(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7201432号
(P7201432)

(45)発行日　令和5年1月10日(2023.1.10)

(24)登録日　令和4年12月26日(2022.12.26)

(51)国際特許分類		FI		
A61K 38/18 (2006.01)		A61K	38/18	ZMD
A61K 9/12 (2006.01)		A61K	9/12	
A61P 25/16 (2006.01)		A61P	25/16	
A61P 21/00 (2006.01)		A61P	21/00	
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	111

請求項の数　14　（全18頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-526620(P2018-526620)
(86)(22)出願日　平成28年11月18日(2016.11.18)
(65)公表番号　特表2018-538275(P2018-538275A)
(43)公表日　平成30年12月27日(2018.12.27)
(86)国際出願番号　PCT/FI2016/050813
(87)国際公開番号　WO2017/085362
(87)国際公開日　平成29年5月26日(2017.5.26)
審査請求日　令和1年11月7日(2019.11.7)
(31)優先権主張番号　20155857
(32)優先日　平成27年11月18日(2015.11.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関　フィンランド(FI)
前置審査

(73)特許権者　518175142
ヘランティス ファーマ ピーエルシー
HERANTIS PHARMA PLC
フィンランド国 02600 エスポー
ベルタル ジュンギン アウキオ 1
(74)代理人　100147485
弁理士　杉村 憲司
(74)代理人　230118913
弁護士　杉村 光嗣
(74)代理人　100181847
弁理士　大島 かおり
(72)発明者　アンリ フットゥネン
フィンランド国 00670 ヘルシンキ
レイヴィオンティ 11 エイ 1
(72)発明者　ミッコ エイラヴァーラ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するためのＣＤＮＦまたはＭＡＮＦを含む組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDNFポリペプチドを含む、鼻腔内投与用組成物であって、

前記中枢神経系疾患が、パーキンソン病である、鼻腔内投与用組成物。

【請求項２】

前記組成物が液体または粉末である、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記組成物が液体鼻スプレーまたは点鼻薬である、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、請求項２に記載の組成物。

【請求項４】

前記組成物が吸収促進剤を含む液体鼻スプレーである、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、請求項３に記載の組成物。

【請求項５】

前記組成物が粉末である、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、請求項２に記載の組成物。

【請求項６】

前記CDNFポリペプチドが配列番号1のアミノ酸配列を有する成熟CDNFである、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項７】
中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための薬剤の製造のための、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDNFポリペプチドを含む組成物の使用であって、
前記中枢神経系疾患が、パーキンソン病である、使用。
【請求項８】
前記組成物が液体または粉末である、請求項７に記載の使用。
【請求項９】
前記組成物が液体鼻スプレーまたは点鼻薬である、請求項８に記載の使用。
【請求項１０】
前記CDNFポリペプチドが配列番号1のアミノ酸配列を有する成熟CDNFである、請求項７～９のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１１】
CDNFポリペプチドを中枢神経系疾患に罹患している被検体に鼻腔内投与するための方法であって（ヒトに対して行うものを除く）、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDNFポリペプチドを含む組成物を単回または複数回用量で該被検体に鼻腔内投与する工程を含む、方法であって、
前記中枢神経系疾患が、パーキンソン病である、方法。
【請求項１２】
前記組成物が液体または粉末である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記組成物が液体鼻スプレーまたは点鼻薬である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記CDNFポリペプチドが配列番号1のアミノ酸配列を有する成熟CDNFである、請求項１１～１３のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、神経栄養因子および小胞体（ER）に位置するタンパク質の分野、より詳細には中枢神経系疾患の治療分野に関する。特に、本発明は、アルツハイマー病、パーキンソン病、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭葉変性症、レビー小体型認知症、軽度認知障害、ハンチントン病、外傷性脳損傷および脳卒中などの中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、鼻腔内投与に適した組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
神経栄養因子である脳ドーパミン神経栄養因子（CDNF）および中脳星状細胞由来神経栄養因子（MANF）は、現在、パーキンソン病のラット6-OHDAモデルにおける変性ドーパミンニューロンの治療において最も効率的なタンパク質である（非特許文献１）。両因子は、毒素の前に適用された場合、パーキンソン病の6-OHDA誘発性の行動症状および組織学的症状を強力に防止する（非特許文献２；非特許文献３）。さらに重要なことに、いずれの因子による後治療も、パーキンソン病の6-OHDA誘発性症状がすでに広範囲に及んでいる段階で適用すると、正常な運動行動および線条体のドーパミン作動性神経支配を効率的に回復させた（非特許文献２；非特許文献４）。CDNFは、パーキンソン病のマウスMPTPモデルにおいてもドーパミンニューロンを保護および修復し（非特許文献５）、重症6-OHDAモデルでは、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）よりも効率的である（非特許文献５；非特許文献４）。これらの因子に対するニューロン保護のメカニズムは完全には明らかではないが、酸化ストレスおよびERストレスを緩和し、アポトーシス細胞死を抑制することを目的とする経路を活性化することが示唆されている。糖尿病、ならびにパーキンソン病、アルツハイマー病（AD）および筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患を含む多くの病態生理学的状態は、ERストレスと関連している。したがって、CDNFおよびMANFの効果は、様々な中枢神経系疾患において示されている（特許文献１；

特許文献２；および非特許文献６）。さらに、CDNFおよびMANFは、全てではないがほとんどのCNS疾患および損傷の病態生理に関与する神経炎症を抑制する（非特許文献７；非特許文献８）。

【０００３】

特許文献３では、患者の脳領域へのMANFの対流強化送達が開示されている。この侵襲的方法のための脳神経外科デバイスは、脳領域または脳領域付近に配置することができるカテーテルと、カテーテルと脳領域との間に正圧勾配を生成するためのポンプとを含む。

【０００４】

非特許文献９は、パーキンソン病を治療するための鼻腔内遺伝子送達法における現在の進歩をレビューする。要約すると、鼻腔内送達は、パーキンソン病のための非侵襲性遺伝子治療の開発のための有望なアプローチを提供すると述べられている。著者らは、CDNFおよびMANFが、パーキンソン病の動物モデルにおいて有効性を実証したが、鼻腔内経路ではまだ試験されていないことも論じている。しかし、遺伝子送達法で使用されるウイルス粒子の鼻から脳への透過特性が、選択された神経栄養因子の遺伝子配列に依存しないことは注目に値する。対照的に、高分子量タンパク質の鼻腔内透過能は、常に独特かつ予測不可能な特性である。

【０００５】

特許文献４は、医薬組成物が鼻腔内投与される、脳に神経学的物質を輸送するための方法および医薬組成物を開示する。該文献は、神経栄養因子NGFを含む医薬組成物を具体的に開示している。

【０００６】

非特許文献１０は、ラット脳においてナノモル濃度の分子をもたらす、BDNF、CNTF、ニューロトロフィン-4/5（NT-4/5）、およびエリスロポエチン（EPO）の鼻腔内送達を開示する。これに対応して、非特許文献１１は、リポソーム製剤中またはPBS中での、GDNFのラット脳への鼻腔内投与を開示している。

【０００７】

非特許文献１２は、経口投与などの薬物投与の従来の経路が、多数の治療薬を脳に効率的に送達することができないことを開示している。血液脳関門（BBB）および血液脳脊髄液関門（BCB）は、薬物の体循環から中枢神経系（CNS）への侵入を妨げる。著者らは、直接鼻から脳への薬物送達をレビューし、様々な神経治療薬が鼻経路によってCNSに送達され得ると結論づけている。しかし、著者らが列挙した鼻腔内送達の主な制限の1つは、鼻粘膜を横切る高分子量薬物の透過性の低下である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【文献】国際公開第2009/133247号
国際公開第2007/068803号
国際公開第2014/066686号
米国特許第6180603号明細書
国際公開第2013/034805号
国際公開第2012/119153号
米国特許出願公開第2012/027754号明細書

【非特許文献】

【０００９】

【文献】Lindholm, P., and M. Saarma. 2010. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. Dev.Neurobiol.70:360-371.
Lindholm, P., M.H. Voutilainen, J. Lauren, J. Peranen, V.M. Leppanen, J.O. Andressoo, M. Lindahl, S. Janhunen, N. Kalkkinen, T. Timmusk, R.K. Tuominen, and M. Saarma. 2007. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. Nature. 448:73-77.

Voutilainen, M.H., S. Back, E. Porsti, L. Toppinen, L. Lindgren, P. Lindholm, J. Peranen, M. Saarma, and R.K. Tuominen. 2009. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. J.Neurosci. 29:9651-9659. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0833-09.2009.
Voutilainen, M.H., S. Back, J. Peranen, P. Lindholm, A. Raasmaja, P.T. Mannisto, M. Saarma, and R.K. Tuominen. 2011. Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. Exp. Neurol. 228:99-108.
Airavaara, M. Harvey, B.K. Voutilainen, M.H. Shen, H. Chou, J Lindholm, P. Lindahl, M. Tuominen. R.K. Saarma, M. Wang, Y., and B. Hoffer. 2012. CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. Cell Transplant. 2012;21(6):1213-23.
Airavaara, M. et al. 2009. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats. J Comp Neurol 515 (1), 116.
Nadella R, Voutilainen MH, Saarma M, Gonzalez-Barrios JA, Leon-Chavez BA, Jimenez JM, Jimenez SH, Escobedo L, Martinez-Fong D. Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. J. Neuroinflammation. 11: 209, 2014.
Zhao H, Liu Y, Cheng L, Liu B, Zhang W, Guo YJ, Nie L. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor inhibits oxygen-glucose deprivation-induced cell damage and inflammation by suppressing endoplasmic reticulum stress in rat primary astrocytes. J. Mol. Neurosci. 51(3): 671-8, 2013.
Aly, AE-E and Waszczac, B. 2015. Intranasal gene delivery for treating Parkinson ’ s disease: overcoming the blood-brain barrier, Expert Opin. Drug Deliv. 12(12):1923-1941.
Alcala-Barraza SR, Lee MS, Hanson LR, McDonald AA, Frey WH and McLoon LK. 2010. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. Journal Of Drug Targeting 18(3):179-190.
Bender TS, Migliore MM, Campbell RB, John Gatley S and Waszczak BL. 2015. Intranasal administration of glial-derived neurotrophic factor (GDNF) rapidly andsignificantly increases whole-brain GDNF level in rats. Neuroscience, 303: 569-576.
Pardeshi, CV and Belgamwar, VS. 2013. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. Expert Opin Drug Deliv 10(7):957-972.
Hellman M, Arumae U, Yu Ly, Lindholm P, Peranen J, Saarma M, Permi P (2011) Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF) Has a Unique Mechanism to Rescue Apoptotic Neurons. J Biol Chem 286:2675-2680.
Stolnik S, Shakesheff K. Formulations for delivery of therapeutic proteins. Biotechnol Lett. 2009;31(1):1-11.
Shubber S, Vllasaliu D, Rauch C, Jordan F, Illum, L, and Stolnik, S. 2015. Mechanism of Mucosal Permeability Enhancement of CriticalSorb(R) (Solutol(R) HS15) Investigated In Vitro in Cell Cultures. Pharm Res 32:516-527.
Hanson, LR et al. 2012. Intranasal delivery of growth differentiation factor 5 to the central nervous system. Drug Deliv 19(3):149-154.
Tang, X and Pikal, MJ. 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharmaceutical Research 21(2):191-200.

【発明の概要】

【００１０】

本発明の目的は、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための鼻腔内投与用組成物を提供することである。

【００１１】

本発明の別の目的は、CDNFおよびMANFポリペプチドの新規使用を提供することである。

【００１２】

本発明において、驚くべきことに、CDNFならびにMANFポリペプチドの化学的および生物学的特性は、ポリペプチドが患者に鼻腔内投与された際に、ポリペプチドの中枢神経系（CNS）への輸送を促進することが判明している。したがって、CDNFおよびMANFポリペプチドは、血液脳関門を迂回して鼻経路を通り、CNSに到達することができる。

【００１３】

したがって、一態様では、本発明は、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDNFポリペプチドまたはその機能的断片を含む鼻腔内投与用組成物を提供する。

【００１４】

別の態様では、本発明は、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、配列番号3のアミノ酸配列を含むMANFポリペプチドまたはその機能的断片を含む鼻腔内投与用組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】非損傷Sprague Dawleyラットにおいて鼻腔内投与された^{125}I標識組み換えヒト（rh）CDNFの脳および血漿分布を示す図である。1%ウシ血清アルブミン中約10ngの^{125}I標識rhCDNFを、6匹のラットに麻酔下で鼻腔内投与した。20分～4時間後、血液試料を、脳領域嗅球、小脳、皮質および非皮質領域と共に収集した。全血において、送達された総量に対して、2.9±1.3%の^{125}I標識rhCDNFが検出された。脳組織のバックグラウンドを差し引いたCPM値は、血液値と比較して7～13%であり、^{125}I標識rhCDNFの0.16～0.36%が脳組織に到達したことを示した。

【図２】ラットにおいて鼻腔内投与された^{125}I標識rhMANFの脳および血漿分布を示す図である。rhMANFの0.14～0.16%が循環に達した。雄Sprague Dawleyラットに麻酔をかけ、中大脳動脈閉塞（MCAO）を60分間行った。2日後、ラットに再度麻酔をかけ、約8ngの^{125}I-rhMANF（16μl）を20μgの非標識rhMANF（4μl中）と共に投与した。1時間後、血液試料を採取し、ラットを生理食塩水で経心的に灌流し、脳を採取した。結果は、湿潤組織重量1ミリグラム当たりの1分当たりのカウント数として表される。

【図３】鼻腔内投与されたrhMANFは、虚血性脳卒中のMCAOラットモデルにおける梗塞体積を減少させることを示す図である。（A）研究のタイムライン。前夜に、イソフルランでラットに簡単に麻酔をかけた。10μlのPBSまたはMANF溶液を、各鼻孔に約70°の角度で投与した。翌日、抱水クロラール（400mg/kg）でラットに麻酔をかけ、鼻腔内投与をMCAOの直前および再灌流直後に繰り返した。中大脳動脈を総頸動脈と共に60分間閉塞させた。MCAOの48時間後に動物を剖検した。（B）PBSおよびrhMANF処理ラットの損傷の48時間後の冠状脳切片のトリフェニルテトラゾリウムクロライド（TTC）染色のスキャン例。（C）TTC染色によって測定された梗塞体積。rhMANFは、PBS処理動物と比較して梗塞体積を減少させた（P=0.034、スチューデントのt検定）。（D）PBSおよびrhMANF処理動物のバイアススイング活性。神経保護効果は、身体の非対称性の低下としても観察された（P=0.041、スチューデントのt検定）。パネルCおよびDでは、PBS群は合計17匹のラットからなり、MANF群は合計24匹のラットからなる。MANF群は、2つのrhMANF用量から合わせた：合計20μgの用量（鼻孔当たり3.3μg；0.33μg/μl溶液、n=10）および合計60μgの用量（鼻孔当たり10μg；1μg/μl溶液、n=14）。2つの用量群が非常に類似の効果レベルを示したため、MANF群をここで合わせた。

【図４】鼻腔内投与されたrhMANFは、虚血性脳卒中のMCAOラットモデルにおける機能回復を促進することを示す図である。20μgのrhMANF（鼻孔当たり10μl；PBS中0.33

μg/μlの溶液）または等量のPBSを、イソフルラン麻酔下で鼻腔内投与した。（A）研究デザイン。鼻腔内投与は、手術前の夕方、MCAOの直前および再灌流後に行った。MCAOの2日後、7日後および14日後に行動評価を行い、ボディスイング試験（B）、全体的神経学的評価（Bedersonスコア、C）、移動距離（D）、および垂直活動（E）を歩行試験に含めた。データを、Sidakの事後検定（n=14～15）での反復測定ANOVAを用いて分析した。二元配置反復測定ANOVAは、ボディスイングについて有意な処理X時間相互作用（F2,54）= 9.34、P〈0.001を、BedersonスコアについてF（2,54）= 7.97、P〈0.001を示した。

【図５】^{124}I-rhCDNFを鼻腔内投与したカニクイザルの代表的な陽電子放射断層撮影（PET）-コンピュータ断層撮影（CT）画像を示す図である。500μCiの^{124}I標識組み換えヒトrhCDNFを、動物1匹当たりに投与した（n=4）。投与量の約30%が、投与直後に鼻腔に位置していた。

【図６】鼻腔内投与後0時間～3.5時間の動的焦点脳PETスキャンによって測定された、上鼻腔（A）および全脳（B）における組織1グラム当たりのパーセント（%）注入量（%ID/g）を示す図である。パネルCは、脳を透過した^{124}I-rhCDNFの90%超が鼻腔内投与から24時間以内に脳から除去されることを示している。

【図７】^{124}I-rhCDNFの鼻腔内投与後のカニクイザル脳の白色光画像（左）、共レジストレーションした白色光およびオートライトジオミノグラム（中）ならびにオートラジオルミノグラムのみ（右）の多視点画像を示す図である。側脳室および中耳に見られる信号は矢印で示されている。

【図８】関心領域（ROI）におけるオートラジオグラフィーデータの定量化を示す図である。脳を透過した^{124}I-rhCDNFに由来する放射能の濃度は、組織1g当たりnCi（nCi/g）として表される。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」は、一般に、ポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を有する分子を指す。「ポリペプチド」は、アミノ酸残基からなるポリマー、関連する天然の構造変異体、ならびに、ペプチド結合を介して連結されたそれらの合成非天然類似体、それらの関連する天然の構造変異体、および合成非天然類似体も指す。合成ポリペプチドは、例えば自動ポリペプチド合成機を用いて合成することができる。

【００１７】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドに適用される用語「断片」は、通常、少なくとも約7個の連続アミノ酸、典型的には少なくとも約15個の連続アミノ酸、より典型的には、少なくとも約30個の連続アミノ酸、典型的には少なくとも約40個の連続アミノ酸、好ましくは少なくとも約50個のアミノ酸、さらにより好ましくは少なくとも約60個のアミノ酸、最も好ましくはペプチド断片は、長さが約70個より長い連続したアミノ酸である。用語「機能的断片」は、インタクトなポリペプチドの生物学的活性を依然として保持している断片を指す。

【００１８】

本発明は、神経栄養因子タンパク質CDNFに関する。CDNFポリペプチドは、シグナルペプチドを持つ187アミノ酸の全長を有する完全長ヒトCDNF、およびシグナルペプチドを持たない161アミノ酸の全長を有する成熟ヒトCDNFであり（表１を参照）、18.5kDaのサイズである。

【００１９】

本発明は、神経栄養因子タンパク質MANFにも関する。特に重要なMANFポリペプチドは、シグナルペプチドを持つ179アミノ酸の全長を有する全長ヒトMANF、およびシグナルペプチドを持たない158アミノ酸の全長を有する成熟ヒトMANF（表１を参照）であり、18kDaのサイズである。シグナルペプチドを持たない成熟MANFポリペプチドをコードするMANF核酸は、他のシグナルペプチドをコードする核酸と組み合わされて、天然MAN

Fシグナルペプチドとは異なるシグナルペプチドを持つ完全長MANFポリペプチドを提供することができる。

【００２０】

MANFおよびCDNFポリペプチドの機能的断片も、全体ポリペプチドの断片の産生が当該技術分野で知られているため、当業者に利用可能である。したがって、MANFまたはCDNFタンパク質は、全長の天然に存在する形態であってもよく、または切断型もしくは誘導体化された形態であってもよい。機能的MANFまたはCDNF断片の例は特許文献５に開示されており、配列CKGC（配列番号5）またはCRAC（配列番号6）を含み、好ましくは4～40アミノ酸の長さを有するペプチドなどである。さらに、非特許文献１３は、配列番号3の残基96～158を含むMANFの活性C末端断片構築物を開示する。

【００２１】

MANF/CDNFの天然に存在する対立遺伝子変異体に加えて、コードされたMANF/CDNFポリペプチドのアミノ酸配列の変化を引き起こすMANF/CDNF配列への突然変異によって、変化を導入することができる。「非必須」アミノ酸残基におけるアミノ酸置換を導くヌクレオチド置換を、MANF/CDNFポリペプチドの配列中に作製することができる。1つ以上の「非必須」置換を含むMANF/CDNFポリペプチドまたはそれらの機能的断片は、本明細書に開示される野生型MANF/CDNFポリペプチドの等価物として見ることができる。これらの等価物は、前記野生型ポリペプチドに対して、好ましくは90%、より好ましくは95%、96%、97%、98%または99%相同である。

【００２２】

「非必須」アミノ酸残基は、MANF/CDNFの野生型配列において、その生物学的活性を変化させることなく修飾することができる残基であり、それに対して「必須」アミノ酸残基は、そのような生物学的活性に必須である。例えば、本発明のMANF/CDNF分子間で保存されているアミノ酸残基は、変化に特に耐性がないと予測される。保存的置換がなされ得るアミノ酸は、当該技術分野でよく知られている。

【００２３】

上記のように、CDNFおよびMANFポリペプチドは、血液脳関門を迂回して鼻経路を通り、中枢神経系、CNSに到達することができることが判明している。したがって、CDNFおよびMANFポリペプチドを患者に鼻腔内投与し、多数の中枢神経系疾患の治療に使用することができる。

【００２４】

したがって、一実施形態では、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDNFポリペプチドまたはその機能的断片を含む鼻腔内投与用組成物が提供される。特に、この実施形態では、アルツハイマー病、パーキンソン病、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭葉変性症、レビー小体型認知症、軽度認知障害、ハンチントン病、外傷性脳損傷および脳卒中の鼻腔内治療が達成される。

【００２５】

第2の実施形態は、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための薬剤の製造のための、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDNFポリペプチドまたはその機能的断片を含む組成物の使用を提供する。

【００２６】

別の実施形態は、CDNFポリペプチドを中枢神経系疾患に罹患している被検体に鼻腔内投与するための方法であって、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDNFポリペプチドまたはその機能的断片を含む組成物を単回または複数回用量で該被検体に鼻腔内投与する工程を含む方法である。

【００２７】

一実施形態は、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための、配列番号3のアミノ酸配列を含むMANFポリペプチドまたはその機能的断片を含む、鼻腔内投与用組成物に関する。好ましくは、前記中枢神経系疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭葉変性症、レビー小体型認知症、軽度認知障害、ハ

ンチントン病、外傷性脳損傷および脳卒中からなる群より選択される。

【００２８】

さらなる一実施形態は、中枢神経系疾患の鼻腔内治療に使用するための薬剤の製造のための、配列番号3のアミノ酸配列を含むMANFポリペプチドまたはその機能的断片を含む組成物の使用である。

【００２９】

別のさらなる実施形態は、MANFポリペプチドを中枢神経系疾患に罹患している被検体に鼻腔内投与するための方法であって、配列番号3のアミノ酸配列を含むMANFポリペプチドまたはその機能的断片を含む組成物を単回または複数回用量で該被検体に鼻腔内投与する工程を含む方法である。

【００３０】

（鼻腔内投与に適した組成物）

活性薬剤としてCDNF/MANFポリペプチドを含む、鼻腔内投与に適した組成物は、液体懸濁液、液体分散液、粉末、リポソーム、水溶液の形態またはそれらの組み合わせであり得る。したがって、組成物は、粉末もしくは液体鼻スプレー、点鼻薬、ゲルまたは軟膏として、チューブまたはカテーテルを介して、シリンジによって、パックテールによって、綿撒糸によって、または粘膜下注入によって鼻腔内に投与され得る。組成物は、単独で、または他の神経学的に活性な薬剤と組み合わせて鼻腔に投与され得る。CDNF/MANFポリペプチドを担体および／または他のアジュバントと組み合わせて医薬組成物を形成してもよい。好ましくは、組成物は、シクロペンタデカラクトン、アルキルサッカライド、キトサン、低メチル化ペクチンまたはヒドロキシステアリン酸エステルポリグリコールなどの吸収促進剤および吸収調節剤系を含む。ミセルの形態の親油性物質を組成物に添加し、嗅上皮を横切る神経学的物質の吸収を高めることができる。好ましいミセル添加剤であるこれらの物質の中には、GM-1ガングリオシドおよびホスファチジルセリン（PS）があり、これらは単独でまたは併用で、神経剤と組み合わせてもよい。前記吸収促進剤（すなわち吸収促進剤）および吸収調節剤系は、鼻膜を通過するCDNF/MANFポリペプチドの輸送を増加させ、したがってCNSにおいて十分に高い治療レベルを促進し得る。吸収促進剤は、経細胞経路を介する薬物送達、または接合タンパク質の変化を促進し、傍細胞経路を介した薬物転位の促進をもたらすと考えられている。本発明の組成物に適した他の吸収増強剤は当該技術分野で知られており、例えば非特許文献１４および非特許文献１５を参照。

【００３１】

組成物の組み換えMANFおよびCDNFポリペプチドは、特許文献１および特許文献２に開示されているように製造することができる。鼻腔内送達用に、精製された組み換えタンパク質を、薬学的に適切な緩衝液に単に添加することができる。例えば、非特許文献１６では、成長因子を、pH4.25の20mM酢酸ナトリウムを含む酸性緩衝液において鼻腔内投与した。好ましい実施形態では、タンパク質を凍結乾燥または噴霧乾燥し、鼻スプレーで使用するための粉末を生成する。凍結乾燥のための方法は当該技術分野においてよく知られている（例えば非特許文献１７を参照）。

【００３２】

組成物中の活性CDNF/MANFポリペプチドの最適濃度は、必然的に、患者の特徴、および治療が導入される疾患または状態の性質によって決まる。好ましくは、組成物は、1日1～5回、より好ましくは1日1～2回鼻腔内投与され、CDNF/MANFポリペプチドの量は、1回の投与当たり10～1000mg、より好ましくは100～500mgである。最も受け入れられる投薬レジメンは、一方または両方の鼻孔への単回用量であろう。

【００３３】

（デバイス）

鼻腔内投与に適したデバイスの一例が、特許文献６に開示されている。適切なデバイスは、液体懸濁液、液体分散液、粉末、リポソーム、水溶液の形態の薬物またはそれらの組み合わせを送達するように設計される。デバイスは、好ましくは、組成物の活性剤の末梢嗅覚ニューロンへの輸送を促進するために、投与された鼻組成物が鼻腔の上部3分の1の嗅

覚領域に、特に嗅上皮に送達されるように設計される。デバイスは、通常、ボトル、ポンプおよびアクチュエータを備える。好ましくは、デバイスは、推進剤を収容することができるキャニスタと、キャニスタと連通するディフューザと、ディフューザと連通する薬剤用複合チャンバと、複合チャンバと連通するノズルとを有する。デバイスは、単回投与または複数回投与システムで利用できる。前記デバイスで使用される粉末製剤は、好ましくはエアロゾル化された形態である。

【００３４】

特定の実施形態が本明細書において詳細に開示されているが、これは例示のみの目的のために例としてなされたものであり、以下に続く添付の特許請求の範囲を限定するものではない。特に、様々な置換、変更、および改変を、本発明に対して、特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲から逸脱することなく行うことができることが、本発明者らによって企図されている。例えば、プロトコルの選択は、本明細書に記載の実施形態の知識を有する当業者にとっては習慣的なことであると考えられる。

【００３５】

上記の発明を一般的に記載してきたが、例示のために提供されたものであって、限定するものではない以下の実験の項を参照することにより、同様のことがより容易に理解されるであろう。

【００３６】

本明細書に記載されているものと類似または等価の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。材料、方法、および実施例は、例示的なものに過ぎず、限定するものではない。

【実施例】

【００３７】

（実施例１）

本研究は、鼻腔内投与された放射性標識組み換えヒトCDNFタンパク質（rhCDNF）の脳および血漿分布を評価するために考案された。ラクトペルオキシダーゼ法を用いたrhCDNFの^{125}I標識および分析は、非特許文献４に記載のように行った。

【００３８】

動物の使用。ラクトペルオキシダーゼ法を用いたrhCDNFの^{125}I標識および分析は、非特許文献４に記載のように行った。6匹の非損傷Sprague Dawleyラットに麻酔をかけ、1%ウシ血清アルブミン中約10ngの^{125}I標識rhCDNFを麻酔下で鼻腔内投与した。20分～4時間後、血液試料を、脳領域嗅球、小脳、皮質および非皮質領域と共に収集した。

【００３９】

ガンマカウンター分析。ガンマカウンティングを用いて、2.9±1.3%（範囲1.3～4.5%）の^{125}I標識rhCDNFが血液中に認められた（図１）。CPM値を脳で見いだされたものと比較すると、^{125}I標識rhCDNFの約0.16～0.36%が脳組織に到達したことが判明した。このデータは、rhCDNFタンパク質が、鼻腔に液体形態で投与された場合、ラットの脳組織を透過することができることを示す。

【００４０】

（実施例２）

本研究は、鼻腔内投与された放射性標識組み換えヒトMANFタンパク質（rhMANF）の脳および血漿分布を評価するために考案された。

【００４１】

動物の使用。2匹の雄Sprague Dawleyラットに麻酔をかけ、中大脳動脈閉塞（MCAO）の処理を、総頸動脈閉塞と共に60分間行った。2日後、ラットに再度麻酔をかけ、続いてラクトペルオキシダーゼ法（非特許文献４）および20μgの非標識rhMANF（4μl中）を用いて標識した約8ngの^{125}I-rhMANF（16μl）を鼻腔内投与した。1時間後、血液試料を採取し、ラットを生理食塩水で経心的に灌流し、脳を採取した。

【００４２】

ガンマカウンター分析。^{125}I標識rhMANF総用量の約0.14～0.16%が、脳内および血

液中に認められた（図２）。このデータは、rhMANFタンパク質が、鼻腔に液体形態で投与された場合、ラットの脳組織を透過することができることを示す。

【００４３】

（実施例３）

本研究は、鼻腔内投与された組み換えヒトMANFタンパク質（rhMANF）の治療効果を評価するために考案された。

【００４４】

動物の使用、臨床および組織病理学的評価。前夜に、イソフルランでラットに簡単に麻酔をかけた。10μlのPBSまたはMANF溶液を、各鼻孔に約70°の角度で投与した。翌日、抱水クロラール（400mg/kg）でラットに麻酔をかけ、鼻腔内投与をMCAOの直前および再灌流直後に繰り返した。総頸動脈と共にMCAを60分間閉塞させた。MCAOの48時間後に動物を剖検した。

【００４５】

冠状脳切片のトリフェニルテトラゾリウムクロライド（TTC）染色は、MANFがPBS処理動物と比較して梗塞体積を減少させたことを示した（P=0.034、スチューデントのt検定、n=17～24；図３）。（D）神経保護効果は、バイアスボディスイング試験を用いた身体の非対称性の低下としても観察された（P=0.041、スチューデントのt検定）。MANF群は、2つのrhMANF用量から合わせた：合計20μgの用量（鼻孔当たり3.3μg；0.33μg/μl溶液、n=10、平均68±17）および合計60μgの用量（鼻孔当たり10μg；1μg/μl溶液、n=14、平均80±15）、両群とも非常に類似した結果を示した。

【００４６】

別の動物セットでは、上記と同様の方法で合計20μgのMANF用量（鼻孔当たり3.3μg；0.33μg/μl）を投与し、ラットの行動を2週間にわたって観察し、機能回復を測定した。バイアススイング活性、Bedersonスコア、移動距離および垂直活動を、脳卒中後2日目、7日目および14日目に分析した。二元配置反復測定ANOVAは、ボディスイングについて有意な処理X時間相互作用（F2,54）= 9.34、P〈0.001を、BedersonスコアについてF（2,54）= 7.97、P〈0.001を示した（図４；n=14～15）。このデータは、鼻腔内投与された組み換えMANFタンパク質での前処理が脳卒中症状からの機能回復を促進することを示す。

【００４７】

（実施例４）

本研究は、鼻腔内投与された放射性標識組み換えヒトCDNFタンパク質（rhCDNF）の、ヒト以外の霊長類における脳透過性および動態を評価するために考案された。ラクトペルオキシダーゼ法を用いて^{124}Iで標識したrhCDNF（400μg、500μCi；1%BSA中に製剤化、0.1%アスコルビン酸ナトリウムおよび0.1%ゲンチシン酸、pH6.4）を、カニクイザルの鼻腔に投与した。陽電子放出断層撮影（PET）イメージングを使用し、^{124}I-rhCDNFトレーサーの鼻から脳への透過性を測定した。

【００４８】

動物の使用。4匹の雌カニクイザル（macaca fascicularis）（MPI Research）を本研究で採用した。サルは2～4歳で、イメージングの日に体重が3.08±0.22kgであった。動物の部屋は、18～26℃の温度、50±20%の相対湿度を両方とも可能な限り、および約12時間の断続的な明暗サイクルを維持するように設定した。適切な霊長類の食事の食物および水をad libitumで与えた。動物が取り扱われた様々な処理、例えば身体検査では、動物は、ケタミンが効くように鎮静されていた可能性がある。各動物を、ケタミン投与（5～10mg/kg IM）麻酔導入前に最低4時間絶食させ、その後イソフルラン（1～2%）を酸素（2%）と共に各スキャンの間中与えた。この実験に対する動物福祉は、米国農務省（USDA）動物福祉法（9 CFR1、2、および3部）に準拠していた。実験動物のケアと使用に関する指針、実験動物資源研究所、ナショナルアカデミープレス、ワシントンD.C.、2011に従った。動物施設は、実験動物福祉の国立衛生研究所との動物福祉保証声明を維持している。

【００４９】
デバイス。特許文献７に開示されたものと同様の加圧嗅覚送達デバイスを、rhCDNFの鼻腔内送達に使用した。
【００５０】
陽電子放出断層撮像および画像解析。全身連続床運動および集束陽電子放射断層撮影（PET）およびコンピュータ断層撮影（CT）データを、それぞれFocus220 microPET（Siemens Medical Systems、ノックスビル、テネシー州）およびCereTom CT（NeuroLogica Corp、ダンバーズ、マサチューセッツ州）で取得した。各サルに麻酔をかけ、挿管し、最初に頭のPETベッドに乗せ、スキャン用に腹臥位にして乗せた。鼻孔当たり2回の投与をベッド上で施した。最終投与が行われた直後に、動的焦点脳PETスキャンを225分間取得した。投薬の24時間後に追加のスキャンを行い、トレーサーの脳クリアランスの動力学を評価した。
【００５１】
放出データを3Dリストモードで取得し、2Dサイノグラムにリビニングした。PET画像を、2D Ordered Subset期待値最大化（OSEM2D）アルゴリズムによって再構成した。検出器の正規化、崩壊、不感時間、ランダム性、および減衰について補正を行った。動的スキャンは、45×5分のフレームと1×225分のフレームにビニングした。再構成された各CT画像を再サンプリングし、付随するPET画像（0.9mm）と同じボクセル解像度に補間した。各PET画像を、対応するCT画像と共レジストレーションした（図５）。
【００５２】
脳を中心とする回転最大強度投影（MIP）動画および3スライスビュー画像を、前処理されたPET/CT画像から生成した。線形カラースケールを、0.2～20%ID/mLのPET強度範囲に対して選択した。上鼻腔、喉および甲状腺の関心領域（ROI）を、手動および自動のセグメンテーション閾値の組み合わせをPETに適用することによって画定するか、または共レジストレーション画像に手描きした。独自の45領域カニクイザル脳地図を各サルの脳に適合させることによって、全脳を含む様々な脳領域のROIを取得した。生成された各ROIの各時点での量、活性、および濃度（活性／濃度）を含むマスタースプレッドシートを生成した。
【００５３】
PETイメージングデータは、医薬物質としての組み換えヒトCDNFタンパク質が、健康な非ヒト霊長類の上鼻腔にエアロゾル化されて送達された場合、鼻から脳へ透過可能であることを示している（図６Ａ～Ｂ）。最適化されていない一般的な製剤を使用すると、鼻腔内に送達されたrhCDNFは、既に総注射用量の1～4%に相当する脳レベルに達した。組織量1グラム当たり最も高い%注射用量を有する脳領域を表２に列挙する。
【００５４】
PETイメージングデータはまた、脳送達rhCDNFの約92±1%が24時間以内に脳から除去されることを示しており（図６Ｃ）、rhCDNFの脳半減期が6時間程度であることを示唆している。ヒトおよび大型動物における鼻から脳への薬物送達のために設計されたデバイスと共にin vivoイメージング技術を使用することにより、CDNFファミリー神経栄養因子が鼻腔投与経路を介して脳に効果的に送達され得ることが確認される。
【００５５】
（実施例５）
本研究は、鼻腔内投与された放射性標識組み換えヒトCDNFタンパク質（rhCDNF）の脳透過性を評価するために考案された。ラクトペルオキシダーゼ法を用いて^{124}Iで標識したrhCDNF（400μg、500μCi；1%BSA中に製剤化、0.1%アスコルビン酸ナトリウムおよび0.1%ゲンチシン酸、pH6.4）を、カニクイザルの鼻腔に投与した。オートラジオグラフィーを使用し、^{124}I-rhCDNFトレーサーの鼻から脳への透過性を測定した。
【００５６】
動物の使用。実施例４と同じ動物処理を採用した。
【００５７】

デバイス。実施例４と同じ鼻腔内投与デバイスおよび投与手順を採用した。

【００５８】

オートラジオグラフィー。予定された終了時間（4時間の全身撮像時点後）に、1匹の動物を安楽死させ、頭部を除去した。その後、頭部をヘキサン／ドライアイスバスで凍結させ、5%カルボキシメチルセルロースマトリックス中に包埋した。包埋された頭部を、約-10～-30℃に維持された冷凍マクロトームステージ上に取り付け、矢状面で0.5mmごとに採取した厚さ約40μmの切片に切断し、接着テープ上に取り込んだ。両眼の間の領域を包含する脳の切片において52スライスおよび40μmスライス厚さで、定量的^{124}Iオートラジオグラフィーを行った。

【００５９】

特に、以下の領域を分析した：鼻腔、嗅球、嗅索、嗅皮質、視床、線条体、黒質、視床下部および側脳室。ブロック面の白色光画像を各切片で撮影した。一組の切片を取り付け、蛍光体イメージングスクリーンに露光し、Storm 860画像収集システムを用いてスキャンした（図７）。VivoQuant画像分析ソフトウェアを使用して、較正標準と比較した定量化を行った。オートラジオグラフィー画像において計算された活性および[^{124}I]較正標準の正常濃度から、線形回帰を用いて、較正標準曲線を構築した。これに続いて、オートラジオグラフィースライスが対応する白色光画像にレジストレーションされる画像レジストレーションを行った。次いで、レジストレーションされた画像をVivoQuant画像分析ソフトウェアにロードし、ROIを白色光データ上に手描きした。各ROI領域を1つの代表的なスライス上に描画し、較正されたオートラジオグラフィー画像の平均強度をそれぞれについて算出した。各スライスのバックグラウンド放射能も参考として報告した。

【００６０】

図８に示すように、オートラジオグラフィーデータの定量化により、鼻腔内投与された^{124}I-rhCDNFは、大脳、小脳および側脳室の様々な脳構造を透過することが示唆される。

【００６１】

非ヒト霊長類におけるrhCDNFの鼻から脳への送達を確認するために、オートラジオグラフィーを用いて、トレーサーの鼻内投与の4時間後に剖検した非ヒト霊長類の切片における放射性標識rhCDNFを視覚化した。オートラジオグラフィーデータにより、いくつかの標識rhCDNFが上鼻腔から脳を透過したことが確認された。小脳、脳幹、視床、線条体、黒質、視床下部および嗅球を含む様々な脳領域でシグナルが検出された。側脳室への推定侵入経路は、脳脊髄液（CSF）通路を介して脳室プレートを通過することである。これらのデータは、鼻腔内投与されたrhCDNFがCSFへのアクセスを得て、CNSにおいて広い分布を可能にすることを示唆している。

【００６２】

【表１】

CDNF および MANF アミノ酸配列。

成熟 CDNF アミノ酸配列：

QEAGGRPGAD CEVCKEFLNR FYKSLIDRGV NFSLDTIEKE LISFCLDTKG
KENRLCYYLG ATKDAATKIL SEVTRPMSVH MPAMKICEKL KKLDSQICEL
KYEKTLDLAS VDLRKMRVAE LKQILHSWGE ECRACAEKTD YVNLIQELAP
KYAATHPKTE L（配列番号 1）

シグナル配列を有する CDNF アミノ酸配列：

MWCASPVAVV AFCAGLLVSH PVLTQGQEAG GRPGADCEVC KEFLNRFYKS LIDRGVNFSL
DTIEKELISF CLDTKGKENR LCYYLGATKD AATKILSEVT RPMSVHMPAM KICEKLKKLD
SQICELKYEK TLDLASVDLR KMRVAELKQI LHSWGEECRA CAEKTDYVNL IQELAPKYAA
THPKTEL（配列番号 2）

成熟 MANF アミノ酸配列：

LRPGDCEVCI SYLGRFYQDL KDRDVTFSPA TIENELIKFC REARGKENRL
CYYIGATDDA ATKIINEVSK PLAHHIPVEK ICEKLKKKDS QICELKYDKQ
IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK
AASARTDL（配列番号 3）

シグナル配列を有する MANF アミノ酸配列：

MWATQGLAVA LALSVLPGSR ALRPGDCEVC ISYLGRFYQD LKDRDVTFSP
ATIENELIKF CREARGKENR LCYYIGATDD AATKIINEVS KPLAHHIPVE
KICEKLKKKD SQICELKYDK QIDLSTVDLK KLRVKELKKI LDDWGETCKG
CAEKSDYIRK INELMPKYAP KAASARTDL（配列番号 4）

【００６３】

【表２】

カニクイザルにおける ^{124}I-rhCDNF の鼻腔内投与後の動的 PET 脳スキャンにおいて有意な量のシグナル（組織当たり%ID）を有する脳領域（n=4；投与直後に撮影された PET スキャンからの平均）。

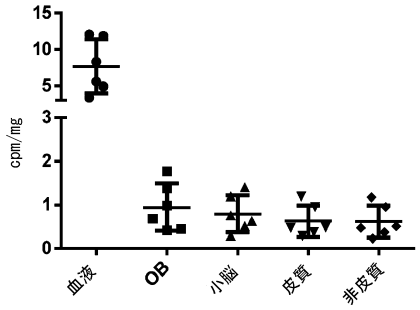
脳領域	%ID/g（平均）	S.E.M.
後脳	0.106%	0.0199
小脳	0.093%	0.0071
前脳	0.090%	0.0060
中脳	0.084%	0.0089
果核	0.083%	0.0093
海馬	0.082%	0.0117
心室	0.079%	0.0066
視床	0.077%	0.0108
白質路	0.076%	0.0038

【００６４】
（引用リスト）
特許文献
米国特許第6180603号明細書
米国特許出願公開第2012/027754号明細書
国際公開第2007068803号パンフレット
国際公開第2009133247号パンフレット
国際公開第2012119153号パンフレット
国際公開第2014066686号パンフレット
非特許文献
Airavaara, M. et al. 2009. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats. J Comp Neurol 515 (1), 116.
Airavaara, M. Harvey, B.K. Voutilainen, M.H. Shen, H. Chou, J Lindholm, P. Lindahl, M. Tuominen. R.K. Saarma, M. Wang, Y., and B. Hoffer. 2012. CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. Cell Transplant. 2012;21(6):1213-23.
Alcala-Barraza SR, Lee MS, Hanson LR, McDonald AA, Frey WH and McLoon LK. 2010. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. Journal Of Drug Targeting 18(3):179-190.
Aly, AE-E and Waszczac, B. 2015. Intranasal gene delivery for treating Parkinson ’ s disease: overcoming the blood-brain barrier, Expert Opin. Drug Deliv. 12(12):1923-1941.
Bender TS, Migliore MM, Campbell RB, John Gatley S and Waszczak BL. 2015. Intranasal administration of glial-derived neurotrophic factor (GDNF) rapidly and
significantly increases whole-brain GDNF level in rats. Neuroscience, 303: 569-576.
Hanson, LR et al. 2012. Intranasal delivery of growth differentiation factor 5 to the central nervous system. Drug Deliv 19(3):149-154.
Hellman M, Arumae U, Yu Ly, Lindholm P, Peranen J, Saarma M, Permi P (201

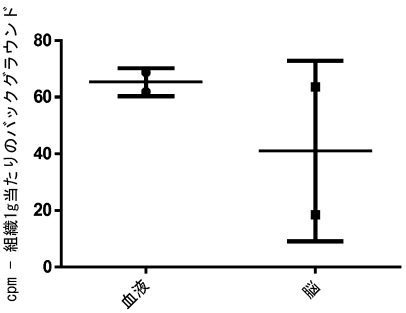
1) Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF) Has a Unique Mechanism to Rescue Apoptotic Neurons. J Biol Chem 286:2675-2680.
Lindholm, P., M.H. Voutilainen, J. Lauren, J. Peranen, V.M. Leppanen, J.O. Andressoo, M. Lindahl, S. Janhunen, N. Kalkkinen, T. Timmusk, R.K. Tuominen, and M. Saarma. 2007. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. Nature. 448:73-77.
Lindholm, P., and M. Saarma. 2010. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. Dev.Neurobiol.70:360-371.
Nadella R, Voutilainen MH, Saarma M, Gonzalez-Barrios JA, Leon-Chavez BA, Jimenez JM, Jimenez SH, Escobedo L, Martinez-Fong D. Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. J. Neuroinflammation. 11: 209, 2014.
Pardeshi, CV and Belgamwar, VS. 2013. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. Expert Opin Drug Deliv 10(7):957-972.
Shubber S, Vllasaliu D, Rauch C, Jordan F, Illum, L, and Stolnik, S. 2015. Mechanism of Mucosal Permeability Enhancement of CriticalSorb(R) (Solutol(R) HS15) Investigated In Vitro in Cell Cultures. Pharm Res 32:516-527.
Stolnik S, Shakesheff K. Formulations for delivery of therapeutic proteins. Biotechnol Lett. 2009;31(1):1-11.
Tang, X and Pikal, MJ. 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharmaceutical Research 21(2):191-200.
Voutilainen, M.H., S. Back, J. Peranen, P. Lindholm, A. Raasmaja, P.T. Mannisto, M. Saarma, and R.K. Tuominen. 2011. Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. Exp. Neurol. 228:99-108.
Voutilainen, M.H., S. Back, E. Porsti, L. Toppinen, L. Lindgren, P. Lindholm, J. Peranen, M. Saarma, and R.K. Tuominen. 2009. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. J.Neurosci. 29:9651-9659. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0833-09.2009.
Zhao H, Liu Y, Cheng L, Liu B, Zhang W, Guo YJ, Nie L. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor inhibits oxygen-glucose deprivation-induced cell damage and inflammation by suppressing endoplasmic reticulum stress in rat primary astrocytes. J. Mol. Neurosci. 51(3): 671-8, 2013.

【図面】

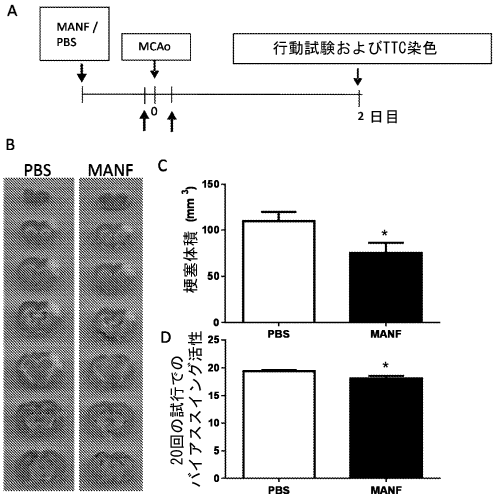
【図１】



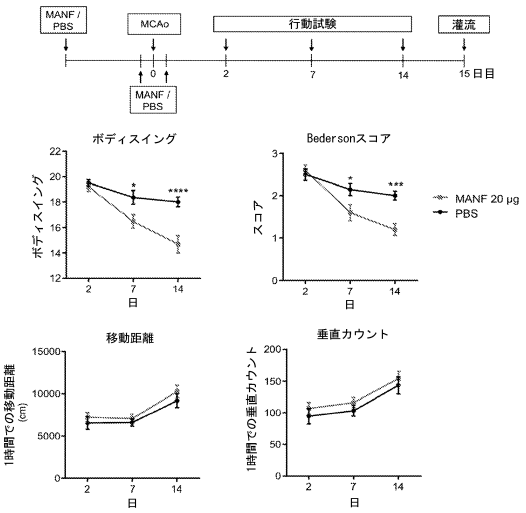
【図２】



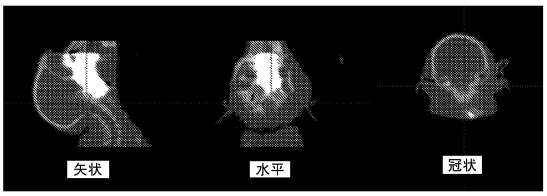
【図３】


A
MANF / PBS
MCAo
行動試験およびTTC染色
0
2 日目
B
PBS
MANF
C
梗塞体積 (mm³)
PBS
MANF
D
20回の試行でのバイアススイング活性
PBS
MANF

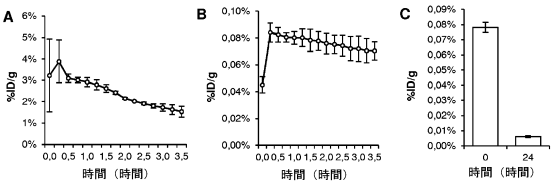
【図４】


MANF / PBS
MCAo
行動試験
灌流
0
2
7
14
15 日目
MANF / PBS
ボディスイング
Bedersonスコア
MANF 20 μg
PBS
移動距離
垂直カウント
日

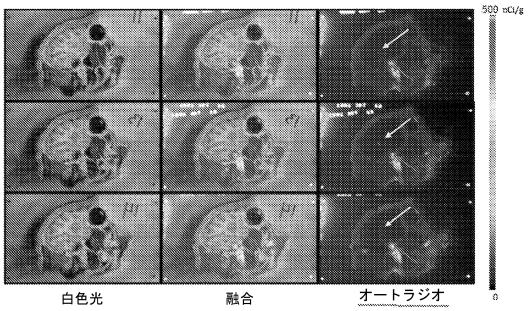
【図５】


矢状
水平
冠状

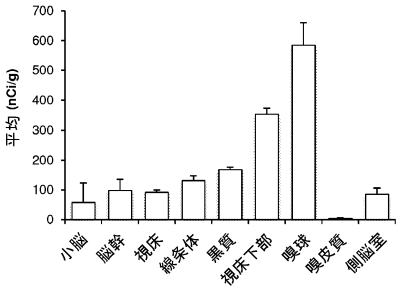
【図６】


A
B
C
%ID/g
時間（時間）

【図７】



【図８】



【配列表】
<u>0007201432000001.app</u>

フロントページの続き

(51)国際特許分類 FI
C07K 14/47 (2006.01) C07K 14/47 ZNA

フィンランド国 00730 ヘルシンキ ヒーシクーヤ 5 ディー 13
(72)発明者 マート サーマ
フィンランド国 00570 ヘルシンキ クロサーレン ピュイストティ 38 エイ 4
審査官 横田 倫子

(56)参考文献 特表2002－531489（JP，A）
特表2003－535105（JP，A）
特表2008－531560（JP，A）
FEBS Letters，Federation of European Biochemical Societies，2015年10月09日，589，24，3739-3748
Neuroscience，International Brain Research Organization，2015年07月09日，303，569-576
Journal of Drug Targeting，Taylor & Francis，2009年10月06日，18，3，179-190

(58)調査した分野 (Int.Cl.，DB名)
A61K 38／00
A61P 25／00
A61K 9／00
JSTPlus／JMEDPlus／JST7580（JDreamIII）
CAplus／MEDLINE／EMBASE／BIOSIS（STN）
UniProt／GeneSeq
PubMed