組成物の使用を提供する。

40

【0012】

第4の態様によると、細胞成長を促進するための薬の製造において、ラディックス・アストラガリ(メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ(ランタナルートまたはタンジン)、ラディックス

50

・ペオニア・ルブラ（レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）のフラワー、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド）、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根）、リゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）の少なくとも3つの成分を含む組成物の使用を提供する。

【0013】

10

1つの実施形態において、薬は軟骨細胞、骨格筋細胞、心筋、平滑筋細胞、肝細胞、腎臓細胞および上皮皮膚細胞の制御成長を促進することができる。細胞成長を促進する薬は、慢性関節リウマチ、筋肉変性障害、発作ならびに腎臓および肝疾患等の状態を治療するため、使用し得る。薬は、上皮または表皮細胞増殖または機能を改良することによって老化現象を遅延させるためにも、使用し得る。

【0014】

第5の態様によると、中枢神経系または末梢神経系の罹患または傷害組織である患者を治療するための薬および補助剤の製造において、少なくとも1つの以下の成分：ラディックス・アストラガリ（メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根）、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（ランタナルートまたはタンジン）、ラディックス・ペオニア・ルブラ（レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）のフラワー、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド）、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根）、リゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）の使用を提供する。

20

【0015】

1つの実施形態において、前記に規定するような組成物の使用を提供し、組成物は少なくとも2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13または14の成分を含む。栄養補助剤は、ミネラルサプリメント、ビタミン、ハーブ系サプリメント、西洋医学または魚油があり得る。

30

【0016】

第6の態様によると、培養培地およびラディックス・アストラガリ（メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根）、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（ランタナルートまたはタンジン）、ラディックス・ペオニア・ルブラ（レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）のフラワー、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド）、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根）、リゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）の少なくとも1つの成分を含む細胞生存率および成長を促進するための細胞培養試薬を提供する。

40

【0017】

1つの実施形態において、第6の態様において規定するような組成物を含む細胞培養試薬を提供し、組成物は少なくとも2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13または14の成分を含む。

50

【0018】

他の実施形態において、細胞培養試薬は、神経細胞、幹細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、心筋、平滑筋細胞、肝細胞、腎臓細胞、ランゲルハンス島および上皮皮膚細胞の細胞生存率および成長を促進することができる。

【0019】

第7の態様によると、ラディックス・アストラガリ（メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根）、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（ランタナルートまたはタンジン）、ラディックス・ペオニア・ルブラ（レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）の花、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド）、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根）、リゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）の少なくとも3つの成分と前記細胞を接触することを備える、細胞生存率を促進し、細胞の増殖または分化を誘発するための方法を提供する。

10

【0020】

第7の態様の接触工程は、生体外で行うことができる。生体外接触工程は、細胞成長、分化を促進することができるか、細胞生存率は組織工学または生体外治療の用途に使用することができる様々な細胞の生体外培養を促進することができる。1つの実施形態において、有効量は1 gから8 gである。他の実施形態において、神経細胞は脊椎動物の神経細胞、好ましくは人間の神経細胞である。1つの実施形態において、神経細胞は皮質神経細胞から由来する。

20

【0021】

第8の態様によると、患者の中枢神経系または末梢神経系の組織において、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（ランタナルートまたはタンジン）、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド）、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根）、リゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）およびそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも2つの成分を含む組成物を前記患者に投与する工程を備える、神経細胞の神経伸長および増殖を促進する方法を提供する。

30

【0022】

第9の態様によると、ラディックス・アストラガリ（メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根）、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（ランタナルートまたはタンジン）、ラディックス・ペオニア・ルブラ（レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）の花、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド）、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根）、リゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）の少なくとも2つの成分を前記患者に投与する工程を備える、うつ病、精神医学的な徴候、天然老化および外傷性脳細胞死の群から選択される状態にある患者の治療方法を提供する。

40

【0023】

第10の態様によると、ラディックス・アストラガリ（メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根）、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（ラン

50

タナルートまたはタンジン）、ラディックス・ペオニア・ルブラ（レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）のフラワー、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド）、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根）、リゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）の少なくとも3つの成分を前記対照に投与する工程を備える発作もしくは神経変性の体質の対象または発作もしくは神経変性の危険な状態にある対象への影響を減少するための薬の方法を提供する。

10

【0024】

用語解説

この部分は、以下の語句の解釈（必要に応じてその文法の変形）の補助を提供することを意図する。

【0025】

明細書における「神経伸長」の用語は、軸索および樹状突起の一般的な外向きの方向への成長に関する。神経伸長はシナプス形成または発達に重要である。

【0026】

他に特定しない限り、「含む（comprising, compriseおよびその文法の変形）」は、「制限のない」または「含んでいる」言葉を示し、それらが列挙された要素を含むが、付加的な列挙されていない要素を包含するようなことを意図する。

20

【0027】

ここに使用するように、数値に関して用いられているように「約」の用語は、例えば数値+50%または+30%、好ましくは+20%、より好ましくは+10%、さらにより好ましくは+5%、最も好ましくは+1%を意味する。必要な場合、「約」の単語が本発明の定義から除くことができる。

【0028】

「治療」の用語は、病状または症状を治し、疾患の確立を予防するか、疾患もしくは他の望ましくない症状の進行を予防し、妨げ、遅延させまたは回復に向かわせるあらゆる使用を含む。それゆえに、「治療」は予防および治療療法を含有する。

30

【0029】

この開示の全体に渡って、ある実施形態は、範囲形式で開示することができる。範囲形式での記載は、単に便利さ、簡潔さのみとして理解されるべきであり、開示された範囲での範囲の柔軟性のない制限として解釈すべきでない。従って、範囲の記載は、全てのありうる部分的な範囲ならびにその範囲内の個々の数値を具体的に開示すると考えられるべきである。例えば、1から6等の範囲の記載は、特異的に開示された部分的な範囲、例えば1から3、1から4、1から5、2から4、2から6、3から6等ならびに例えば1, 2, 3, 4, 5および6の範囲内の個々の数字として考えられるべきである。これはこの範囲の幅を問わず適用する。

40

【0030】

本発明は、中枢神経系または末梢神経系の組織における神経伸長および神経細胞もしくは幹細胞の増殖への薬の製造において、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ（ランタナルートまたはタンジン）、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド）、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根）、バタス・マルテンシ（サソリまたはクアンキシの乾燥体）、リゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）、ユーポリファーガ・セウ・セテレオフアーガ（オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオフアーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体）、カルクラス・ボビス・アーティファクタス（ナチュラルまたは

50

アーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウフアン、コイヌ・サイガ・タタリカ（アンテロープの角またはリングヤングジャオ）およびそれらの組み合わせの少なくとも1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13または14の以下の成分を含む組成物の使用を提供する。

【0031】

1つの実施形態において、組成物はさらにラディックス・アストラガリ（メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根）、ラディックス・ペオニア・ルブラ（レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ）、リグスチカム・チュアンキシオング（チュアン・キシオング）の根茎、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）の花、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタンゲイの根）、ヒルの乾燥体（ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ）およびそれらの組み合わせからなる群から選択される第2成分を含む。

【0032】

薬は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脳膿瘍、脳虚血、糖尿病に伴う脳萎縮、皮質下梗塞および白質脳症（CADASIL）に伴う脳常染色体優性遺伝の動脈症、脳血管障害、大脳皮質基底核神経節変性症（CBGD）、慢性虚血、クロイツフェルト・ジャコブ病、ダンディ・ウォーカー症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、老年性認知症、後天性免疫不全症候群（エイズ）に関連する認知症、脳脊髄炎、本態性振戦、フリードライヒ失調症、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症候群（gerstmann straussler-scheinker disease）、ハンチントン病、水頭症、低酸素症、致死性家族性不眠症、一過性脳虚血発作、クール病、ランドウ・クレフナー症候群（Landau-Kleffner syndrome）、レヴィー小体疾患、マチャド・ジョセフ疾患（Machado-Joseph disease）、細菌性およびウイルス性髄膜炎、片頭痛障害、脊髄炎、オリーブ橋小脳萎縮症（olivopontocerebellar atrophies、olivopontocerebellar atrophies）、パントテン酸塩キナーゼ関連の神経変性、灰白髄炎、ポリオ後症候群、プリオン病、偽脳腫瘍、シャイ・ドレーガー症候群、乳児痙攣、進行性核上麻痺、シュタイナート疾患、脊髄空洞症、視床疾患、チック障害、トゥレット症候群（Tourette syndrome）およびぶどう膜髄膜脳炎症候群（Uveomeningoencephalitic syndrome）のいずれかの疾患にある患者に生じることができる罹患または損傷のある組織における神経伸長および神経細胞もしくは幹細胞の増殖を促進する。

【0033】

組成物は、精神医学的徴候、例えば不安障害、精神分裂症、うつ病および産後うつ病、天然老化、外傷性脳細胞死ならびに他の神経病学的徴候、例えば健忘症、背中の痛み、めまい、意識不明、幻肢、嗅覚障害、首の痛み、頭痛、片頭痛、痙攣および言語障害の群から選択される状態にある患者を治療するための使用もあり得る。

【0034】

他の実施形態において、組成物は発作もしくは神経変性の体質の対象または発作もしくは神経変性の危険性のある対象への影響を減少することができる。神経変性は、体質のある対象において、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脳膿瘍、脳虚血、糖尿病に伴う脳萎縮、皮質下梗塞および白質脳症（CADASIL）に伴う脳常染色体優性遺伝の動脈症、脳血管障害、大脳皮質基底核神経節変性症（CBGD）、慢性虚血、クロイツフェルト・ジャコブ病、ダンディ・ウォーカー症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、老年性認知症、後天性免疫不全症候群（エイズ）に関連する認知症、脳脊髄炎、本態性振戦、フリードライヒ失調症、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症候群、ハンチントン病、水頭症、低酸素症、致死性家族性不眠症、一過性脳虚血発作、クール病、ランドウ・クレフナー症候群、レヴィー小体疾患、マチャド・ジョセフ疾患、細菌性およびウイルス性髄膜炎、片頭痛障害、脊髄炎、オリーブ橋小脳萎縮症、パントテン酸塩キナーゼ関連の神経変性、パーキンソン病、灰白髄炎、ポリオ後症候群、プリオン病、偽脳腫瘍、シャイ・ドレーガー症候群、シュタイナート疾患、乳児痙攣、進行性核上麻

痺、脊髄空洞症、視床疾患、チック障害、トゥレット症候群、ぶどう膜髄膜脳炎症候群、広範囲のおよび局所虚血の群から選択される疾患によって生じることがあり得る。

【0035】

NeuroAid (商標) または NeuroAid (商標) のような組成物 (例えば以下に記載の組成物) は、神経細胞の一般的な健康または様々な神経系疾患および他の変性疾患への有効な補助剤と組み合わせることが想定される。栄養補助剤は、ミネラルサプリメント、ビタミン、ハーブ系サプリメント、西洋医学があり得る。通常、NeuroAid (商標) のような組成物と組み合わせ使用される補助剤は、NeuroAid (商標) または NeuroAid (商標) のような組成物から異なる機構を標的とするものである。例えば、西洋医学は変性疾患患者における回復潜在能力の改善において典型的に使用する成長因子があり得る。西洋医学に使用される適切な薬の例は、カルシウムチャンネル遮断薬 (D-600、ジルチアゼム、ニトレンジピン、ニモジピン、ニフェジピン、フルナリジン、フルスピリレン、イスラジピン、ニカルジピン、PY 108-068、ベラパミルおよびトリアパミル (Triapamil))、カルシウムキレート剤 (DP-b99)、遊離基捕捉剤 (フリーラジカルスカベンジャー) (エブセレン、チリラザド、NXY-059)、GABA受容体拮抗薬 (ジアゼパム、バクロフェン)、AMPA作用薬 (ZK 200775/MPQX)、競合的NMDA拮抗質 (アプチガネル/セレステイト (cerestat、セレスタット)、CP 101, 606、デキストロルファン (dextrophan、dextrophan)、MK 801/ジゾシルピン、レマセミド)、グリシン部位拮抗剤 (GV 150526、ACEA 1021)、ポリアミン部位拮抗剤 (エリプロディル)、成長因子 (bFGF)、ナトリウムチャンネル遮断薬 (フォスフェニトイン、619C89)、カリウムチャンネル開口薬 (BMS 204352、クロマカリム、レブクロマカリム、アプリカリム、ピナシジル、ジアゾキシド、ニコランジル、ミノキシジル)、ピラセタム、アデノシン輸送抑制剤 (プロベントフィリン)、ガングリオシドGM (非NMDA拮抗剤)、シナプス前グルタメート放出阻害剤、クラゾセンタン、デスモテプラーゼ (desmotepase)、ピクリネクス (viprinex、ビプリネックス) (アンクロッド)、テネクテプラーゼ (TNKase; メタライズ (Metalyse))、アルテプラーゼ、サイクリック (環状) ニトロン、TWE

AK (TNF同系性および低細胞死誘導能) 受容体、血栓溶解治療 (処置薬) (thrombolytica treatments、thrombolytic treatments) (ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、t-PA/組織プラスミノゲン活性化因子または組み換え型ウロキナーゼ)、アニストレプラーゼ、リルゾールおよびジスフェントン・ナトリウム (NXY 059)、カンデサルタン、AX-200 (G-CSF、フィルグラスチム (Fligrastim、Filgrastim))、カフェイノール (カフェイン+エタノール)、エネカディン (enecadin)、マイクロ・プラスミン、ソノリシス (sonolysis) + tPA、V-10153、HTUPA、ソルリン (solulin)、ピクロゾタン、S-0139、S-18986、AEOL-10150、AL-208、KN-38-7271、ピリドキサル5-リン酸、Neu-2000KL、ONO-2231、PGX-100、RVX-208、SUN-N4057、SUN-N8075、TAT-NR2B9c、GLP-1発現幹細胞療法 (GLP-1-expressing stem cell therapy、GLP-1発現幹細胞治療薬)、Msc-1 (SA-4503、AGY-94806))、NH-02D (S-0139 259)、組織保護サイトカイン (LuAA24493)、V10153 270 (BB-10153 (TAPgen))、スタチンおよび他のコレステロール低下薬の配合使用、エリトロポイエチン、セレプロライシンならびにCDP-コリン (シチジン5'-ジホスホコリン) を挙げる。

【0036】

ラディックス・アストラガリ (メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ (ランタナルートまたはタンジン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ (レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフロラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング (チュアン・キシオング) の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス

(チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根)、カーサマス・ティンクトリアス(サフラワーまたはホンヒュア)のフラワー、プラナス・パーシカ(ピーチシードまたはタオレン)、ラディックス・ポリガラ(シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド)、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根)、バタス・マルテンシ(サソリまたはクアンキシの乾燥体)、リゾマ・アコリ・タタリノビ(グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎)、ヒルの乾燥体(ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ)、ユーポリファーガ・セウ・セテレオフィーガ(オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオフィーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体)、カルクラス・ボビス・アーティファクタス(ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウフアン、コイヌ・サイガ・タタリカ(アンテロープの角またはリングヤングジャオ)の少なくとも1つの以下の成分の有効量と前記細胞を接触することを備える細胞の増殖または分化を誘導するための方法を提供する。

10

【0037】

組成物は、細胞成長を促進することができるか、細胞生存率は組織工学または生体外治療への使用に用いることができる様々な細胞の生体外培養を促進することができる。1つの実施形態において、培養細胞を受けた患者は、NeuroAid(商標)も投与された。

20

【0038】

NeuroAid(商標)および類似組成物

前記成分は、組成物中に比較的粗形態(例えば未処理またはつぶしたハーブ)または比較的精製された形態(例えば精製された抽出物)で存在することができる。

【0039】

1つの実施形態において、Moleac Pte LtdからのNeuroAid(商標)が使用された。NeuroAid(商標)は、9つのハーブ成分および5つの動物系成分を含むカプセル状のTCM産物である。NeuroAid(商標)は、ラディックス・アストラガリ(メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ(ランタナルートまたはタンジン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ(レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング(チュアン・キシオング)の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス(チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根)、カーサマス・ティンクトリアス(サフラワーまたはホンヒュア)のフラワー、プラナス・パーシカ(ピーチシードまたはタオレン)、ラディックス・ポリガラ(シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド)、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根)、リゾマ・アコリ・タタリノビ(グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎)、バタス・マルテンシ(サソリまたはクアンキシの乾燥体)、ヒルの乾燥体(ヒルド、ウィットマニア・ピグラ・ウィットマン、ヒルド・ニッポニカ・ウィットマン・ウィットマニア・アクラヌラタ・ウィットマンまたはシュイジ)、ユーポリファーガ・セウ・セテレオフィーガ(オサムシ、ユーポリファーガ・シネンシス・ウォーカー、ステレオフィーガ・プランシーまたはチュビコンの乾燥体)、カルクラス・ボビス・アーティファクタス(ナチュラルまたはアーティフィシャルのカウベゾアールまたはレンゴン・ニウフアン、コイヌ・サイガ・タタリカ(アンテロープの角またはリングヤングジャオ)を含有する。

30

40

【0040】

他の実施形態において、NeuroAid IIは、ラディックス・アストラガリ(メンブラナウス・ミルクベッチまたはホワン・キの根)、ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ(ランタナルートまたはタンジン)、ラディックス・ペオニア・ルブラ(レッドピオニールート、ペオニア・ラクチフローラ・パル、ペオニア・ビーチ・リンチまたはカイ・シャオ)、リグスチカム・チュアンキシオング(チュアン・キシオング

50

）の根茎、ラディックス・アンジェリカ・シネンシス（チャイニーズ・アンジェリカまたはタングイの根）、カーサマス・ティンクトリアス（サフラワーまたはホンヒュア）のフラワー、プラナス・パーシカ（ピーチシードまたはタオレン）、ラディックス・ポリガラ（シンリーフヒメハギ、ポリガラ・テヌイフォリア・ワイルド）、ポリガラ・シビリカまたはユアンジの根）、リゾマ・アコリ・タタリノビ（グラスリーフ・スイートフラッグまたはシャイチャンプの根茎）を含有する。異国で異なる名称で登録されていることがあり得るNeuroAid（商標）（例えば南アフリカにおいてそれはStrocaid（商標）またはDanqi Plantan Jiaoang（商標））は、Tianjin Shitian Pharmaceutical Group Co., Ltd（ジアンシン工業地域Wangwenzhuang town, Xiqing district, Tianjin City, China; 郵便番号300381にある）によって中華人民共和国で製造され、市販されている。それはMoleac Pte Ltd（以前のMolecular Acupuncture Pte Ltd）からも入手可能である（11 Biopolis Way, Helios #09-08 Singapore 138667）。

【0041】

疑いを回避するため、NeuroAid（商標）は、現在売り出されている形状のNeuroAid（商標）のみを含むのではなく、例えばTianjin Shitian Pharmaceutical Group Co., LtdまたはMoleac Pte Ltdから販売されている将来のNeuroAid（商標）も含む。このような将来の処方、例えば投薬量またはその活性成分等の濃度において異なる。NeuroAid（商標）は、MLC 601としても既知であり、「NeuroAid（商標）」および「MLC 601」は、どちらを使っても変わりはない。同様にNeuroAid IIは、MLC 901としても既知であり、「NeuroAid II」および「MLC 901」の用語は、どちらを使っても変わりはない。

【0042】

神経保護剤

様々な機構を用いて、神経保護剤は、悪化する原因となる神経変性の疾患進行最中の死の危険において神経細胞組織を保護する化合物である。いくつかの神経保護剤としては、酸化防止剤（例えばセレンウム、30ビタミンE、ビタミンC、グルタチオン、システイン、フラボノイド、キノリン、還元活性を有する酵素等）、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体アンタゴニスト（デキストロルファン（dextrorphan）、セルホテル、マグネシウム）、麻薬受容体拮抗薬（ナルメフェン（セルベン）、Ca-導管遮断薬、Na-チャンネル調節剤（ルベルゾール）、α-アミノ酪酸作動薬（クロメチアゾール）、グルタミン酸受容体調節剤、セロトニン受容体拮抗薬（レピノタン）、リン脂質、遊離基捕捉剤（チリラザドおよびNXY-059）、星状細胞起動抑制剤（ONO 2506）、モノクローナル抗体、例えば抗ICAM-1（エンリモマブ）、ヒト抗白血球性抗体、Hu23F2G、膜安定剤CDP-コリン（シトコリン）、線維芽細胞成長因子（フィブラス）、不飽和性および高度不飽和脂肪酸、エストロゲンおよび選択的なエストロゲン受容体モジュレーター（SEAMS）、プロゲステロン甲状腺ホルモンおよび甲状腺ホルモン模倣化合物、シクロスポリンAおよび誘導体、サリドマイドおよび誘導体、メチルキサンチン、モノアミン酸化酵素阻害剤（IMAO）、セロトニン、ノルアドレナリンおよびドーパミン取り込み遮断薬、ドーパミンI作用薬、L-DOPA、ニコチンおよび誘導体ならびにNO合成酵素モジュレーターを挙げる。

【0043】

成長因子

様々な機構を使用して、成長因子は特定の細胞が分化または増殖することを促進する化合物である。いくつかの成長因子としては、骨形成タンパク質（BMP）、上皮細胞増殖因子（EGF）、エリトロポイエチン（EPO）、線維芽細胞成長因子（FGF）、顆粒白血球-コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒白血球-マクロファージ-コロニー刺激因子（GM-CSF）、肝細胞増殖因子（HGF）、インスリン様成長因子（IGF）、ミオスタチン（GDF-8）、神経成長因子（NGF）、ニューロトロフィン、血小板由来成長因子（PDGF）、トロンボポエチン（TPO）、形質転換成長因子α（TGF-α）

α)、形質転換成長因子 β (TGF- β)、血管内皮成長因子 (VEGF)、インターロイキン1 β (IL-1 β)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-21、IL-33、M-CSF、ノグギン、インターフェロン (IFN) - α 、IFN- β およびIFN- γ を挙げる。

【0044】

カリウムチャンネルTREK-1を活性化する化合物

西洋医学における使用に適切な他の薬は、カリウムチャンネルTREK-1を活性化することができる化合物を含む。TREK-1の活性化は、発作もしくは神経変性の体質の対象またはその危険性のある対象において、発作もしくは神経変性の影響を減少することが見出された。さらにTREK-1は、中枢神経系または末梢神経系の罹患または損傷のある組織のある患者およびうつ病、精神医学的な徴候、天然老化および外傷性脳細胞死を患った患者の治療において役割を果たすことも示された。NeuroAid (登録商標) は、カリウムチャンネルTREK-1を活性化しないので、発作または神経変性の影響を減少するため、カリウムチャンネルTREK-1を活性化することができる化合物が、NeuroAid (商標) (MLC 601) と組み合わせて使用することができ、中枢神経系もしくは末梢神経系の罹患または損傷のある組織を有する患者およびうつ病、精神医学的な徴候、天然老化および外傷性脳細胞死を患った患者を治療することができる。

10

【0045】

カリウムチャンネルTREK-1を活性化することができる化合物の1つの例は、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) である。多価不飽和脂肪酸は、1つ以上の二重結合を含む脂肪酸である。PUFAは、メチレン中断型ポリエンまたは共役脂肪酸として分類することができる。

20

【0046】

メチレン中断型ポリエンは、それぞれ単一のメチレン基によって分離される2つ以上のシス二重結合を有する脂肪酸である。必須脂肪酸は、全てオメガ-3および-6メチレン中断型ポリエンである。オメガ-3脂肪酸の例は、制限することなく、 α -リノレン酸 (ALA)、ステアリドン酸 (STD)、エイコサトリエン酸 (ETE)、エイコサテトラエン酸 (ETA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサペンタエン酸 (DPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、クルパノドン酸、テトラコサペンタエン酸またはニシン酸を含む。オメガ-6脂肪酸の例は、制限することなく、リノール酸 (LIN)、 γ -リノレン酸 (GLA)、イコサジエン酸、ジ・ホモ- γ -リノレン酸 (DGLA)、アラキドン酸 (AA)、ドコサジエン酸、アドレン酸、ドコサペンタエン酸またはオズボンド酸を含む。オメガ-9脂肪酸は、メチレン中断型ポリエンでもあり、一不飽和または多価不飽和があり得る。オメガ-9脂肪酸の例は、制限することなく、オレイン酸、エイコセン酸、ミード酸、エルカ酸またはネルボン酸を含む。

30

【0047】

共役脂肪酸は、2つ以上の共役二重結合を有する脂肪酸である。共役脂肪酸の例は、制限することなく、ラセミ酸、 α -カレンド酸、 β -カレンド酸、ジャカル酸、 α -エレオステアリン酸、 β -エレオステアリン酸、カタルプ酸、プニカ酸、ルメレン酸、 α -パリナリン酸、 β -パリナリン酸、ボセオペンタエン酸を含む。

40

【0048】

メチレン中断型ポリエンまたは共役脂肪酸として分類されるいくつかの他のPUFAは、制限することなく、ピノレン酸およびポドカルプ酸を含む。

【0049】

カリウムチャンネルTREK-1を活性化することができる他の化合物は、薬剤リルゾール (Rilutek (登録商標))、リゾリン脂質 (LPL)、カフェイン酸エステルおよびキセノンを挙げる。これらの化合物は、発作または神経変性の影響を減少させ、中枢神経系または末梢神経系の罹患または損傷のある組織である患者およびうつ病、精神医学的な徴候、天然老化および外傷性脳細胞死を患った患者を治療するため、NeuroAid (商標) (MLC 601) と組み合わせて使用することもできる。

50

【0050】

投与形態

NeuroAid（商標）（MLC 601）は、経口的、非経口的、静脈内、皮下、皮内、腹膜内もしくは局所的に、液状、半液体または固体で、投与することができ、それぞれの投与経路に適切な方法で処方される。NeuroAid（商標）（MLC 601）が経口投与される場合、4つの0.4gカプセルとして1日当たり3回服用するものとして投与することができる。嚥下が困難な患者に関して、カプセルは開封され、水に希釈された粉末のように飲むことができるか、胃管を通して注入することができる。それゆえに、約4.8gの1日量が想定される。1つの実施形態において、NeuroAid（商標）（MLC 601）の患者の1日の服用量は、約1gから8g；2gから8g；3gから7g；4gから6g；4.25gから5.75g；4.5gから5.25g；4.5gから5g；4.6gから4.10g；または4.7gから4.9gである。「1日の服用量」は、一定の日に服用する単一の錠剤もしくはカプセルなどまたは複数の錠剤もしくはカプセル等であることができる。

10

【0051】

1つの実施形態において、NeuroAid（商標）（MLC 601）治療のそれぞれの一連は、約4週間続く。通常、3つの一連は、最も一般的に連続して投与される。治療濃度域は必要とされないが、付加的な一連は治療中断後数日後にさえも追加することができる。それゆえに、1つの実施形態において、それぞれNeuroAid（商標）（MLC 601）の治療は、約12週間続く。他の実施形態において、NeuroAid（商標）（MLC 601）の治療の一連は、約4から24週間；7から16週間；9から15週間；10から14週間；または11から13週間である。

20

【0052】

他の実施形態において、NeuroAid（商標）（MLC 601）は、慢性病に対処するための慢性治療としてまたは予防措置としても使用することができる。

【0053】

1つの実施形態において、NeuroAid（商標）（MLC 601）は、細胞成長を促進する西洋医学との併用療法の一部としても使用することができる。NeuroAid（商標）（MLC 601）および細胞成長因子の併用パートナーは、単一の処方にて存在することができるか、別途の処方として存在することができる。1つの実施形態において、相乗効果があり得る。

30

【0054】

併用パートナーNeuroAid（商標）（MLC 601）および細胞成長因子は、一緒に（例えば併用）、異なる時間（例えば順次）または互いに独立してか、重なり合っ

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0055】

細胞成長因子が使用されるとき、適切な投与の一連および服用レベルが当業者に公知であるか、当業者によって容易に決定することができる。概して、医療において周知のように、投与計画は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間および経路、公衆衛生および一度に投与される他の薬剤を含む様々な要因に依存することがあり得る。個々のニーズが異なる一方、それぞれの成分の有効量の最適な範囲の決定は、当業者の範囲内である。投薬量は、薬がNeuroAid（商標）（MLC 601）なしで用いられる場合、投与されるものと等量である。

40

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】8日目、10日目、および14日目におけるNeuroAid（商標）（MLC 601）処理の細胞生存率への容量効果の棒グラフを示すグラフである。3つの濃度（

50

0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の NeuroAid (商標) (MLC 601) が、コントロールと比較された。

【図2】10日目および14日目における NeuroAid (商標) (MLC 601) の処理のLDH放出への効果の棒グラフを示すグラフである。濃度1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid (商標) (MLC 601) が、コントロールと比較された。

【図3】3日目および14日目における神経細胞DCX発現への NeuroAid (商標) (MLC 601) 処理の効果の共焦点画像を示す図である。濃度1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid (商標) (MLC 601) が、コントロールと比較された。

【図4】8日目、10日目、12日目および14日目の NeuroAid (商標) (MLC 601) および NeuroAid II (MLC 901) の処理の細胞生存率への容量効果の棒グラフを示すグラフである。濃度1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid (商標) (MLC 601) および1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid II (MLC 901) が、コントロールと比較された。

【図5】8日目、10日目、12日目および14日目における NeuroAid (商標) (MLC 601) および NeuroAid II (MLC 901) 処理のLDH放出への影響の線グラフを示すグラフである。濃度1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid (商標) (MLC 601) および1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid II (MLC 901) が、コントロールと比較された。

【図6】3日目および14日目における NeuroAid (商標) (MLC 601) および NeuroAid II (MLC 901 処理) のDCX発現への影響の共焦点画像を示す図である。濃度1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid (商標) (MLC 601) および1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid II (MLC 901) が、コントロールと比較された。

【図7】発作への NeuroAid II (MLC 901) 処理の実験プロトコルの概略図を示す図である。図7Aは、NeuroAid II (MLC 901) 処理の影響を調査した実施例4の実験プロトコルを示し；図7Bは、NeuroAid II (MLC 901) 処理の影響を調査した実施例5の実験プロトコルを示す。双方の研究は、生存率を評価し、また梗塞体積を虚血後に定量化した。

【図8】24時間の虚血後における NeuroAid II (MLC 901) の前処理後の生存率の棒グラフを示すグラフである。

【図9】24時間の虚血後における NeuroAid II (MLC 901) の処理後の生存率 (A) および梗塞体積 (B) の棒グラフを示すグラフである。

【図10】処理12日目に推定される培養組織での NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング・ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの処理 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の皮質ニューロンへの比較効果バーチャートを示すグラフである。図10Aは細胞生存率へのそれぞれの処理の影響を示し、図10BはLDH放出へのそれぞれの処理の影響を示す。

【図11】NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせとの生体内虚血性脳損傷に対する処理後のバーチャートの比較効果を示す表である。図11Aおよび図11Bは、それぞれ生存率 (A) および梗塞部体積 (B) を示す。

【図12】NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオングおよびラディックス・アンジェリカ・シネンシスとの生体内虚血性脳損傷に対する処理後のバーチャートの比較効果を示す表である。図12Aおよび図12Bは、それぞれ生存率 (A) および梗塞部体積 (B) を示す。

【図13】処理12日目の培養皮質細胞における NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの処

10

20

30

40

50

理（ $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）間の生体外DCX免疫発現への典型的な落射蛍光顕微鏡法写真の比較効果を示す図である。

【図14】落射蛍光顕微鏡法にて観測された免疫染色された神経細胞におけるDCXシグナル強度のバーチャートを示す図である。

【図15】落射蛍光顕微鏡法において測定されて得られた神経突起の伸長および処理作用における神経突起の全長（ μm ）のバーチャートを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0057】

本発明の非制限例は、発明の範囲をいかなる形であれ制限するものと解釈されるべきでない具体例を参照することによって、さらに詳細に記載されている。

10

【0058】

材料

皮質サンプリングのための培地：

－皮質サンプリングのための培地：HBS S/L

水中にNaCl 8 g/L

KCl 0.26 g/L

MgSO₄ 0.2 g/L

CaCl₂ 0.264 g/L

NaH₂CO₃ 2.24 g/L

NaH₂PO₄ 0.15 g/L

20

【0059】

－HBS S+：6 g グルコースを添加する。

【0060】

細胞培養培地

ニューロバーサル（21103-049；Invitrogen；San Diego, カリフォルニア州）

B27（n°17504；Invitrogen；San Diego, カリフォルニア州）

ウリジン（U3003；Sigma, St. Louis, ミズーリ州, アメリカ合衆国）

フルオロ・デオキシ・ウリジン（46875；Fluka-Chemika-Biochemika, Buchs, スイス）

グルタマックス（35050；Gibco-BRL Life Technologies. GmbH, Karlsruhe, ドイツ）

30

抗生物質（ペニシリン・ストレプトマイシン）（Gibco-BRL Life Technologies. GmbH, Karlsruhe, ドイツ）

【0061】

動物

全ての実験は、欧州共同体法律の実験動物の保護および使用の方針に従って実行された。現地の倫理委員会は、実験の承諾をした（プロトコル番号NCA/2006/10-1およびNCA/2006/10-2）。22から26 gの重さの成熟雄C57/B16マウスが、この研究に使用された。動物は、12時間の明暗周期と制御された実験室条件下、 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ の温度、60から70%の湿度、薬剤治療または手術から少なくとも1週間前収容された。マウスは、標準の齧歯動物の食餌および水道水にフリーアクセスがある。

40

【0062】

NeuroAid II（MLC 901）飲用溶液

NeuroAid II（MLC 901）の1つのカプセルは、1時間 37°C で攪拌器との攪拌によって66 mLの水に溶解された。その後、溶液は $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過された。

【0063】

腹腔内注射のためのNeuroAid II（MLC 901）

NeuroAid II（MLC 901）カプセルから30 mgは、 37°C 、60分間、濃度 $10 \text{ mg}/\text{mL}$ （貯蔵液）に相当する3 mLの食塩水に希釈された。実験に使用される濃度は、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ （注入体積： $500 \mu\text{L}$ ）である。投与量 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ を得

50

るため、貯蔵液は100で希釈された。希釈後、混合物は良い均質化を得るためボルテックスされ、0.45 μ mフィルターに濾過された。

【0064】

方法

A. 皮質細胞培養

妊娠齢 (E14) C57BL/6/Jマウスは、イソペンタンで麻酔をかけられた後に頸椎脱臼がされた。胎児は、取り除かれ、冷たい (Hanks Balanced Salt Solution) HBSS + 溶液に配置された。大脳皮質は、冷たいHBSS + 溶液中で解剖され、髄膜が取り除かれた。皮質サンプルは、8 mLのHBSS + 溶液中、火造りガラスパスツールピペットで小さく切断され、徐々に粉末にされた。混合物は濾過され (40 μ mフィルター)、800 rpm、8分間、遠心分離機で分離された。上澄みは取り除かれ、ペレットは2 mLの培養培地中に溶解された。細胞は、密度 1×10^6 細胞/ウェルでガラスカバースリップ (直径12 mm; CML, Nemours, フランス) とポリリシン被覆された12個のウェル (直径24 mm; Sigma-Aldrich Chimie, St. Quentin Fallavier, フランス) のプレートに播種された。培養組織は、37°C、湿気5%のCO₂大気中のインキュベーター内でB27、グルタマックと補足されたニューロベサルで維持され、抗生物質は実験後16日目に使用された。グリア成長は、培養2日目に、5-フルオロ-2-デオキシウリジン (2 μ M) およびウリジン (2 μ M) の添加によって抑制された。

10

【0065】

B. NEUROAID (商標) (MLC 601) 処理

NeuroAid (商標) (MLC 601) カプセルから30 mgが、37°Cで60分間の期間、濃度10 mg/mL (貯蔵液) に相当する3 mLのニューロベサル培地中に希釈された。実験において試験された濃度は、培養培地1 μ g/mLまたは10 μ g/mLである。NeuroAid (商標) (MLC 601) 溶液1 mLが、プレートのそれぞれ24 mmのウェルに加えられた。

20

【0066】

投与量1 μ g/mLを得るため、貯蔵液は100倍で希釈された：0.1 mg/mL (24 mmウェル当たり10 μ L/mL、1 μ g/ウェルに相当する)。

【0067】

投与量10 μ g/mLを得るため、貯蔵液は10倍で希釈された：1 mg/mL (24 mmウェル当たり10 μ L/mL、10 μ g/ウェルに相当する)。

30

【0068】

希釈後、混合物は良い均質化を得るためボルテックスされ、0.45 μ mフィルターで濾過された。

【0069】

細胞は毎日NeuroAid (商標) (MLC 601)、NeuroAid II (MLC 901) またはニューロベサル培地で培養1日目から処理された。

【0070】

C. 乳酸脱水素酵素 (LDH) 測定

神経細胞損傷は、細胞培養培地中で培養され、インキュベートされた神経細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出によって定量的に評価された。1, 5, 8, 10, 12, 14および16日目に、細胞培養培地100 μ Lは、培養ウェルから96ウェルプレートに移され、LDH分析キット (Roche Diagnostic: 細胞毒性検出キット: ref 1644793、インディアナポリス州、アメリカ合衆国) に従って反応溶液100 μ Lと混合した。光学密度 (OD) は、30分後、LabSystem Multiscanマイクロプレートリーダー (LabSystem Multiscan RC、フィンランド) を用いて492 nmで測定された。620での背景吸光度が、減算された。LDH活性は、25 μ L培地体積中に存在する活性として示された。結果はOD $\times 10^{-3}$ として示される。

40

【0071】

D. 細胞生存率

50

1, 5, 8, 10, 12, 14および16日目、細胞培養培地の全てが、取り除かれ、ニューロベーサル培地+Cell Titer96 (登録商標) Aqueous One Solutionキット Cell Titer 96 (r) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit 500 μ L と入れ替えられた。神経細胞生存率は、Cell Titer 96 (r) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, マディソン、アメリカ合衆国) を用いて測定された。増殖分析キットプロトコールによると、細胞は湿度5%のCO₂大気インキュベーター中、4時間、37℃でインキュベートされた。反応は2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で止められた。最適濃度は、Labsystem Multiscanマイクロプレートリーダーを用いて4時間後、490nmで測定された。620での背景吸光度が、減算された。結果は生存細胞を示すOD $\times 10^{-3}$ として示された。

10

【0072】

細胞生存率およびLDHの統計分析の結果は、1つの要因 (分散分析) 分散分析試験を用いた後、事後試験によって評価された。

【0073】

E. カバースリップ上の皮質細胞の二重コルチン (DCX) 免疫組織化学

皮質細胞は、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS) 中の4%パラホルムアルデヒドでカバースリップ上に固定され、10分間、0.3%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween20, Sigma) で透過され、PBS中の2.5%ロバ血清と2時間、室温でブロッキングした。カバースリップは、2%ロバ血清/PBS中、ヤギ抗ダブルコルチン (DCX) 抗体 (1:200, SC-8066, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, カリフォルニア州) と一晩、インキュベートされた。PBS中で3回洗浄後、カバースリップは、2%ロバ血清中、2時間、抗ヤギAlexa 488結合した抗体 (FluoProbes, Interchim, Montlucon, フランス) においてインキュベートされ、3回PBS中でそれぞれ5分間洗浄された。カバースリップは、その後、10分間細胞核を標識するため、ヘキスト溶液中 (10mL中の3 μ L; Sigma-Aldrich Chimie, Sait Quentin Fallavier, フランス) で、インキュベートされた。PBS中で2回、水中で1回洗浄した後、カバースリップは乾燥され、フルオロプレップ (7521; BioMerieux, Marcy l'Etoile, フランス) とスライド・ガラス上に封入された。細胞は落射蛍光および共焦点顕微鏡法を用いて観測された。共焦点顕微鏡法観測は、DMIRBE倒立顕微鏡およびアルゴン・クリプトン・レーザー (レーザー励起488nm、10nmごとに500-600nmを取得) を備えたレーザー走査共焦点顕微鏡法 (TCS SP, Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, ドイツに拠点を置く) を使用して、実行された。シグナルの特異性は、陰性コントロールカバースリップで、DCXタンパク質に対して向けた一次抗体を除くことによって評価された。画像は、1つの細胞間光学的断面として得られ、フレーム当たり少なくとも4つのスキャンとして均一化された。DCX-Alexa-488抗体標識された共焦点画像が、それから自動蛍光背景のスペクトル修正後、得られた。

20

30

【0074】

F. C57Bl/6マウスにおけるNeuroAid II (MLC 901) の効果を研究したとき使用した生理的パラメータ

全身麻酔は、オープンフェースマスク (open facemask) を用いて、それぞれのマウスに3%イソフルランで誘導され、1%イソフルランで維持された。マウスは自然に呼吸することができる。動物のサブセット (グループ当たりn=5) は、平均動脈血圧 (MAP)、直腸温度、動脈血液ガスならびに虚血の前、その間および後の虚血を含む生理的パラメータに関して観測された。右大腿動脈は、MAP (mmHg) の継続的な観測のため、PE-10ポリエチレン管でカテーテルを挿入され、血圧変換器に接続された (Harvard Apparatus, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国)。ヘパリンで凝血防止された血液サンプル (75 μ L) が、その後カテーテルを挿入された大腿動脈から得られ、血液中のpO₂、pCO₂およびpHが酸塩基実験系 (ABL 555, ラジオメーター) を使用して測定された。中核温は、直腸に挿入された温度計 (3mmプローブ直径; Harvard Apparatus, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国) で継続的に観測され、サーモスタットで

40

50

制御された加熱毛布 (Harvard Apparatus, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国) を使用して、生理的温度で維持された。中核温は、恒温性毛布調節の組み合わせによって、生理的値で維持された。

【0075】

G. C57Bl/6 マウスにおける一過性局所脳虚血の誘発

局所虚血は、腔内フィラメント (intraluminal filament) 技術 (Heurteaux など、2006) を使用した、左中大脳動脈 (MCA) の閉塞によって誘発された。首の中線切開がされた後、総頸動脈および外頸動脈は、分離され、絹4-0シルクシルク縫合糸で結紮された。一時的な Yasargil 動脈瘤クリップ (BMH31, Aesculap, Tuttlingen、ドイツ) は、仮に内部頸動脈に配置された。直火で先端を平滑にされた6-0コーティングされたフィラメント (Doccol, Redlands, カリフォルニア州、アメリカ合衆国) は、MCA (the origin of the MCA) の閉塞のため、小さい切開から総頸動脈および頸動脈分岐から13mm末端へ導入された。動物は、慎重に抜糸された後、1時間、37℃で、MCA領域の再かん流を可能とするため保たれた。MCAOの重度を制御するため、局所CBF (rCBF) は、虚血性皮質を通した無傷頭蓋に固定されたマスタープローブへ (2mm後部およびブregマから6mmの側面) 弾性0.5mm光ファイバーエクステンションを用いたレーザードップラー血流計 (Perimed) によって、測定された。疑似手術は、MCAの閉塞することを進めることなく糸を総頸動脈に挿入することによって、実行された。動物は、おりに戻される前、加温パッド上で、完全に意識を回復することを許容された。

【0076】

H. 梗塞体積の測定

梗塞部体積を急性 NeuroAid II (MLC 901) 処理後の研究 (実施例5) において評価するため、マウスは、再かん流24時間後、屠殺された。それらの脳は取り除かれ、6枚の厚さ1mmの冠状切片に組織切断デバイス (Phymep, フランス) を使用して切断された。冠状脳切片は、室温暗闇で20分間、2%の2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC, Sigma, フランス) 中に浸した後、4%パラホルムアルデヒド溶液中で一晩、前記分析前 (Ding-Zhou など、2002) に固定した。薄く輪郭を描かれた梗塞の線条体および皮質面積は、それぞれの断片で、コンピュータ画像分析システムを使用して測定され、Golanov and Reis (Golanov and Reis, 1995) に従って脳浮腫を修正した。 mm^3 として示された梗塞部体積が、修正された損傷部位の一次積分によって算出された。

【0077】

さらに生存神経細胞の星状細胞体 (stellate soma) 内のニッスル小体を染色する染料クレシル・バイオレットが、梗塞部体積の進化を虚血性マウスにおいて確認するため、使用された。凍結された脳冠状切片 (厚さ10 μm) が、0.25%酢酸中の1%クレシル溶液に3分間、添加され、すすがれ、脱水され、エンテランで封入された。切片は、顕微鏡検査で分析された。

【実施例】

【0078】

細胞生存率およびLDH放出への NeuroAid (商標) (MLC 601) の用量効果

前記方法に従って調製された皮質細胞は、4つの濃度: 0.1, 0.5, 1.0, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid (商標) (MLC 601) に培養1日目から14日目までさらされた。細胞生存率は、8, 10および14日目に前記方法に従って研究され、結果は図1に示す。

【0079】

長期に渡る培養組織における皮質細胞の神経変性に対する NeuroAid (商標) (MLC 601) 処理の影響は、LDH放出によっても解析された。細胞死を導く上昇した細胞傷害は、上昇したLDH放出と関連がある。LDH放出は、10日目および14日

目に前記方法によって測定され、結果は図2に示す。

【0080】

結果

図1は、14日目に濃度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のNeuroAid（商標）（MLC 601）での処理が、コントロールと比較して神経細胞生存率における著しい上昇（35%）を誘導したことを示す（** $P<0.01$ ）。10日目まで、NeuroAid（商標）（MLC 601）濃度0.1, 0.5, $1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理した細胞への細胞生存率のパーセンテージにおける著しい相違は、コントロール（ $P>0.05$ ）と比較して存在しなかった（実験グループ当たり $n=10$ ウェル）。

【0081】

図2は、10および14日目のNeuroAid（商標）（MLC 601）濃度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ でのLDH放出／細胞生存率の比率を示す。コントロールと比較して、NeuroAid（商標）（MLC 601）処理は、培養10および14日後、LDH放出を著しく減少した（ $P<0.01$ ）（実験グループ当たり $n=10$ ウェル）。

【0082】

実施例1の実験データに基づいて、培養組織における皮質細胞のNeuroAid（商標）（MLC 601）での処理が、細胞傷害の標識である上昇した細胞生存率および減少したLDH放出を表すことを示すことができる。実施例1は、発作もしくは神経変性の体質の対象または発作もしくは神経変性の危険な状態にある対象への影響を減少するため；中枢神経系または末梢神経系の罹患または損傷のある組織がある対象を治療するため；または細胞培養試薬としてしようするためNeuroAid（商標）（MLC 601）が使用することができることも示す。

【0083】

実施例2

NeuroAid（商標）（MLC 601）の神経細胞増殖／神経細胞新生への影響DCXは、成熟脳における発達したCNSの全ての遊走前駆細胞および連続的な神経発生の部位で、特異的に発現した高度に親水性な微小管結合タンパク質である。神経細胞増殖は、培養皮質細胞におけるDCX発現から前記方法によって解析された。前記方法のように調製された皮質細胞は、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のNeuroAid（商標）（MLC 601）で、培養1日目から14日目まで処理された。細胞は、前記方法のように落射蛍光および共焦点を使用して、DCX発現を測定するため、その後調製され、観測された。結果は図3に示される。

【0084】

結果

図3において、DCXに対する抗体での染色は、3日目に $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のNeuroAid（商標）（MLC 601）で処理したコントロールおよび皮質細胞の間のDCX発現に相違がなかったことを示す。しかしながら、14日目にDCX免疫反応はコントロールにて消失していた、一方、重要な軸索および樹木状のネットワークの発達を強調したNeuroAid（商標）（MLC 601）処理によって誘発されたDCX発現の上昇が存在した。

【0085】

その神経性工程との関連のため、DCXタンパク質は、現在、神経発生のための標識として使用されている。DCXは、胎児および成人の脳における全ての遊走性神経性前駆細胞と関連のある微小管結合タンパク質である。DCXは、ヒトのDCXにおける突然変異体が、これら神経細胞の遊離停止を特徴とする症候群を導き、皮質下層異所形成、精神薄弱および発作によって臨床的に明らかにされるため、皮質神経細胞の正常な発達上の遊走に重要であると考えられる。DCXは、軸索の伸長およびシナプス形成に伴う生体脳におけるいくつかの成熟神経細胞でも発現されている。

【0086】

従って、実施例2の実験データに基づいて、NeuroAid（商標）（MLC 60

10

20

30

40

50

1)での処理は、皮質細胞におけるDCX発現の上昇を生じて、を示すことができ、NeuroAid (商標) (MLC 601)での処理は、神経機能(例えば運動および認識)を復元するのに必要な神経増殖、神経発生および神経修復を向上することを強く示唆する。実施例2は、NeuroAid (商標) (MLC 601)が、中枢神経系または末梢神経系の組織において、神経細胞の神経伸長および神経細胞の増殖を促進するため、細胞成長を促進するため、NeuroAid (商標) (MLC 601)を使用した細胞生存率、細胞の成長、増殖または分化を誘発する方法のために使用することができることも示す。

【0087】

実施例3

NeuroAid (商標) (MLC 601)およびNeuroAid II (MLC 901)処理の細胞生存率、LDH放出および神経細胞増殖への影響
皮質細胞は濃度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のNeuroAid (商標) (MLC 601)またはNeuroAid II (MLC 901)に培養1日目から14日目までさらされた。この濃度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ は、前記細胞生存率およびLDH放出に得られた最高の結果に相当する。細胞生存率は、8, 10, 12および14日目に研究された。神経細胞増殖は、やがて $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のNeuroAid (商標) (MLC 601)またはNeuroAid II (MLC 901)で処理された培養組織における皮質細胞においてDCX発現を観測することによって、分析された。

【0088】

結果

図4は、8日目に、神経細胞生存率における著しい上昇が、それぞれのコントロールと比較して $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のNeuroAid (商標) (MLC 601)またはNeuroAid II (MLC 901)で処理した皮質細胞において観測されたことを示す(* * $P<0.01$; * * * $P<0.001$)。しかしながら、双方の処理の最も高い効率が、14日目に細胞生存率 $\sim 45\%$ 上昇で、観測された(* * * $P<0.001$)。NeuroAid (商標) (MLC 601)およびNeuroAid II (MLC 901)の間の影響の著しい相違は、異なる段階での培養に存在しなかった(実験グループ当り $n=10$ ウェル)。

【0089】

図5は、LDH放出/細胞生存率の比率に関して、濃度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のNeuroAid (商標) (MLC 601)およびNeuroAid II (MLC 901)処理の比較を、8, 10, 12および14日目で示す。コントロールと比較して、双方の処理は、培養12および14日後、LDH放出を著しく減少した(* $P<0.05$ および* * * $P<0.001$) (実験グループ当り $n=10$ ウェル)。NeuroAid (商標) (MLC 601)およびNeuroAid II (MLC 901)処理の間で、LDH放出に関する影響への著しい相違は存在しなかった。

【0090】

図6は、コントロールと比較して、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のNeuroAid (商標) (MLC 601)またはNeuroAid II (MLC 901)で処理された皮質細胞が非常に濃い軸索および樹木状のネットワークを発達させたことを示した。14日目、DCX免疫反応は、コントロールで消失していて、DCXタンパク質の標識は、NeuroAid (商標) (MLC 601)で処理した皮質細胞およびNeuroAid II (MLC 901)で処理した皮質細胞の間で異なっていた。DCXタンパク質は、NeuroAid (商標) (MLC 601)またはNeuroAid II (MLC 901)処理した皮質細胞の工程において、常に発現していた。しかしながら、NeuroAid II (MLC 901)で処理した皮質細胞において、これら細胞の細胞質で、DCX免疫反応の安定した上昇が存在することが考えられる。

【0091】

双方のNeuroAid (商標) (MLC 601) (NeuroAid (商標) (M

10

20

30

40

50

LC 601) および NeuroAid II (MLC 901)) で得られた結果は、皮質細胞にて細胞生存率の上昇、LDH放出の上昇およびDCX発現の上昇を示した。NeuroAid (商標) (MLC 601) および NeuroAid II (MLC 901) の結果の間で、著しい相違は存在しなかった。従って、実験データに基づいて、NeuroAid (商標) (MLC 601) 処理 (NeuroAid (商標) (MLC 601)) および NeuroAid II (MLC 901) の双方が、神経増殖、神経発生および神経修復を恒常し、神経病および神経系損傷のための強化された処理形体があり得ることを示すことができる。

【0092】

上記実験結果は、神経細胞培養組織の全種類の結合性および生存率の改善のための NeuroAid (商標) (MLC 601) および NeuroAid II (MLC 901) 抽出物の使用も支持する。これらの抽出物は、生存率、樹枝状成長およびシナプス形成の相当な改善のため、神経細胞培養組織の典型的な培養培地へ系統的に添加することができる。実施例3は、(NeuroAid (商標) (MLC 601) および NeuroAid II (MLC 901)) が、中枢神経系もしくは末梢神経系の組織における神経細胞の神経伸長および神経細胞の増殖のため、細胞成長の促進のため、うつ病、精神医学的な徴候、天然老化および外傷性脳細胞死の群から選択される状態にある患者の治療のため、発作もしくは神経変性の体質の対象または発作もしくは神経変性での対象における影響の減少のため、細胞成長の促進のため、中枢神経系または末梢神経系の罹患または損傷のある組織にある患者の治療のため、細胞培養試料としての使用のため、細胞生存率、細胞の成長、増殖もしくは分化を誘発するための方法のために使用することができることも示す。

【0093】

実施例4

24時間虚血後のマウスにおける NeuroAid II (MLC 901) 前処理の影響

本研究において、マウス (n=11) は、6週間、NeuroAid II (MLC 901) の飲用溶液で前処理され、生存率は、虚血24時間後に分析された (図7A)。コントロールマウス (n=10) は、水道水飲用溶液を得た。

【0094】

NeuroAid II (MLC 901) の前処理は、虚血の対象であるマウスの生存率を上昇するかどうか決定するため、動物は NeuroAid II (MLC 901) で、6週間の間、虚血の誘発前に処理された。図8は、飲料として与えられた NeuroAid II (MLC 901) の6週間の前処理が、コントロールマウスと比較して、NeuroAid II (MLC 901) 処理された動物の死亡率の安定した減少を誘発することを示す。6週間の間の NeuroAid II (MLC 901) 前処理は、コントロールグループの40.0%と比較して、90.9%の生存率を誘導した。

【0095】

実施例4は、NeuroAidが虚血性脳梗塞前に有利であることを示す。これらの研究は、NeuroAidが、虚血性マウスの梗塞部サイズおよび死亡率を、発作に臨床的に関連するモデルにて有利に減少したことを示す。

【0096】

実施例5

24時間虚血後のマウスにおける急性 NeuroAid II (MLC 901) 処理後の影響

本研究において、マウス (n=10) は、急性期治療後に NeuroAid II (MLC 901) の腹腔内注射を導入され、虚血の発症および再かん流の6時間後に与えられた。コントロールマウス (n=10) は、食塩水を注射された。生存率および梗塞部体積は、再かん流24時間で、定量化された。

【0097】

急性期のNeuroAid II (MLC 901) の投与が、虚血性脳梗塞から保護するかどうか決定するため、マウス (n = 10) は虚血の対象とされ、NeuroAid II (MLC 901) 溶液 1 mg/mL の単回投与で、虚血の発症および再かん流 6 時間後に内部腹膜注射された。急性期のNeuroAid II (MLC 901) の投与は、コントロールマウスにて観測された 38.8% と比較して、生存率 90.0% を誘発した (図 9A)。このNeuroAid II (MLC 901) 処理後は、図 9B に示すように、脳梗塞を大幅に減少した。NeuroAid 処理後は、コントロールマウスと比較して、1 回拍出量を 47.4% ($P < 0.001$) 減少した。

【0098】

これらの研究は、NeuroAid が、虚血性脳梗塞の前後で、有利であることを示す。これらの研究は、NeuroAid が、虚血性マウスの梗塞部サイズおよび死亡率を、発作に臨床的に関連するモデルにて有利に減少したことを示す。

【0099】

実施例 6 から 8 の方法

A. 皮質細胞培養

妊娠例 (E14) C57BL/6/J マウスは、イソペンタンで麻酔をかけられた後、頸椎脱臼された。胎児は、取り除かれ、冷たい (Hanks Balanced Salt Solution) HBSS + 溶液に配置された。大脳皮質は、冷たい HBSS + 溶液中で解剖され、髄膜が取り除かれた。皮質サンプルは、8 mL の HBSS + 溶液中、火造りガラスパスツールピペットと小さく切断され、徐々に粉末にされた。混合物は濾過され (40 μ M フィルター)、800 rpm で、8 分間遠心分離機で分離された。上澄みは取り除かれ、ペレットは 2 mL の培養培地中に溶解された。細胞は、密度 1×10^6 細胞/ウェルでガラスカバースリップ (直径 12 mm; CML, Nemours, フランス) とポリリシン被覆された 12 個のウェル (直径 24 mm; Sigma-Aldrich Chimie, St. Quentin Fallavier, フランス) のプレートに播種された。培養組織は 37°C、湿気 5% の CO₂ 大気中のインキュベーター内で、B27、グルタマックと補足されたニューロベーサルで維持され、抗生物質は実験後 16 日目に使用された。グリア成長は、培養 2 日目の間、5-フルオロ-2-デオキシウリジン (2 μ M) およびウリジン (2 μ M) の添加によって抑制された。

【0100】

実験は、処理状態を盲検にされた 1 人の研究者に観測された (実験グループ当り n = 3 培養組織、36 ウェル)。

【0101】

B. 細胞損傷分析：細胞生存率および乳酸脱水素酵素の測定

細胞生存率は、細胞培養 12 日目に Cell Titer 96(r) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, フランス) を使用して評価された。分析は、ミトコンドリア活性の標識および電子結合試薬 (フェナジンエチル硫酸、PES) である 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム内塩 (MTS) の使用に基づく比色法である。MTS テトラゾリウム化合物は、細胞によって細胞培養培地に溶解性である着色ホルマザン産物へ生体還元された。

【0102】

12 日目、全部の細胞培養培地は取り除かれ、500 μ L のニューロベーサル培地 + Cell Titer 96 Aqueous One Solution kit: Cell Titer 96(r) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit と交換された。増殖分析キットプロトコールによると、細胞は湿度 5% の CO₂ 大気インキュベーター中、4 時間、37°C でインキュベートされた。反応は 2% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で止められた。光学密度は、4 時間後、490 nm で Labsystem Multiscan マイクロプレートリーダー (Labsystem Multiscan RC, VWR International, Fontenay sous Bois, フランス) を用いて測定された。620 での背景吸光度が、減算された。結果は、生存細胞を示す光学密度 ($OD \times 10^{-3}$) にて示された。データは、それぞれのグループで処理サンプルの吸光度を非処理のコントロールのもの

で除算することによって算出した細胞生存率のパーセンテージとして示された。

【0103】

神経細胞損傷は、細胞培養培地中で細胞培養12日目にインキュベートされた培養神経細胞からの乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出の測定によって、定量的に評価された (Koh and Choi, 1987)。LDH放出分析は、細胞質膜の品質の測定を提供する。12日目で、細胞培養培地100 μ Lは、培養ウェルから96穴プレートに移され、LDH分析キット (Roche Diagnostic: 細胞毒性検出キット: ref 1644793、インディアナポリス州、アメリカ合衆国) に従って反応溶液100 μ Lと混合した。光学密度は、30分後、492 nmでLabsystem Multiscanマイクロプレートリーダー (Labsystem Multiscan RC, VWR International, Fontenay sous Bois, フランス) を用いて測定された。620での背景吸光度が、減算された。溶解液 (0.1%トリトンX-100を含むPBS) にさらされた神経細胞は、100%のLDH放出として設定された陽性対照として使用された。データは、LDH流出/細胞生存率の比率として示された。

10

【0104】

結果は、3つの測定での3つの独立した実験の平均に対応する。細胞生存率およびLDHの統計分析の結果は、1つの要因 (分散分析) 分散分析試験を用いた後、事後試験によって評価された。

【0105】

C. 局所虚血

虚血性手術および梗塞部体積を測定した研究者は、処理コードに関して二重盲検法でされた。

20

【0106】

局所虚血のモデル

局所虚血は、腔内フィラメント技術を使用した左中大脳動脈 (MCA) の閉塞によって、重量22から26 gの成熟雄C57/B16マウス (生後7-9週間) で、誘発された (Huang et al., 1994)。総頸動脈および外頸動脈は、分離され、絹4-0シルクシルク縫合糸で結紮された (Ethicon)。一時的なYasargil動脈瘤クリップ (BMH31, Aesculap, Tuttlingen, ドイツ) は、仮に内部頸動脈に配置された。6-0コーティングされたフィラメント (Doccol, Redlands, カリフォルニア州、アメリカ合衆国) は、MCA (the origin of the MCA) の閉塞のため、小さい切開から総頸動脈および頸動脈分岐から13 mm末端へ導入された。動物は、慎重に抜糸された後、1時間、37°Cで、MCA領域の再かん流を可能とするため保たれた。MCAOの重度を制御するため、局所CBF (rCBF) は、虚血性皮質を通した無傷頭蓋に固定されたマスタープローブへ (2 mm後部およびブregmaから6 mmの側面) 弾性0.5 mm光ファイバーエクステンションを用いたレーザードップラー血流計 (Perimed) によって測定された。疑似手術は、MCAの閉塞することを進めることなく糸を総頸動脈に挿入することによって、実行された。動物は、おりに戻される前、加温パッド上で、完全に意識を回復することを許容された。

30

【0107】

梗塞体積の測定

再かん流30時間後、冠状の凍結脳切片 (厚さ10 μ m) へのクレシル・バイオレット染色は、0.25%酢酸中の1%クレシル・バイオレットを使用して実施され、エンテランで封入された。薄く輪郭を描かれた梗塞の線条体および皮質面積は、それぞれの断片で、コンピュータ画像分析システムを使用して測定され、Golanov and Reis (Golanov and Reis, 1995) に従って脳浮腫を修正した。mm³として示された梗塞部体積が、前記のように修正された損傷部位の一次積分によって算出された (Heurteauxnadoなど、2006 a)。

40

【0108】

D. 薬剤治療

使用したNeuroAid II (MLC 901) の組成物 (カプセル当り0.4 g

50

）は、以下の通りであった：

- 0. 57 g ラディックス・アストラガリ
- 0. 114 g ラディックス・エト・リゾマ・サルビア・ミルチオリジ
- 0. 114 g ラディックス・ペオニア・ルブラ
- 0. 114 g リゾマ・チュアンキシオング
- 0. 114 g ラディックス・アンジェリカ・シネンシス
- 0. 114 g カーサマス・ティンクトリアス
- 0. 114 g プラナス・パーシカ
- 0. 114 g ヒメハギ
- 0. 114 g リゾマ・アコリ・タタリノビ
- 0. 0665 ヒルド

10

【0109】

生体外実験のため、NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせでの細胞処理は、濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で培養3日目から開始して12日間であった（培養15日間に相当する）。

【0110】

生体内治療後のため、マウスは、食塩水中（賦形剤として）の $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid II (MLC 901) 溶液の全体積 $500 \mu\text{L}/25\text{g}$ の重量のマウスに最後の虚血から3から24時間後、単回投与として内部腹膜注射された。生体内前処理のため、NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの前処理が、飲料水として濃度 $6 \text{mg}/\text{mL}$ で、6週間の間、虚血の誘発の前に与えられた。

20

【0111】

E. 培養組織における皮質神経細胞の免疫組織化学

皮質細胞は、4%パラホルムアルデヒド／PBSでカバースリップ上に固定され、10分間、0.3%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween20, Sigma) で透過され、PBS中の2.5%ロバ血清と2時間、室温でブロックした。細胞は2%ロバ血清／リン酸緩衝剤食塩水中のヤギ抗ダブルコルチン (DCX) 抗体 (1:200, SC-8066, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, カリフォルニア州) で、一晩インキュベートされた (Heurteaux など、2006b)。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で3回洗浄後、カバースリップは、2%ロバ血清中、2時間、抗ヤギ Alexa488 結合した抗体 (FluoProbes, Interchim, Montlucon, フランス) においてインキュベートされ、3回PBS中でそれぞれ5分間洗浄された。神経細胞は、その後、10分間細胞核を標識するため、ヘキスト溶液中 (10mL 中の $3 \mu\text{L}$; Sigma-Aldrich Chimie, Sait Quentin Fallavier, フランス) で、インキュベートされた。PBS中で2回、水中で1回洗浄した後、カバースリップは乾燥され、フルオロブレップ (7521; Biomerieux, Marcy l'Etoile, フランス) とスライド・ガラス上に備え付けられた。細胞は落射蛍光顕微鏡を使用して観測された。

30

40

【0112】

シグナル特異性は、陰性対象カバースリップ上で1次抗体を除くことによって評価された。タンパク標識の落射蛍光顕微鏡検査画像は、自己蛍光背景のスペクトル修正後の露出と同時に捕らえられた。培養組織における皮質神経細胞の分化された神経突起は、処理12日目にDCX免疫染色によって観測された。神経突起伸長は、落射蛍光顕微鏡で、培養ディッシュ内の神経突起の全長を異なる処理時間で、細胞写真画像およびNeurite Tracer Image Jソフトウェア (Pool など、2008) を使用して測定することによって決定された。

【0113】

F. 統計分析

50

データは平均±S. E. Mとして表される。グループ相違の統計分析は、対応のない t-検定または分散分析を使用して実行された。F 比率が重要な場合、統計分析は継続され、事後比較が、チューキー検定の複数の比較試験を使用することによってされた。全ての分析において、有意水準は $P < 0.05$ で設定された。

【0114】

実施例 6

NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの間の細胞生存率および LDH 放出への比較効果

前記方法によって調製されたような皮質細胞は、濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の NeuroAid II (MLC 9001)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスまたはリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせに 12 日間の間、さらされた。

【0115】

皮質細胞の神経変性に対する NeuroAid II (MLC 901) のリゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスまたはリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの処理は、培養 15 日目 (処理 12 日目) で、前記方法に開示されるような細胞生存率および LDH 測定を使用することによって比較された。結果は図 10 に示される。

【0116】

結果

図 10 A は、濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、3 つの処理が、コントロールと比較して、神経細胞生存率に著しい上昇を誘発したことを示す ($* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ 、 $*** P < 0.001$)。しかしながら、NeuroAid II (MLC 901) は、リゾマ・チュアンキシオングまたはラディックス・アンジェリカ・シネンシスと比較して細胞生存率に抗効力を示した。図 10 A に示すように、NeuroAid II (MLC 901) 処理は、コントロール ($*** P < 0.001$) と比較して、細胞生存率約 51 % の上昇を誘発した、一方、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせによって誘発された細胞生存率における上昇は、それぞれ 37 %、29.5 % および 35 % であった。NeuroAid II (MLC 901) およびリゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの間に有効性の著しい相違が存在した ($## P < 0.1$) (グループ当り $n = 36$ ウェル)。

【0117】

細胞死を導く上昇した細胞傷害が、上昇した乳酸脱水素酵素の放出と関連があることは、周知である。図 10 B は、コントロールと比較して、3 つの処理が LDH 放出／細胞生存の比率を処理 12 日後で、著しく減少したことを示す ($* P < 0.05$ および $** P < 0.01$)。図 10 B は、NeuroAid II (MLC 901) が、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスまたはリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせと比較したとき、LDH 放出を著しく減少したことも示す ($## P < 0.01$) (グループ当り $n = 36$ ウェル)。

【0118】

実施例 6 における実験データに基づいて、NeuroAid II (MLC 901) は、上昇した細胞生存率および減少した LDH 放出で、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスまたはリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの培養組織のいずれかで、より強力であることを示すことができる。

【0119】

実施例 7

NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの間の生体内での虚血性脳損傷に対する生体内における比較効果

処理後：NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの影響を生体内で比較するため、それぞれの処理が、局所虚血のマウスモデルにおいて試験された。

【0120】

虚血は、一過性中大脳動脈閉塞 (MCAO) によって60分間誘発された (Huang など、1994)。マウス ($n=12$) は、局所虚血および3時間で腹腔内注射の対象とされ、その後再び $1\mu\text{g}$ の NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスまたはリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの溶液の単回投与での MCAO 24時間後に対象とされた。

【0121】

それぞれの処理の急性期の投与は、NeuroAid II (MLC 901) で得られた優れた効率と著しい生存率を誘発した。図11Aは、89%の生存率が、虚血性賦形剤、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ処理およびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせのマウスにおいてそれぞれ生存率58.5%、64%、73%および75%と比較して、NeuroAid II (MLC 901) で達成したことを示す。

【0122】

図11Bに示すように脳梗塞の飛躍的な減少は、最高の結果がNeuroAid II (MLC 901) で観測されたことを確認する。図11Bは、NeuroAid II (MLC 901) が、虚血30時間後、コントロール虚血性マウスと比較して1回拍出量を48.4%減少したことを示す ($***P<0.001$)。リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ処理したおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシス処理の組み合わせのマウスにおける梗塞部サイズは、再かん流30時間後、NeuroAid II (MLC 901) 処理された動物より著しく大きかった (図11B、 $\#P<0.05$ 、 $\#\#P<0.001$ 対 NeuroAid II (MLC 901) のグループ)。

【0123】

前処理：生体内への影響の可能性をMLC 901、リゾマ・チュアンキシオングおよびラディックス・アンジェリカ・シネンシスの間で、発作に対する予防にて比較するため、それぞれの処理が前処理にて試験された。

【0124】

動物 ($n=12$) は、NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオングまたはラディックス・アンジェリカ・シネンシスを飲料水 (6mg/mL) で、虚血誘発6週間前に投与して処理された。著しい相違は、賦形剤およびNeuroAid II (MLC 901) 処理されたグループ間での食物および飲料の消費に存在しなかった。図12Aは、コントロール虚血性マウスと比較してNeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオングおよびラディックス・アンジェリカ・シネンシスの前処理6週間目に処理した動物の死亡率の減少を誘発したことを示す。

【0125】

前処理は、コントロールグループにおける70.5%と比較した場合、NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオングおよびラディックス・アンジェリカ・シネンシスで、それぞれ生存率92%、78%および70%を誘発した。NeuroAid II (MLC 901) で得られた発作もしくは神経変性の体質の対象また

10

20

30

40

50

は発作もしくは神経変性の危険な状態にある対象への影響を減少するための最適な結果は、リゾマ・チュアンキシオングおよびラディックス・アンジェリカ・シネンシスと比較して39%および24.5%という低い重要性であった梗塞部体積の著しい減少によって確認された(図3B、 $P < 0.01$)。

【0126】

実施例7におけるこれら研究は、NeuroAid II (MLC 901)が、リゾマ・チュアンキシオングまたはラディックス・アンジェリカ・シネンシスのいずれかより局所虚血において比較的強力であり、NeuroAid II (MLC 901)が、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスまたはリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせのいずれかより局所虚血の処理後、比較的強力であることを示す。

10

【0127】

実施例8

NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの間の神経増殖および神経突起の伸長への比較効果

NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの神経細胞増殖および神経突起の伸長への影響を分析するため、胎児マウスから培養した皮質細胞におけるDCX発現は、処理14日後に比較された。

20

【0128】

DCX染色の典型的な落射蛍光顕微鏡は、図13に示される。図13は、賦形剤の群またはリゾマ・チュアンキシオングのみで処理した細胞と比較してこれら3つの処理での重要な軸索および樹木状のネットワークの発達を強調するNeuroAid II (MLC 901)、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの処理またはリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせによって誘発されるDCX発現の上昇が存在したことを示す。

【0129】

それぞれの落射蛍光顕微鏡画像における蛍光強度の定量化は、図14に示される。図14は、最高の神経増殖影響が、NeuroAid II (MLC 901)で処理した皮質培養組織で得られたことを示した。

30

【0130】

NeuroAid II (MLC 901)、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスまたはリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせの処理が、神経突起の伸長を促進することができるかどうか調査するため、培養された皮質神経細胞における神経突起の全長が処理14日目に測定された。

【0131】

図15は、NeuroAid II (MLC 901)、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスおよびリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせが、著しい神経突起の伸長を、賦形剤のグループと比較したとき誘発することを示す(* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$)。活性を促進する最高の神経突起の身長が、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの単独またはリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェリカ・シネンシスの組み合わせと比較したとき、NeuroAid II (MLC 901)で観測された。

40

【0132】

実施例8におけるこれらの研究は、神経細胞増殖および神経突起の伸長に対してNeuroAid II (MLC 901)が、リゾマ・チュアンキシオング、ラディックス・アンジェリカ・シネンシスまたはリゾマ・チュアンキシオング／ラディックス・アンジェ

50

リカ・シネンシスの組み合わせのいずれかより比較的強力であることを示す。

【0133】

応用

有利にも開示した組成物および方法は、神経細胞修復および神経機能修復に集中する新規治療計画を提供する。

【0134】

開示した方法は、神経細胞成長を促進することによって損傷したか、罹患神経が再度機能できるようにするための神経機能損傷および神経病の治療のための再生治療を提供する。

【0135】

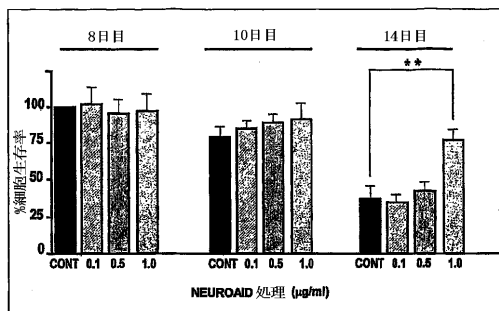
開示した方法は、生体外細胞成長を促進するためにも使用することができる。有利にも様々な細胞の生体外培養組織は、組織工学または生体外治療の用途のために使用することができる。

【0136】

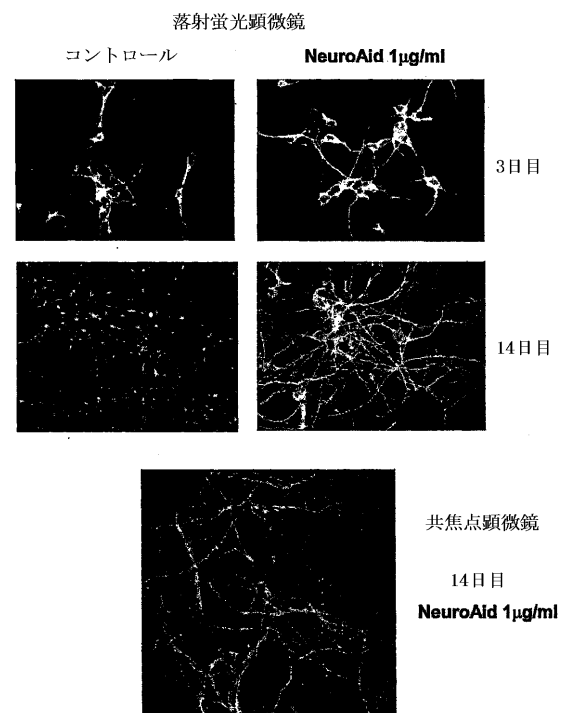
本発明の様々な他の改良および適応が、本発明の精神と範囲から逸脱することなく、前記開示を読んだ後、当業者に明らかであり、全てのそのような改良および適応が添付の特許請求の範囲の範囲であることを意図することが考えられる。

10

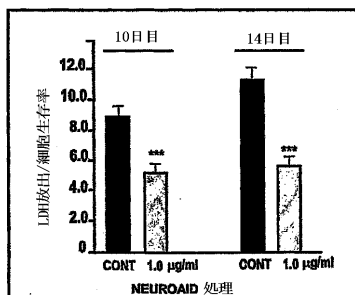
【図1】



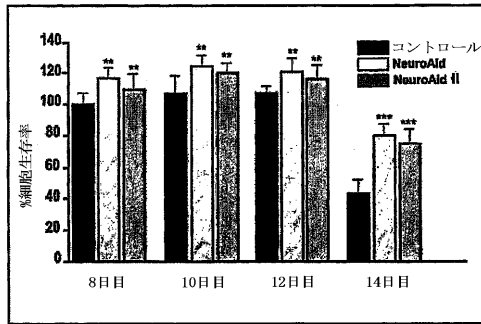
【図3】



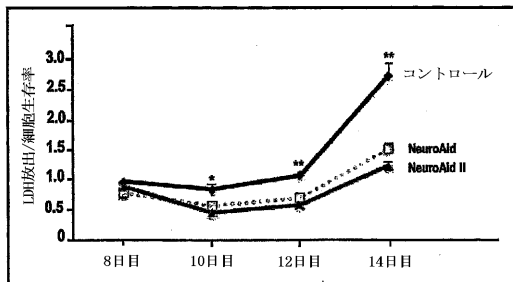
【図2】



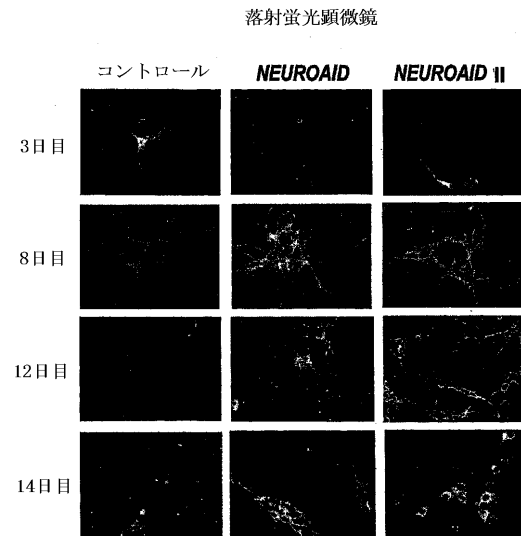
【図 4】



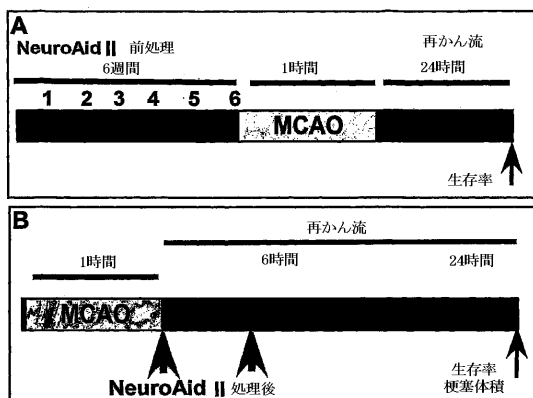
【図 5】



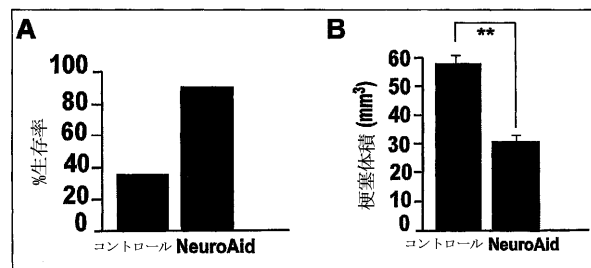
【図 6】



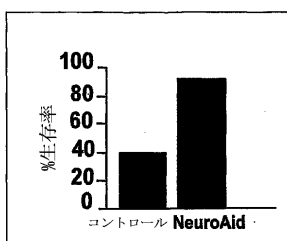
【図 7】



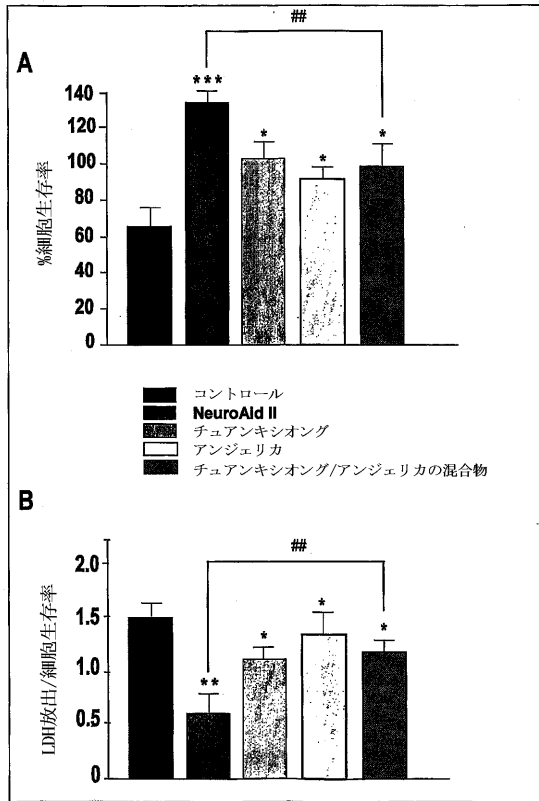
【図 9】



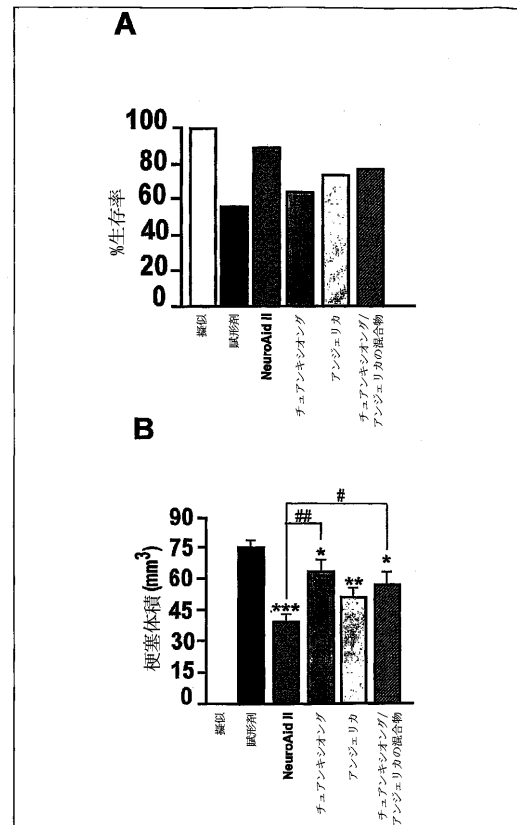
【図 8】



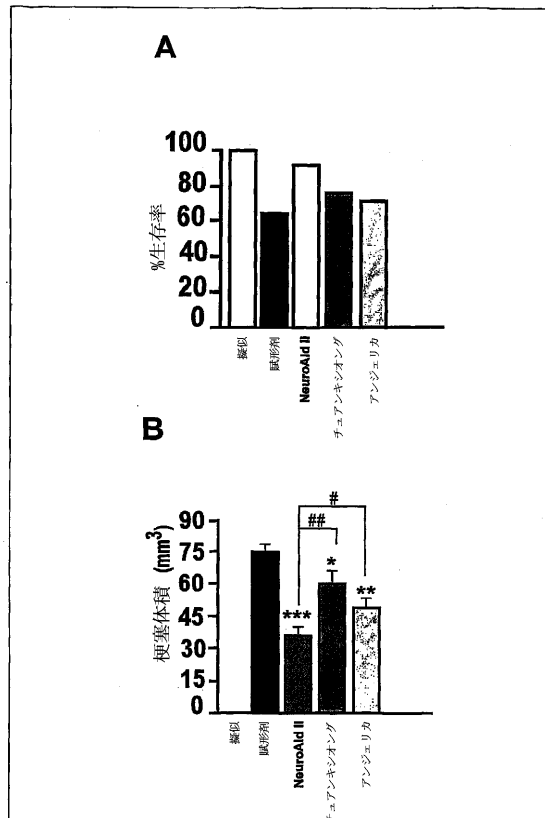
【図 10】



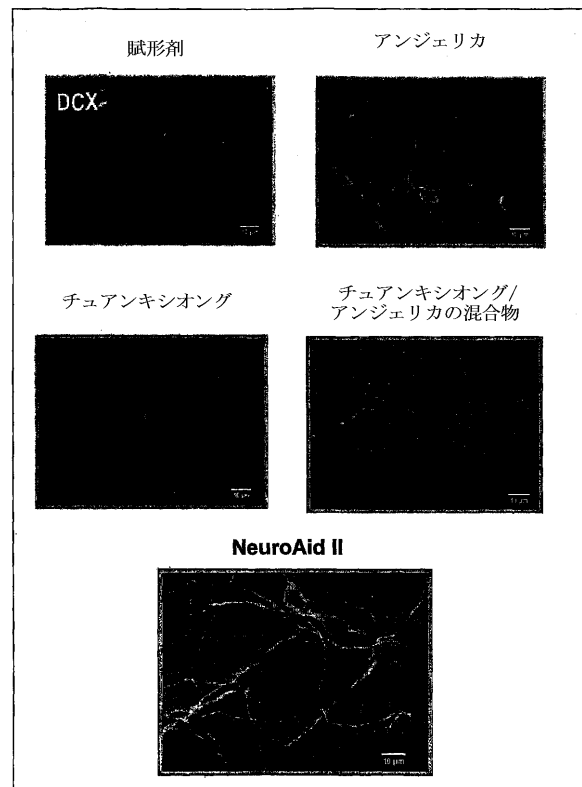
【図 11】



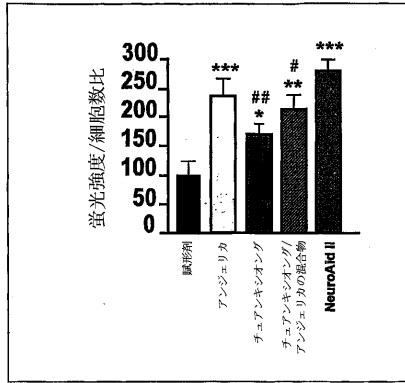
【図 12】



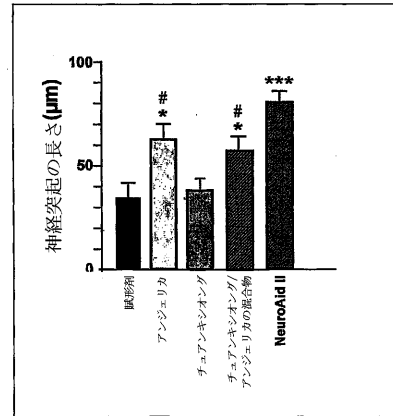
【図 13】



【図 1 4】



【図 1 5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SG2010/000122
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 36/00 (2006.01) A61K 36/236 (2006.01) A61K 36/65 (2006.01) A61K 36/537 (2006.01) A61K 36/69 (2006.01) A61K 36/736 (2006.01) A61K 36/888 (2006.01) A61K 36/286 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPOQUE: EPODOC, WPI, MEDLINE, PubMed: NeuroAid, Neuro+, Miltiorrhiza, Prunus Persica, polygalae Chuanxiong, Astragali and related terms.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Charles Hua Chiang Siow "Neuroaid in Stroke Recovery" <i>Eur Neurol</i> 2008;60:264-266. See whole document	1-37, 44-73
X	WO 2007/106049 A1 (MOLEAC PTE LTD [SG/SG]) 20 September 2007 See whole document, specifically pages 3 and 9, at least claims 1-3 and 6-7	1-37, 44-73
X	CN101279016 A (QINGJU ZHAO [CN]) 8 October 2008 See English Abstract (obtained from esp@cenet (European Patent Office))	1, 2, 4-9, 11, 13-15, 17, 19-22, 24, 26-29, 31, 33-36, 44, 46, 49-52, 54, 55, 57-61, 63, 65, 66, 68, 70-72
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 May 2010		Date of mailing of the international search report 10 JUN 2010
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer JONATHAN WILKINSON AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No :

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SG2010/000122

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Qiutao Gao <i>et al</i> "Verification of the formulation and efficacy of Danggui Buxue Tang (a decoction of radix Astragali and radix Angelicae Sinensis): an exemplifying systematic approach to revealing the complexity of Chinese herbal medicine formulae." <i>Chinese Medicine</i> 2007; 2(12):1-10 See pages 4-5 'Biological evaluation'	38-43
X	Meng H <i>et al</i> "Angiogenic effects of the extracts from herbs: Angelica and Chuanxiong." <i>Am J Chin Med.</i> 2008;36(3):541-554. Abstract	38-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No:
PCT/SG2010/000122

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

As reasoned on the Supplemental Sheet (i):

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SG2010/000122

Supplemental Box (I)

Continuation of Box No: Box III

This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

In assessing whether there is more than one invention claimed, I have given consideration to those features which can be considered to potentially distinguish the claimed combination of features from the prior art. Where different claims have different distinguishing features they define different inventions.

This International Searching Authority has found that there are different inventions as follows:

- Claims 1-37 and 44-73 are directed at the use of traditional Chinese medicine (TCM) in the manufacture of a medicament for promoting cell growth, survival and proliferation and associated methods of use in treating neurological injury / trauma. It is considered that the medicament for promoting cell growth comprises a first distinguishing feature.
- Claims 38-43 are directed at a cell culture reagent comprising a culture medium and a TCM component for promoting cell growth. It is considered that the cell culture medium comprises the second distinguishing feature.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

The only feature common to all of the claims is the use of the TCM components. However the use of these components for the purposes of promoting cell growth is known from the prior art (*see for example Quitao et al (2007)*). This means that the common feature can not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, since it makes no contribution over the prior art.

Because the common feature does not satisfy the requirement for being a special technical feature it follows that it cannot provide the necessary technical relationship between the identified inventions. Therefore the claims do not satisfy the requirement of unity of invention *a posteriori*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/SG2010/000122

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
CN	101279016	NONE			
WO	2007106049	AU	2007225456	CA	2646240
		KR	20080110812	MX	2008011782
		US	2009162459	SG	146498
				ZA	200808758
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.					
END OF ANNEX					

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/14
A 6 1 P	25/06	(2006.01)	A 6 1 P 25/06
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/08
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P 25/24
A 6 1 K	35/56	(2006.01)	A 6 1 K 35/56

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ミシェル モーリス ジャック ラズンスキ
フランス国 0 6 0 0 0 ニース アヴェニュー コロンボ 2 1

(72)発明者 キャサリン ルイーズ クラウド ヒューテオー
フランス国 0 6 6 0 0 アンティープ ルート ド サン ジャン 1 1 3 3 レジデンス エルヴィナ ヒルズ バット デ 1

(72)発明者 デイヴィッド ピカード
シンガポール国 シンガポール 5 8 8 2 9 2 シアン トゥアン アヴェニュー 1 8

F ターム(参考) 4C084 AA22 MA02 NA05 ZA021 ZA161 ZA221 ZA291 ZA361 ZA941 ZB211
ZC751
4C087 AA01 AA02 BB12 BB17 CA03 MA02 NA05 ZA02 ZA16 ZA22
ZA29 ZA36 ZA94 ZB21 ZC75
4C088 AB11 MA07 MA08 NA05 ZA02 ZA16 ZA22 ZA36 ZA94 ZB21
ZC75