

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 723**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2016 PCT/FI2016/050813**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17085362**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2016 E 16809895 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3377089**

54 Título: **Composiciones que comprenden CDFN para usar en el tratamiento intranasal de enfermedades del sistema nervioso central**

30 Prioridad:

**18.11.2015 FI 20155857**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.10.2020**

73 Titular/es:

**HERANTIS PHARMA PLC (100.0%)  
Bertel Jungin Aukio 1  
02600 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**HUTTUNEN, HENRI;  
AIRAVAARA, MIKKO y  
SAARMA, MART**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 789 723 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden CDNF para usar en el tratamiento intranasal de enfermedades del sistema nervioso central

### Campo de la técnica

5 La presente descripción se refiere al campo de factores neurotróficos y proteínas localizadas en el retículo endoplásmico (RE) y más particularmente al campo del tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. En particular, la presente invención está dirigida a una composición adecuada para la administración nasal para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, atrofia sistémica múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración lobar frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Huntington, daño traumático cerebral y accidente cerebrovascular. La invención se define en las reivindicaciones.

### Antecedentes de la técnica

15 Los factores neurotróficos, el factor neurotrófico de dopamina cerebral (CDNF) y el factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálico (MANF) son actualmente las proteínas más eficaces para el tratamiento de las neuronas dopaminérgicas que degeneran en el modelo 6-OHDA de rata de enfermedad de Parkinson (Lindholm y Saarna, 2010). Ambos factores previenen potencialmente los síntomas de comportamiento e histológicos inducidos por 6-OHDA de la enfermedad de Parkinson cuando se aplican antes de la toxina (Lindholm y cols., 2007; Voutilainen y cols., 2009). Más importante aún, el tratamiento posterior con cualquier factor restauró eficazmente el comportamiento motórico normal y las inervaciones dopaminérgicas del cuerpo estriado cuando se aplican en la etapa en la que los síntomas inducidos por 6-OHDA en la enfermedad de Parkinson ya son de gran alcance (Lindholm y cols., 2007; Voutilainen y cols., 2011). El CDNF también protege y repara las neuronas dopaminérgicas en el modelo MPTP de ratón de enfermedad de Parkinson (Airavaara y cols., 2012) y en un modelo 6-OHDA grave es más eficaz que el factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF) (Airavaara y cols., 2012; Voutilainen y cols., 2011). Los mecanismos que se esconden detrás de la protección neuronal para estos factores no están totalmente claros, pero se ha sugerido que activan vías que tienen como objetivo aliviar el estrés oxidativo y del ER y que debilitan la muerte apoptótica celular. Muchas afecciones fisiopatológicas que incluyen diabetes mellitus y enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer (AD) y esclerosis lateral amiotrófica (ALS) están asociadas con el estrés del ER. Por consiguiente, el efecto del CDNF y MANF se ha demostrado en diversas enfermedades del sistema nervioso central (WO2009133247; WO2007068803; y Airavaara y cols., 2009). Además, el CDNF y el MANF suprimen la neuroinflamación, que está implicada en la fisiopatología de la mayoría de las enfermedades y lesiones del SNC, si no todas (Nadella y cols., 2014; Zhao y cols., 2013).

En el documento WO2014066686, se describe un suministro de MANF potenciado por convención a una región cerebral de un paciente. Un dispositivo neuro-quirúrgico para este método invasivo comprende un catéter que se puede colocar en o cerca de la región del cerebro y una bomba para generar un gradiente de presión positiva entre el catéter y la región del cerebro.

Aly y cols., 2015, revisan el progreso actual en los métodos de distribución de genes intranasales para tratar la enfermedad de Parkinson. En el resumen, se establece que la distribución intranasal proporciona un abordaje prometedor para el desarrollo de una terapia génica no invasiva para la enfermedad de Parkinson. Los autores también analizan que CDNF y MANF han demostrado eficacia en modelos animales de enfermedad de Parkinson, pero aún no se han probado por vía intranasal. Sin embargo, es notable que las propiedades de penetración de la nariz al cerebro de las partículas virales usadas en los métodos de distribución génica no dependen de la secuencia génica del factor neurotrófico elegido. Por el contrario, la capacidad de penetración intranasal de una proteína de alto peso molecular es siempre una propiedad única e impredecible.

El documento US6180603 describe un método y una composición farmacéutica para transportar un agente neurológico al cerebro en el que la composición farmacéutica se administra por vía intranasal. El documento describe específicamente composiciones farmacéuticas que comprenden el factor neurotrófico NGF.

Alcalá-Barraza y cols., 2010, describen la distribución intranasal de BDNF, CNTF, neurotrofina-4/5 (NT-4/5) y eritropoyetina (EPO), lo que da lugar a concentraciones nanomolares de las moléculas en el cerebro de rata. De manera correspondiente, Bender y cols., 2015, describen la administración intranasal de GDNF, ya sea en formulación liposómica o en PBS, al cerebro de rata.

Pardeshi & Shailendra (2013) describen que las vías convencionales de administración de fármacos, como la administración oral, no son capaces de distribuir un número de agentes terapéuticos al cerebro de manera eficaz. La barrera hematoencefálica (BBB) y la barrera hemato-cerebroespinal (BCB) dificultan la entrada de fármacos desde la circulación sistémica al sistema nervioso central (SNC). Los autores revisan la distribución directa desde la nariz al cerebro y concluyen que se pueden distribuir una variedad de agentes neuro-terapéuticos al SNC por vía nasal. Sin embargo, una de las principales limitaciones de la distribución por vía nasal según lo enumerado por los autores es la disminución de la permeabilidad de los fármacos de alto peso molecular a través de la mucosa nasal.

## Resumen de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones para la administración intranasal para usar en el tratamiento intranasal de enfermedades del sistema nervioso central.

Es otro objetivo de la descripción proporcionar nuevos usos de los polipéptidos CDFN y MANF.

5 En la presente descripción, se ha descubierto que sorprendentemente las características químicas y biológicas de los polipéptidos CDFN y MANF facilitan el transporte de los polipéptidos al sistema nervioso central (SNC) cuando los polipéptidos se administran por vía intranasal al paciente. Los polipéptidos CDFN y MANF, por lo tanto, son capaces de evitar la barrera hematoencefálica a través de la vía intranasal y alcanzar el SNC.

10 Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona una composición para la administración intranasal que comprende un polipéptido CDFN que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 o un fragmento funcional de este para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central.

En otro aspecto, la descripción proporciona una composición para la administración intranasal que comprende un polipéptido MANF que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 o un fragmento funcional de este para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central.

## 15 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Distribución en cerebro y en plasma de (rh)CDFN humano recombinante marcado con <sup>125</sup>I administrado por vía intranasal en ratas Sprague Dawley no lesionadas. Se administraron aproximadamente 10 ng de rhCDFN marcado con <sup>125</sup>I en albúmina de suero bovino al 1% por vía intranasal en 6 ratas bajo anestesia. 20 minutos - 4 horas más tarde se recogieron muestras de sangre junto con regiones de cerebro, bulbo olfatorio, cerebelo, corteza y áreas no corticales. En sangre total, se detectaron  $2,9 \pm 1,3$  % de rhCDFN marcado con <sup>125</sup>I en relación con la cantidad total suministrada. Los valores de CPM con el valor de fondo sustraído para los tejidos cerebrales fueron del 7-13% en comparación con los valores en sangre que indican que entre el 0,16-0,36% de rhCDFN marcado con <sup>125</sup>I había alcanzado los tejidos cerebrales.

Figura 2. Distribución en cerebro y en plasma de rhMANF marcado con <sup>125</sup>I administrado por vía intranasal en ratas. El 0,14-0,16% alcanzaron la circulación. Se anestesiaron ratas macho Sprague Dawley y se las sometió a oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) durante 60 minutos. Dos días después se anestesiaron las ratas de nuevo y se les administraron aproximadamente 8 ng de <sup>125</sup>I-rhMANF (16  $\mu$ l) junto con 20  $\mu$ g de rhMANF sin marcar (en 4  $\mu$ l). Una hora más tarde se recogieron muestras de sangre y se perfundieron las ratas de modo transcárdico con solución salina y se recogieron los cerebros. Los resultados se expresaron como cuentas por minuto por miligramo de peso de tejido húmedo.

Figura 3. El rhMANF administrado por vía intranasal reduce el volumen de infarto en modelo de rata MCAO de accidente cerebrovascular isquémico. (A) Cronología del estudio. Se anestesiaron brevemente las ratas con isoflurano la noche anterior. Se administraron 10  $\mu$ l de solución de PBS o de MANF dentro de cada orificio nasal en aproximadamente un ángulo de 70°. Al día siguiente las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/kg) y se repitió la administración intranasal justo antes de la MCAO y justo después de la reperusión. La arteria cerebral media junto con las arterias carótidas comunes se ocluyeron durante 60 minutos. Se les realizó la necropsia a los animales 48 h después la MCAO. (B) Escáneres ejemplo de secciones de cerebro coronal teñidas con cloruro de trifeníltetrazolio (TTC) 48 h después de la lesión de ratas tratadas con PBS y rhMANF. (C) Volúmenes de infarto medidos mediante tinción TTC. El rhMANF reduce el volumen de infarto en comparación con animales tratados con PBS ( $P = 0,034$ , prueba de t de Student). (D) Actividad de oscilación parcial de animales tratados con PBS y rhMANF. El efecto neuroprotector también se observó como una disminución de la asimetría corporal ( $P = 0,041$ , prueba de t de Student). En los paneles C y D, el grupo de PBS consiste en un total de 17 ratas y el grupo de MANF consiste en un total de 24 ratas. El grupo de MANF se combina a partir de dos dosis de rhMANF: dosis de 20  $\mu$ g totales (3,3  $\mu$ g por orificio nasal; 0,33  $\mu$ g/ $\mu$ l de solución  $n = 10$ ) y dosis de 60  $\mu$ g totales (10  $\mu$ g por orificio nasal; 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de solución  $n = 14$ ). Los grupos de MANF se combinaron en este caso porque los dos grupos de dosis mostraron un nivel de efecto muy similar.

Figura 4. El rhMANF administrado por vía intranasal promueve la recuperación funcional en el modelo de MCAO de rata de accidente cerebrovascular isquémico. Se administraron 20  $\mu$ g de rhMANF (10  $\mu$ l por orificio nasal; 0,33  $\mu$ g/ $\mu$ l de solución en PBS) o se administró un volumen igual de PBS por vía intranasal bajo anestesia con isoflurano. (A) Diseño del estudio. Las administraciones intranasales se hicieron la tarde antes de la cirugía, justo antes de la MCAO y después de la reperusión. Las evaluaciones de comportamiento se realizaron 2, 7 y 14 días después de la MCAO e incluyó la prueba de oscilación corporal (B), la evaluación neurológica global (puntuación de Bederson, C), distancia recorrida (D), y actividad vertical (E) en una prueba locomotora. Los datos se analizaron usando ANOVA de medidas repetidas con la prueba post hoc de Sidak ( $n = 14-15$ ). El ANOVA con medidas repetidas de dos vías mostraron una interacción Tratamiento X Tiempo significativa ( $F(2, 54) = 9,34$ ,  $P < 0,001$  para la oscilación corporal y  $F(2, 54) = 7,97$ ,  $P < 0,001$  para la puntuación de Bederson).

Figura 5. Tomografía por emisión de positrones (PET) representativa – imágenes de tomografía computerizada (TC) de un macaco de *cynomolgus* dosificado por vía intranasal con  $^{124}\text{I}$ -rhCDNF. Se dosificaron 500  $\mu\text{Ci}$  de rhCDNF humano recombinante marcado con  $^{124}\text{I}$  por animal ( $n = 4$ ). Aproximadamente el 30% de la dosis inyectada se localizó en la cavidad nasal inmediatamente después de la dosificación.

5 Figura 6. Porcentaje (%) de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) en la cavidad nasal superior (A) y en todo el cerebro (B) determinado mediante escáneres PET de cerebro dinámico focalizado entre 0 y 3,5 horas después de la dosificación intranasal. El panel C muestra que más del 90% del  $^{124}\text{I}$ -rhCDNF que ha penetrado en el cerebro se elimina del cerebro dentro de las 24 horas posteriores a la administración intranasal.

10 Figura 7. Imágenes de múltiples vistas que se combinan con imágenes de luz blanca (izquierda), luz blanca y autorradioluminograma registradas en conjunto (centro) y autorradioluminograma solo (derecha) de cerebros de macaco *cynomolgus* después de la dosificación intranasal de  $^{124}\text{I}$ -rhCDNF. La señal que se ve en los ventrículos laterales y en el oído medio se indica con flechas.

15 Figura 8. Cuantificación de datos de autorradiografía en Regiones de Interés (ROI). Las concentraciones de radioactividad, derivadas de  $^{124}\text{I}$ -rhCDNF que ha penetrado en el cerebro, se expresan como nCi por gramo de tejido (nCi/g).

### Descripción de las realizaciones

20 Como se usa en esta memoria, un “polipéptido” se refiere generalmente a una molécula que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido. “Polipéptido” también se refiere a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos, variantes estructurales relacionadas de origen natural y sus análogos sintéticos no naturales de este  
 20 unidos a través de enlaces peptídicos, variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos no naturales de estos. Los polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado.

25 Como se usa en esta memoria, el término “fragmento” aplicado a un polipéptido, puede ser normalmente al menos aproximadamente siete aminoácidos contiguos, típicamente, al menos aproximadamente quince aminoácidos contiguos, más típicamente, al menos aproximadamente treinta aminoácidos contiguos, típicamente al menos aproximadamente cuarenta aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos aproximadamente cincuenta aminoácidos, incluso más, preferiblemente al menos aproximadamente sesenta aminoácidos y lo más preferiblemente el fragmento peptídico será mayor de aproximadamente setenta aminoácidos contiguos de longitud. El término “fragmento funcional” se refiere a un fragmento que aún retiene la actividad biológica del polipéptido intacto.

30 La presente invención está relacionada con una proteína factor neurotrófico CDNF. Los polipéptidos CDNF son el CDNF humano de longitud completa con un péptido señal que tiene la longitud total de 187 aminoácidos y el CDNF maduro sin el péptido señal que tiene la longitud total de 161 aminoácidos (véase Tabla 1) con el tamaño de 18,5 kDa.

35 La presente descripción está también relacionada con la proteína factor neurotrófico MANF. Los polipéptidos MANF particularmente importantes son el MANF humano de longitud completa con un péptido señal que tiene la longitud total de 179 aminoácidos y el MANF humano maduro sin el péptido señal que tiene la longitud total de 158 aminoácidos (véase Tabla 1) con el tamaño de 18 kDa. El ácido nucleico de MANF que codifica el polipéptido MANF maduro sin un péptido señal se puede combinar con un ácido nucleico que codifica otro péptido señal para proporcionar un polipéptido MANF de longitud completa con un péptido señal diferente al péptido señal del MANF nativo.

40 Los fragmentos funcionales de los polipéptidos MANF y CDNF también están disponibles para una persona experta ya que la producción de fragmentos de polipéptidos completos se conoce en la técnica. Por consiguiente, la proteína MANF o CDNF puede ser una forma natural de longitud completa o puede ser una forma truncada o derivatizada de otro modo. Ejemplos de fragmentos de MANF o CDNF funcionales se describen en el documento WO2013034805, como péptidos que comprenden la secuencia CKGC (SEQ ID N°: 5) o CRAC (SEQ ID N°: 6), preferiblemente con la longitud de 4-40 aminoácidos. Además, Hellmann y cols., 2011, describen un constructo fragmento C-terminal activo  
 45 de MANF que comprende los residuos 96-158 de la SEQ ID N°: 3.

Además de las variantes alélicas de MANF/CDNF que se dan de manera natural, se pueden introducir cambios mediante mutación en secuencias de MANF/CDNF que incurren en alteraciones en las secuencias de aminoácidos del polipéptido de MANF/CDNF codificado. Las sustituciones de nucleótidos que dan lugar a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos “no esenciales” se pueden hacer en la secuencia de un polipéptido de  
 50 MANF/CDNF. Los polipéptidos de MANF/CDNF o los fragmentos funcionales de estos que comprenden una o más sustituciones “no esenciales” se pueden ver como equivalentes de polipéptidos de MANF/CDNF de tipo salvaje descritos en esta memoria. Estos equivalentes son preferiblemente un 90%, más preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homólogos a dichos polipéptidos de tipo salvaje.

55 Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que se puede modificar en las secuencias de tipo salvaje de MANF/CDNF sin alterar su actividad biológica, mientras que se requiere un residuo de aminoácido “esencial” para tal actividad biológica. Por ejemplo, se predice que los residuos de aminoácidos que se conservan entre las moléculas

de MANF/CDNF de la invención son particularmente no susceptibles de alteración. Son bien conocidos en la técnica los aminoácidos para los que se pueden hacer sustituciones conservativas.

5 Como se discutió anteriormente, se ha encontrado que los polipéptidos CDFN y MANF son capaces de evitar la barrera hematoencefálica a través de la vía nasal y alcanzar el sistema nervioso central, SNC. Por lo tanto, los polipéptidos CDFN y MANF se pueden administrar por vía intranasal a un paciente y usarse para el tratamiento de un número de enfermedades del sistema nervioso central.

10 Por consiguiente, en una realización se proporciona una composición para administración intranasal que comprende un polipéptido CDFN que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 o un fragmento funcional de este para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central. Particularmente, en esta realización, se logra el tratamiento intranasal de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la atrofia sistémica múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, la degeneración lobar frontotemporal, la demencia con cuerpos de Lewy, el deterioro cognitivo leve, la enfermedad de Huntington, la lesión traumática cerebral y el accidente cerebrovascular.

15 Una segunda realización proporciona el uso de una composición que comprende un polipéptido de CDFN que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 o un fragmento funcional de este para la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central.

20 Otra realización es un método para la administración intranasal de un polipéptido de CDFN a un sujeto que padece una enfermedad del sistema nervioso central, el método que comprende la etapa de: administrar por vía intranasal al sujeto en una o más dosis una composición que comprende un polipéptido de CDFN que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 o un fragmento funcional de este.

25 Una realización está dirigida a una composición para administración intranasal que comprende un polipéptido de MANF que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 o un fragmento funcional de este para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central. Preferiblemente, dicha enfermedad del sistema nervioso central se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, atrofia sistémica múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración lobar frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Huntington, lesión traumática cerebral y accidente cerebrovascular.

30 Una realización adicional es el uso de la composición que comprende un polipéptido de MANF que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 o un fragmento funcional de este para la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central.

Otra realización adicional es un método para la administración intranasal de un polipéptido de MANF a un sujeto que padece una enfermedad del sistema nervioso central, el método que comprende la etapa de: administrar por vía intranasal al sujeto en una o más dosis una composición que comprende un polipéptido de MANF que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 o un fragmento funcional de este.

### 35 Composiciones adecuadas para administración intranasal

Las composiciones adecuadas para la administración intranasal que comprenden los polipéptidos CDFN/MANF como agentes activos pueden estar en forma de una suspensión líquida, una dispersión líquida, un polvo, un liposoma, una solución acuosa o combinaciones de estas. De este modo, la composición se puede dispensar por vía intranasal como un aerosol nasal en polvo o líquido, gotas nasales, un gel o pomada, a través de un tubo o catéter, mediante una jeringa, mediante paquete de cola, mediante compresa o mediante infusión submucosal. La composición se puede administrar a la cavidad nasal sola o en combinación con otros agentes neurológicamente activos. Los polipéptidos CDFN/MANF se pueden combinar con un transportador y/u otros adyuvantes para formar una composición farmacéutica. Preferiblemente, la composición comprende promotores de absorción y sistemas moduladores de la absorción como ciclopenta decalactonas, alquilsacáridos, quitosano, pectina de baja metilación o ésteres de poliglicol hidroxistearato. Se pueden añadir a la composición sustancias lipofílicas en forma de micelas para mejorar la absorción del agente neurológico a través del epitelio olfatorio. Entre estas sustancias que son aditivos micelares preferidos se encuentran los gangliósidos GM-1 y la fosfatidilserina (PS), que se pueden combinar con el agente neurológico ya sea solo o en combinación. Dichos promotores de absorción (es decir, potenciadores de absorción) y sistemas moduladores de absorción pueden aumentar el transporte de polipéptidos CDFN/MANF a través de la membrana nasal y así promover niveles terapéuticos suficientemente altos en el SNC. Se cree que los promotores de absorción mejoran el suministro de fármacos a través de la ruta transcelular o las alteraciones en las proteínas de unión que dan como resultado la promoción de la translocación del fármaco a través de la ruta paracelular. Se conocen en la técnica otros potenciadores de la absorción adecuados para las presentes composiciones, véase p. ej., Stolnik y cols., 2009 y Shubber y cols., 2014.

55 Los polipéptidos recombinantes MANF y CDFN para las composiciones se pueden producir como se describe en el documento WO2009133247 y WO2007068803. Para la distribución intranasal, se puede agregar simplemente la proteína recombinante purificada a un tampón farmacéuticamente adecuado. Por ejemplo, en Hanson y cols., 2012, se administró por vía intranasal un factor de crecimiento en tampón ácido que comprendía acetato sódico 20 mM a pH

4,25. En una realización preferida, las proteínas se liofilizan o se secan por pulverización para producir un polvo para usar en un espray nasal. Los métodos para liofilización se conocen bien en la técnica (véase p. ej., Tang y Pikal 2004). La concentración óptima del polipéptido CDFN/MANF activo en la composición dependerá necesariamente de las características del paciente y de la naturaleza de la enfermedad o de la afección para la que se va a usar el tratamiento.

5 Preferiblemente, la composición se administra por vía intranasal 1-5 veces al día, más preferiblemente 1-2 veces al día y la cantidad de polipéptido CDFN/MANF está entre 10-1000 mg, más preferiblemente 100-500 mg por dosis. El régimen de dosificación más aceptable sería una dosis en una o ambas fosas nasales.

#### Dispositivo

10 Un ejemplo de dispositivos adecuados para la administración intranasal se describe en el documento WO2012119153. Se diseña un dispositivo adecuado para distribuir un fármaco en forma de una suspensión líquida, una dispersión líquida, un polvo, un liposoma, una solución acuosa o combinaciones de estas. El dispositivo está preferiblemente diseñado para que la composición nasal administrada se distribuya al área olfatoria en el tercio superior de la cavidad nasal y, particularmente, al epitelio olfatorio con el fin de promover el transporte de los agentes activos de la composición dentro de las neuronas olfatorias periféricas. El dispositivo normalmente comprende una botella, bomba

15 y propulsor. Preferiblemente, el dispositivo tiene un contenedor capaz de contener un propelente, un difusor en comunicación con el contenedor, una cámara del compuesto para el fármaco en comunicación con el difusor y una boquilla en comunicación con la cámara del compuesto. Los dispositivos están disponibles para sistemas de dosis única o de dosis múltiple. Las formulaciones en polvo para usar en dicho dispositivo son preferiblemente en forma de aerosol.

20 Aunque en esta memoria se han descrito con detalle realizaciones particulares, esto se ha hecho a modo de ejemplo solo con fines ilustrativos.

En particular, se contempla por los inventores que se pueden hacer varias sustituciones, alteraciones y modificaciones.

Por ejemplo, se cree que la elección de protocolos es una cuestión de rutina para una persona experta en la técnica con conocimiento de las realizaciones descritas en esta memoria.

25 Habiendo descrito previamente de modo general la invención, la misma se entenderá más fácilmente con referencia a la siguiente Sección Experimental, que se proporciona a modo de ilustración y no pretende ser limitante.

Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, en la práctica o prueba de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

#### 30 Ejemplos

##### Ejemplo 1

El presente estudio se diseñó para evaluar la distribución en el cerebro y en plasma de la proteína CDFN humana recombinante (rhCDFN) marcada radioactivamente administrada por vía intranasal. El marcaje de rhCDFN con <sup>125</sup>I que usa el método de lactoperoxidasa y el análisis se llevaron a cabo como se describe en Voutilainen y cols., 2011.

35 Uso animal. El marcaje de rhCDFN con <sup>125</sup>I que usa el método de lactoperoxidasa y el análisis se llevaron a cabo como se describe en Voutilainen y cols., 2011. Se anestesiaron seis ratas Sprague Dawley sin lesionar y se administraron aproximadamente 10 ng de rhCDFN marcado con <sup>125</sup>I en albúmina de suero bovina al 1% por vía intranasal bajo anestesia. 20 min – 4 horas después se recogieron muestras de sangre junto con regiones del cerebro, bulbo olfatorio, cerebelo, corteza y áreas no corticales.

40 Análisis del contador gamma. Usando el recuento gamma, se encontraron  $2,9 \pm 1,3\%$  (intervalo 1,3-4,5%) de rhCDFN marcado con <sup>125</sup>I en sangre (Figura 1). Cuando los valores de CPM se compararon con los encontrados en el cerebro se encontró que aproximadamente el 0,16-0,36% del rhCDFN marcado con <sup>125</sup>I había alcanzado el tejido cerebral. Estos datos muestran que la proteína rhCDFN, cuando se administra a la cavidad nasal en forma líquida, puede penetrar en el tejido cerebral en ratas.

##### 45 Ejemplo 2

El presente estudio se diseñó para evaluar la distribución en el cerebro y en plasma de la proteína MANF humana recombinante (rhMANF) marcada radioactivamente administrada por vía intranasal.

50 Uso animal. Se anestesiaron dos ratas Sprague Dawley y se sometieron al procedimiento de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) junto con la oclusión de la arteria carótida común durante 60 minutos. Dos días después, las ratas fueron anestesiadas de nuevo, seguido de la administración intranasal de aproximadamente 8 ng de <sup>125</sup>I-rhMANF (16 µl), marcaje que usa el método de lactoperoxidasa (Voutilainen y cols., Exp. Neurol. 2011) y 20 µg de rhMANF sin marcar (en 4 µl). Una hora más tarde se recogieron muestras de sangre y las ratas se perfundieron por vía transcardíaca con solución salina y se recogieron los cerebros.

Análisis del contador gamma. Aproximadamente se encontró un 0,14 – 0,16% de la dosis total de rhMANF marcado con <sup>125</sup>I en el cerebro y en la sangre (Figura 2). Estos datos muestran que la proteína rhMANF, cuando se administra en la cavidad nasal en forma líquida, puede penetrar en el tejido cerebral en ratas.

Ejemplo 3

5 El presente estudio fue diseñado para evaluar los efectos terapéuticos de la proteína MANF humana recombinante (rhMANF) administrada por vía intranasal.

10 Uso animal, evaluación clínica e histopatológica. Las ratas se anestesiaron brevemente con isoflurano la noche anterior. Se administraron 10 µl de PBS o de solución de MANF en cada orificio nasal en un ángulo de aproximadamente 70°. Al día siguiente, las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/kg) y se repitió la administración intranasal justo antes de la MCAO y justo después de la reperusión. Se ocluyeron la MCA junto con la arteria carótida común durante 60 minutos. Se les realizó la necropsia a los animales 48 después de la MCAO.

15 La tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) de las secciones de cerebro coronal mostraron que el MANF redujo el volumen de infarto en comparación con los animales tratados con PBS (P = 0,034, prueba de t de Student, n = 17-24; Figura 3). (D) El efecto neuroprotector también se observó como una disminución de la asimetría corporal usando la prueba de oscilación corporal parcial (P = 0,041, prueba de t de Student). El grupo de MANF se combina a partir de dos dosis: dosis de un total de 20 µg (3,3 µg por orificio nasal; 0,33 µg/µl de solución n = 10, promedio de 68 ± 17) y una dosis de un total de 60 µg (10 µg por orificio nasal; 1 µg/µl de solución n = 14, promedio de 80 ± 15), ya que ambos grupos tuvieron resultados muy similares.

20 En otro grupo de animales, se administró la dosis de MANF de un total de 20 µg (3,3 µg por orificio nasal; 0,33 µg/µl) de manera similar a la anterior y se monitorizó el comportamiento de las ratas a lo largo de 2 semanas para medir la recuperación funcional. Se analizaron la actividad de oscilación parcial, la puntuación de Bederson, la distancia recorrida y la actividad vertical en los días 2, 7 y 14 posteriores al accidente cerebrovascular. El ANOVA de dos vías con mediciones repetidas mostró una interacción Tratamiento X Tiempo significativa (F<sub>2,54</sub>) = 9,34, P <0,001 para la oscilación parcial y F(2,54) = 7,97, P <0,001 para la puntuación de Bederson (Figura 4; n = 14-15). Los datos muestran que el tratamiento previo con la proteína MANF recombinante administrada por vía intranasal promovió la recuperación funcional de los síntomas de accidente cerebrovascular.

Ejemplo 4

30 El presente estudio fue diseñado para evaluar la penetración cerebral y la cinética de la proteína CDFN humana recombinante (rhCDFN) marcada radioactivamente administrada por vía intranasal en primates no humanos. Se administró rhCDFN marcado con <sup>124</sup>I usando el método de lactoperoxidasa (400 µg, 500 µCi; formulado en BSA al 1%, ascorbato sódico al 0,1% y ácido genticóico al 0,1%, pH 6,4) a la cavidad nasal de macacos cynomolgus. Se usó la tomografía por emisión de positrones (PET) para determinar la penetración de la nariz al cerebro del marcador <sup>124</sup>I-rhCDFN.

35 Uso animal. En este estudio se usaron cuatro monos cynomolgus hembra (macaca fascicularis) (MPI Research). Los monos tenían de 2-4 años de edad y pesaron 3,08 ± 0,22 kg en el día de la toma de imagen. Se establecieron las salas de los animales para mantener una temperatura de 18-26°C, una humedad relativa de 50 ± 20%, tanto como sea posible y ciclos intermitentes de luz y oscuridad de aproximadamente 12 horas. Se proporcionó alimento y agua ad libitum apropiados para la dieta de los primates. Para diversos procedimientos donde se manipularon animales, p. ej., exámenes físicos, los animales se podrían haber sedado a este efecto con ketamina. Cada animal estuvo en ayunas durante un mínimo de 4 horas antes de la inducción de la anestesia con una dosis de ketamina (5-10 mg/kg IM), seguido de isoflurano (1-2%) con oxígeno (2%) durante la duración de cada escáner. El bienestar del animal para este estudio cumplió con la Ley del Bienestar Animal del Departamento de Agricultura de los EE. UU. (USDA) (9 CFR Partes 1, 2 y 3). Se siguió la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, National Academy Press, Washington, D. C., 2011. Las instalaciones de animales mantienen una declaración de Garantía de Bienestar Animal con los Institutos Nacionales de la Oficina de Salud de Bienestar de Animales de Laboratorio.

Dispositivo. Se usó un dispositivo de administración olfatoria presurizado similar al descrito en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N°. US2012/027754 para la administración intranasal de la rhCDFN.

50 Imágenes por tomografía por emisión de positrones y análisis de imágenes. Se adquirieron datos del movimiento en lecho continuo de todo el cuerpo y tomografía de emisión de positrones focalizada (PET) y tomografía computerizada (CT) en un Focus220 microPET (Siemens Medical Systems, Knoxville, TN) y CereTom CT (NeuroLogica Corp, Danvers, MA), respectivamente. Cada mono se anestesió, intubó y colocó en la camilla PET primero en la cabeza y en posición prono para el escáner. Se administraron dos dosis por orificio nasal en la camilla. Inmediatamente después de que se administró la dosis final, se realizó un escáner PET del cerebro dinámico focalizado durante 225 minutos. Se realizó un escáner adicional 24 h después de la dosificación para evaluar la cinética del aclaramiento cerebral del marcador.

Se obtuvieron los datos de emisión en modo de lista 3D y se volvieron a archivar en sinogramas 2D. Las imágenes PET se reconstruyeron mediante un algoritmo de Maximización de Expectativa de Subgrupo Ordenado 2D (OSEM2D). Se hicieron correcciones para la normalización, decaimiento, tiempo muerto, muestreos y atenuación del detector. El escáner dinámico se volvió a archivar en cuadros de 45 x 5 minutos y cuadro de 1 x 225 minutos. Cada imagen CT reconstruida se volvió a muestrear e interpolar a la misma resolución de vóxel que la imagen PET adjunta (0,9 mm). Cada imagen PET se registró conjuntamente con la imagen CT correspondiente (Figura 5).

A partir de las imágenes PET/CT previamente procesadas se generaron películas de Proyección de Máxima Intensidad (MIP) giratoria e imágenes de vista de 3 cortes centradas en el cerebro. Se eligió una escala de color lineal para el intervalo de intensidad de 0,2 a 20% de ID/ml. Se definieron las Regiones de Interés (ROIs) par la cavidad nasal superior, garganta y tiroides aplicando una combinación de umbrales de segmentación manuales y automáticos al PET o se dibujaron a mano en las imágenes registradas conjuntamente. Las ROIs para varias regiones del cerebro que incluyen el cerebro completo se adquirieron ajustando a un atlas de cerebro de Cynomolgus patentado de 45 regiones a los cerebros de cada mono. Se generó una hoja de cálculo maestra que incluía el volumen, la actividad y la concentración (Actividad/Volumen) en cada punto de tiempo para cada ROI generado.

Los datos de imágenes PET muestran que la proteína CDFN humana recombinante, como una sustancia farmacológica, es capaz de penetrar de la nariz al cerebro cuando se pulveriza y se suministra a la cavidad nasal superior en primates no humanos sanos (Figura 6A-B). Usando una formulación genérica no optimizada, el rhCDFN suministrado por vía intranasal ya alcanzó niveles cerebrales correspondientes al 1-4% de la dosis total inyectada. Las áreas cerebrales con el mayor porcentaje de dosis inyectada por gramo de cantidades de tejido se enumeran en la Tabla 2.

Los datos de imágenes PET también muestran que aproximadamente el  $92 \pm 1\%$  del rhCDFN suministrado al cerebro se elimina del cerebro dentro de las 24 horas (Figura 6C), lo que sugiere que la vida media cerebral del rhCDFN es del orden de 6 horas. El uso de la técnica de imagen *in vivo* junto con un dispositivo diseñado para el suministro de fármacos de la nariz al cerebro en humanos y animales grandes confirma que los factores neurotróficos de la familia de CDFN se pueden administrar eficazmente al cerebro a través de la ruta de administración nasal.

#### Ejemplo 5

El presente estudio fue diseñado para evaluar la penetración cerebral de la proteína CDFN humana recombinante (rhCDFN) marcada radioactivamente administrada por vía intranasal. Se administró rhCDFN marcada con  $^{124}\text{I}$  usando el método de lactoperoxidasa (400  $\mu\text{g}$ , 500  $\mu\text{Ci}$ ; formulada en BSA al 1%, ascorbato sódico al 0,1% y ácido genticónico al 0,1%, pH 6,4) a la cavidad nasal en macacos cynomolgus. Se usó la autorradiografía para determinar la penetración de la nariz al cerebro del marcador  $^{124}\text{I}$ -rhCDFN.

Uso animal. Se usaron los mismos procedimientos con animales como en el Ejemplo 4.

Dispositivo. Se usó el mismo dispositivo de dosificación intranasal y el mismo procedimiento de dosificación que en el Ejemplo 4.

Autorradiografía. A la hora de finalización programada (después de un punto de tiempo de imagen de cuerpo entero de 4 horas), se sacrificó un animal y se le extrajo la cabeza. La cabeza se congeló posteriormente en un baño de hexano/hielo seco y se embebió en una matriz de carboximetilcelulosa al 5%. La cabeza embebida se montó sobre una platina de criomacrotomo mantenida a aproximadamente  $-10^\circ$  a  $-30^\circ\text{C}$  y se seccionó en secciones de aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  de grosor tomadas cada 0,5 mm en el plano sagital y se capturaron en cinta adhesiva. La autorradiografía de  $^{124}\text{I}$  cuantitativa se realizó con 52 cortes y de 40  $\mu\text{m}$  de grosor en una sección del cerebro que abarca el área entre los dos ojos.

En particular, se analizaron las siguientes regiones: cavidad nasal, bulbo olfatorio, tracto olfatorio, corteza olfatoria, tálamo, cuerpo estriado, sustancia negra, hipotálamo y ventrículo lateral. Se tomó una imagen de luz blanca de la cara en bloque en cada sección. Un conjunto de secciones se montaron, se expusieron a pantallas de imágenes de fósforo y se escanearon usando el sistema de adquisición de imagen Storm 860 (Figura 7). La cuantificación, en relación con los estándares de calibración, se realizó usando el paquete informático de análisis de imagen VivoQuant. La curva de calibración estándar se construyó a partir de la actividad calculada en las imágenes de autorradiografía y de las concentraciones normales de los estándares de calibración- $^{124}\text{I}$  usando regresión lineal. Esto se continuó por el registro de imágenes donde se registraron los cortes de autorradiografía con las imágenes de luz blanca correspondientes. Después, se cargaron las imágenes registradas en el paquete informático de análisis VivoQuant y se dibujaron manualmente las ROIs sobre los datos de luz blanca. Cada región ROI se dibujó en un corte representativo y se calculó la intensidad media en las imágenes de autorradiografía calibradas para cada una de ellas. Se indicó también la radioactividad de fondo para cada corte para referencia.

Como se muestra en la Figura 8, la cuantificación de los datos de autorradiografía sugiere que la  $^{124}\text{I}$ -rhCDFN administrada por vía intranasal penetra en varias estructuras cerebrales del cerebro, el cerebelo y el ventrículo lateral.

Para confirmar el suministro de rhCDFN de la nariz al cerebro en primates no humanos se usó la autorradiografía para visualizar el rhCDFN marcado radioactivamente en las secciones de un primate no humano al que se le realizó la



5 necropsia 4 horas después de la administración nasal del marcador. Los datos de autorradiografía confirman que había penetrado algo de rhCDNF marcado al cerebro desde la cavidad nasal superior. Se detectó señal en varias regiones del cerebro, que incluyen cerebelo, tronco encefálico, tálamo, cuerpo estriado, sustancia negra, hipotálamo y bulbo olfatorio. La presunta ruta de entrada a los ventrículos laterales es a través de los conductos de líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de la placa cribiforme. Estos datos sugieren que el rhCDNF administrado por vía intranasal obtiene acceso al permitiendo una amplia distribución en el SNC.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de CDNF y MANF

Secuencia de aminoácidos de CDNF maduro:

QEAGGRPGAD CEVCKEFLNR FYKSLIDRGV NFSLDTIEKE LISFCLDTKG  
 KENRLCYYLK ATKDAATKIL SEVTRPMSVH MPAMKICEKL KKLDSQICEL  
 KYEKTLDLAS VDLRKMVAE LKQILHSWGE ECRACA EKTD YVNLIQELAP  
 KYAATHPKTE L (SEQ ID NO:1)

10 Secuencia de aminoácidos de CDNF con una secuencia señal:

MWCASPVAVV AFCAGLLVSH PVLTTQGEAG GRPGADCEVC KEFLNRFYKS LIDRGVNFSL  
 DTIEKELISF CLDTKGKENR LCYYLGATKD AATKILSEVT RPMSVHMPAM KICEKLKKLD  
 SQICELKYEK TLDLASVDLR KMRVAELKQI LHSWGEECRA CAEKTDYVNL IQELAPKYAA  
 THPKTEL (SEQ ID NO:2)

Secuencia de aminoácidos de MANF maduro:

LRPGDCEVCI SYLGRFYQDL KDRDVTFSPA TIENELIKFC REARGKENRL  
 CYYIGATDDA ATKIINEVSK PLAHHIPVEK ICEKLKKKDS QICELKYDKQ  
 IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK  
 AASARTDL (SEQ ID NO:3)

Secuencia de aminoácidos de MANF con una secuencia señal:

MWATQGLAVA LALSVLPGSR ALRPGDCEVC ISYLGRFYQD LKDRDVTFSP  
 ATIENELIKF CREARGKENR LCYYIGATDD AATKIINEVS KPLAHHIPVE  
 KICEKLKKKD SQICELKYDK QIDLSTVDLK KLRVKELKKI LDDWGETCKG  
 CAEKSDYIRK INELMPKYAP KAASARTDL (SEQ ID NO:4)

15

Tabla 2. Regiones cerebrales con una cantidad de señal significativa (% de ID por gramo de tejido) en escáneres dinámicos cerebrales PET después de la administración intranasal de <sup>124</sup>I-rhCDNF en macacos cynomolgus (n = 4; promedio de escáneres PET tomados inmediatamente después de la dosis).

Región cerebral	% de ID/g (promedio)	S.E.M.
Cerebro posterior	0,106%	0,0199
Cerebelo	0,093%	0,0071
Cerebro anterior	0,090%	0,0060
Cerebro medio	0,084%	0,0089
Putamen	0,083%	0,0093

## ES 2 789 723 T3

<b>Hipocampo</b>	0,082%	0,0117
<b>Ventriculos</b>	0,079%	0,0066
<b>Tálamo</b>	0,077%	0,0108
<b>Tracto de materia blanca</b>	0,076%	0,0038

## LISTADO DE CITAS

## Publicaciones de patentes

US6180603

US2012/027754

5 WO2007068803

WO2009133247

WO2012119153

WO2014066686

## Publicaciones que no son patentes

- 10 Airavaara, M. y cols., 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. Touminen. R. K. Saarma, M. Wang, Y., y B. Hoffer. 2012. CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. *Cell Transplant.* 2012; 21(6): 1213-23.
- 15 Alcalá-Barraza SR, Lee MS, Hanson LR, McDonald AA, Frey WH y 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 y 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 y 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 y cols. 2012. Intranasal delivery of growth differentiation factor 5 to the central nervous system. *Drug Deliv* 19(3): 149-154.
- 25 Hellman M, Arumäe 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.
- 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. Touminen, y M. Saarma. 2007. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons *in vivo*. *Nature.* 448: 73-77.
- Lindholm, P., y M. Saarma. 2010. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev. Neurobiol.* 70: 360-371.
- 30 Nadella R, Voutilainen MH, Saarma M, Gonzalez-Barríos JA, Leon-Chavez BA, Jiménez JM, Jiménez SH, Escobedo L, Martínez-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 y 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.
- 35 Shubber S, Vllasaliu D, Rauch C, Jordan F, Illum, L, y Stolnik, S. 2015. Mechanism of Mucosal Permeability Enhancement of CriticalSorb® (Solutol® 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 y Pikal, MJ. 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical Research* 21(2): 191-200.
- 40 Voutilainen, M.H., S. Back, J. Peranen, P. Lindholm, A. Raasmaja, P.T. Mannisto, M. Saarma, y R.K. Touminen. 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, y R.K. Touminen. 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.
- 45

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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Herantis Pharma plc

5 <120> Composiciones que comprenden CDNF o MANF para usar en el tratamiento intranasal de enfermedades del sistema nervioso central

<130> 53791

10 <150> FI 20155857  
<151> 18-11-2015

<160> 6

15 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1  
<211> 161  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 1  
Gln Glu Ala Gly Gly Arg Pro Gly Ala Asp Cys Glu Val Cys Lys Glu  
1 5 10 15  
Phe Leu Asn Arg Phe Tyr Lys Ser Leu Ile Asp Arg Gly Val Asn Phe  
20 25 30  
Ser Leu Asp Thr Ile Glu Lys Glu Leu Ile Ser Phe Cys Leu Asp Thr  
35 40 45  
Lys Gly Lys Glu Asn Arg Leu Cys Tyr Tyr Leu Gly Ala Thr Lys Asp  
50 55 60  
Ala Ala Thr Lys Ile Leu Ser Glu Val Thr Arg Pro Met Ser Val His  
65 70 75 80  
Met Pro Ala Met Lys Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Leu Asp Ser Gln  
85 90 95  
Ile Cys Glu Leu Lys Tyr Glu Lys Thr Leu Asp Leu Ala Ser Val Asp  
100 105 110  
Leu Arg Lys Met Arg Val Ala Glu Leu Lys Gln Ile Leu His Ser Trp  
115 120 125  
Gly Glu Glu Cys Arg Ala Cys Ala Glu Lys Thr Asp Tyr Val Asn Leu  
130 135 140  
Ile Gln Glu Leu Ala Pro Lys Tyr Ala Ala Thr His Pro Lys Thr Glu  
145 150 155 160  
Leu

25 <210> 2  
<211> 187  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 789 723 T3

<400> 2

Met Trp Cys Ala Ser Pro Val Ala Val Val Ala Phe Cys Ala Gly Leu  
1 5 10 15

Leu Val Ser His Pro Val Leu Thr Gln Gly Gln Glu Ala Gly Gly Arg  
20 25 30

Pro Gly Ala Asp Cys Glu Val Cys Lys Glu Phe Leu Asn Arg Phe Tyr  
35 40 45

Lys Ser Leu Ile Asp Arg Gly Val Asn Phe Ser Leu Asp Thr Ile Glu  
50 55 60

Lys Glu Leu Ile Ser Phe Cys Leu Asp Thr Lys Gly Lys Glu Asn Arg  
65 70 75 80

Leu Cys Tyr Tyr Leu Gly Ala Thr Lys Asp Ala Ala Thr Lys Ile Leu  
85 90 95

Ser Glu Val Thr Arg Pro Met Ser Val His Met Pro Ala Met Lys Ile  
100 105 110

Cys Glu Lys Leu Lys Lys Leu Asp Ser Gln Ile Cys Glu Leu Lys Tyr  
115 120 125

Glu Lys Thr Leu Asp Leu Ala Ser Val Asp Leu Arg Lys Met Arg Val  
130 135 140

Ala Glu Leu Lys Gln Ile Leu His Ser Trp Gly Glu Glu Cys Arg Ala  
145 150 155 160

Cys Ala Glu Lys Thr Asp Tyr Val Asn Leu Ile Gln Glu Leu Ala Pro  
165 170 175

Lys Tyr Ala Ala Thr His Pro Lys Thr Glu Leu  
180 185

<210> 3

5 <211> 158

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 789 723 T3

<400> 3

Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser Tyr Leu Gly Arg Phe  
1 5 10 15

Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe Ser Pro Ala Thr Ile  
20 25 30

Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala Arg Gly Lys Glu Asn  
35 40 45

Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp Ala Ala Thr Lys Ile  
50 55 60

Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His Ile Pro Val Glu Lys  
65 70 75 80

Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln Ile Cys Glu Leu Lys  
85 90 95

Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp Leu Lys Lys Leu Arg  
100 105 110

Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp Gly Glu Thr Cys Lys  
115 120 125

Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys Ile Asn Glu Leu Met  
130 135 140

Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala Ser Ala Arg Thr Asp Leu  
145 150 155

<210> 4

5 <211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Trp Ala Thr Gln Gly Leu Ala Val Ala Leu Ala Leu Ser Val Leu  
1 5 10 15

Pro Gly Ser Arg Ala Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser  
20 25 30

Tyr Leu Gly Arg Phe Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe  
35 40 45

10

ES 2 789 723 T3

Ser Pro Ala Thr Ile Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala  
50 55 60

Arg Gly Lys Glu Asn Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp  
65 70 75 80

Ala Ala Thr Lys Ile Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His  
85 90 95

Ile Pro Val Glu Lys Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln  
100 105 110

Ile Cys Glu Leu Lys Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp  
115 120 125

Leu Lys Lys Leu Arg Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp  
130 135 140

Gly Glu Thr Cys Lys Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys  
145 150 155 160

Ile Asn Glu Leu Met Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala Ser Ala Arg  
165 170 175

Thr Asp Leu

5 <210> 5  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 5  
Cys Lys Gly Cys  
1

15 <210> 6  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
Cys Arg Ala Cys  
1

20



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición para administración intranasal que comprende un polipéptido CDNF que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 o un fragmento funcional de este para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, en donde dicha enfermedad del sistema nervioso central se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, atrofia sistémica múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración lobar frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Huntington, daño traumático cerebral y accidente cerebrovascular.
- 15 3. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, en donde dicha enfermedad del sistema nervioso central es la enfermedad de Alzheimer.
4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, en donde dicha enfermedad del sistema nervioso central es la esclerosis lateral amiotrófica.
- 20 5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, en donde dicha enfermedad del sistema nervioso central es la enfermedad de Parkinson.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, en donde dicha enfermedad del sistema nervioso central es accidente cerebrovascular.
- 25 7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, en donde dicha composición es un líquido o un polvo.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7 para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, en donde dicha composición es un spray nasal líquido o gotas nasales.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8 para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, en donde dicha composición es un spray nasal líquido con un promotor de la absorción.
- 30 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 7 para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, en donde dicha composición es un polvo.
11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las anteriores reivindicaciones para usar en el tratamiento intranasal de una enfermedad del sistema nervioso central, en donde dicho polipéptido CDNF es el CDNF maduro que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1.

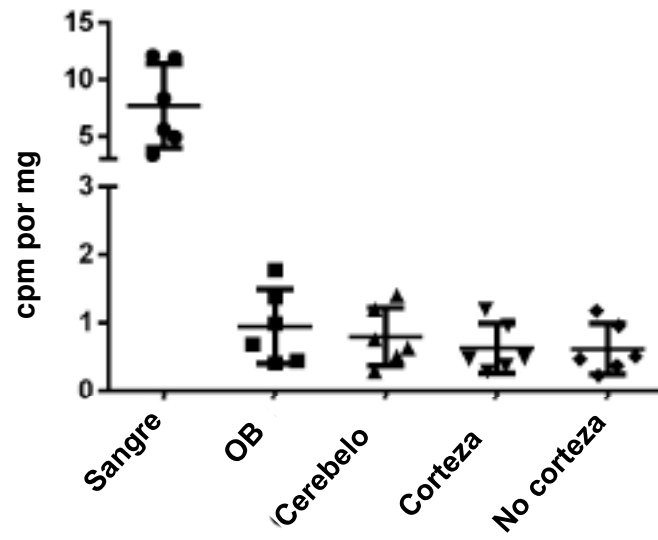


Figura 1

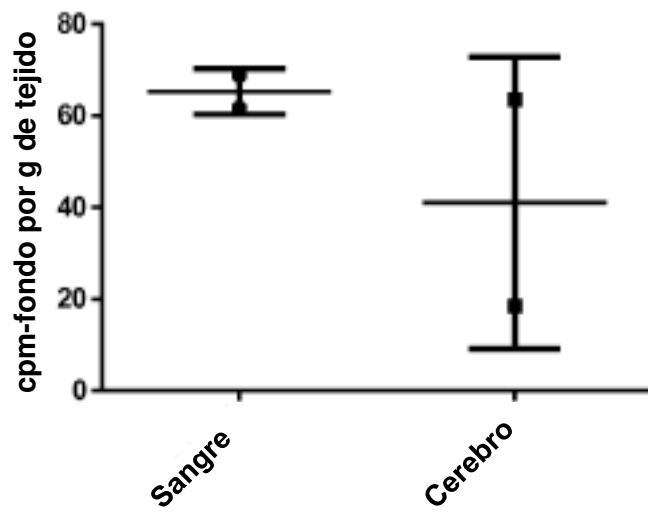


Figura 2

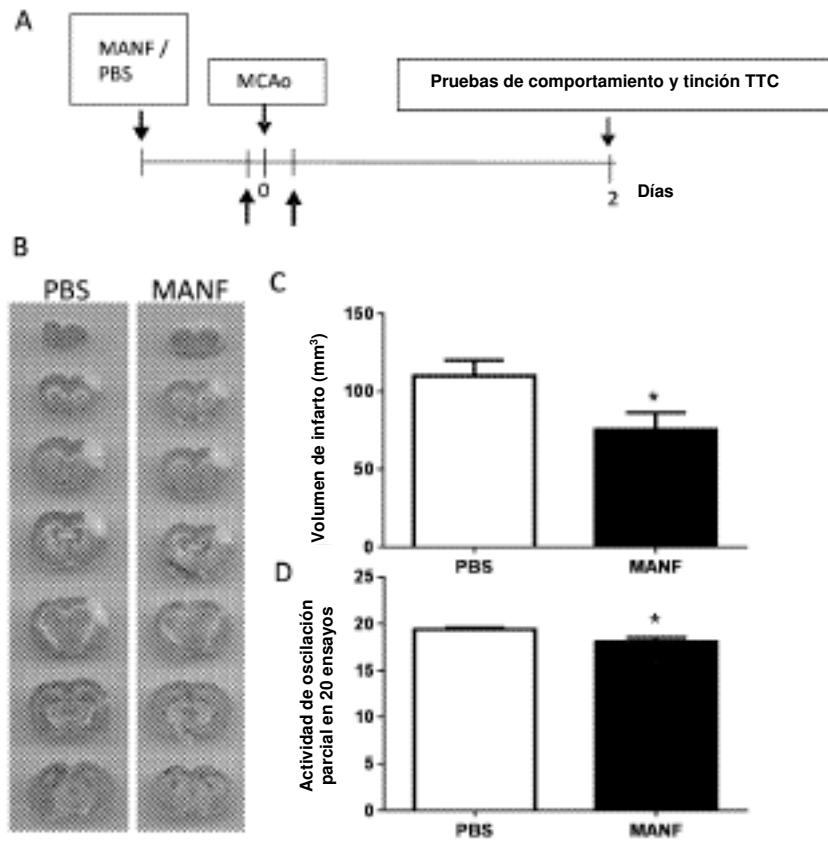


Figura 3

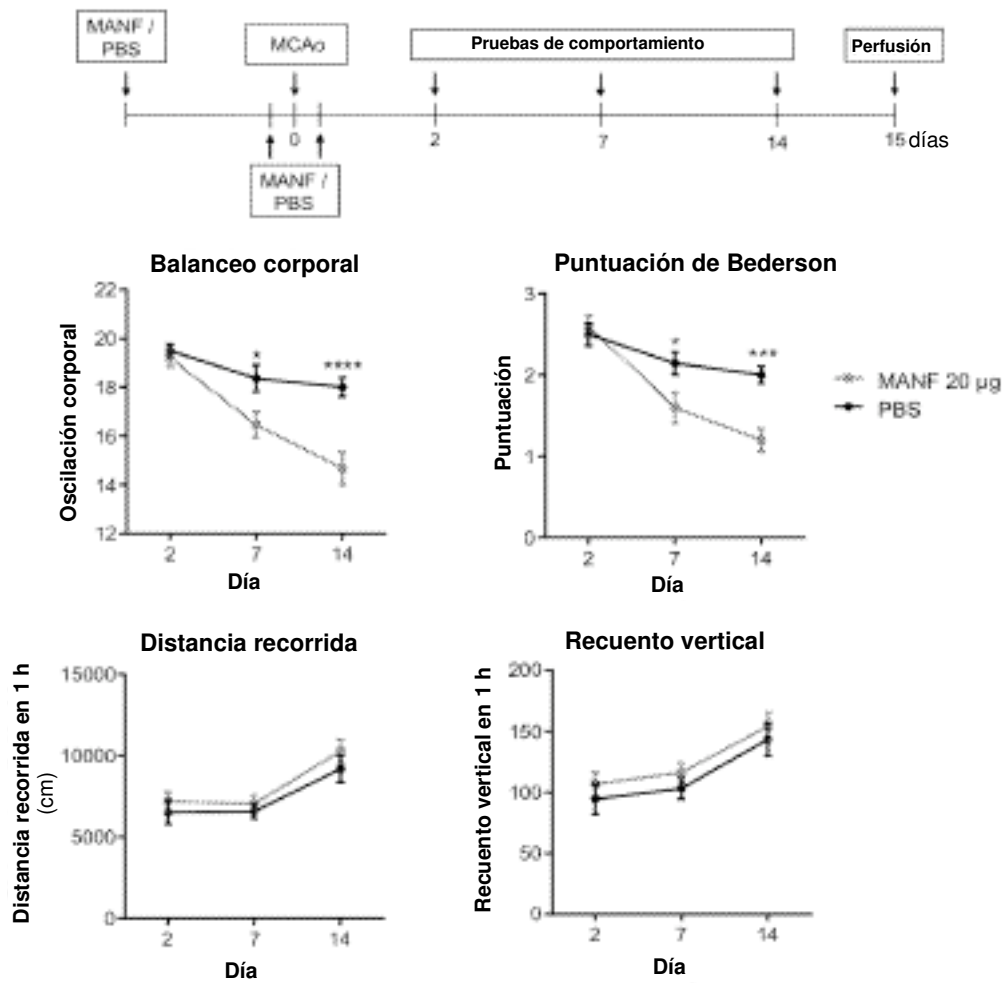
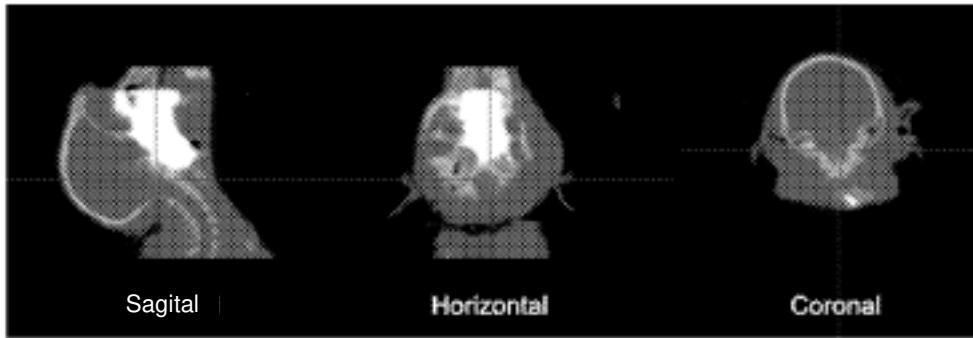


Figura 4



**Figura 5**

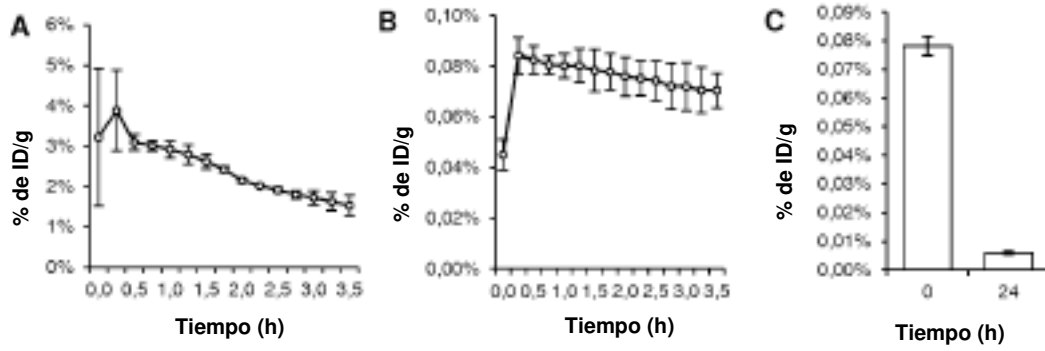
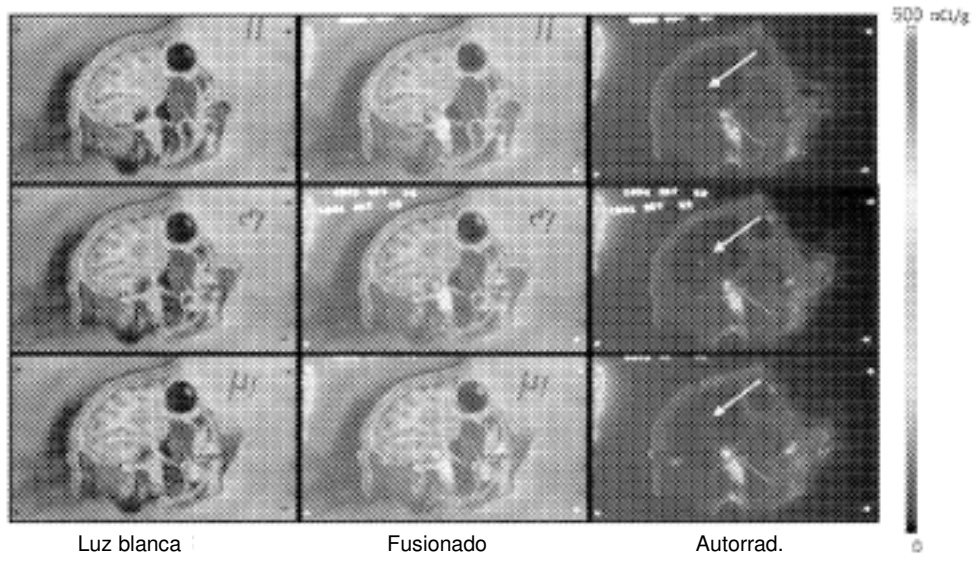


Figura 6



**Figura 7**



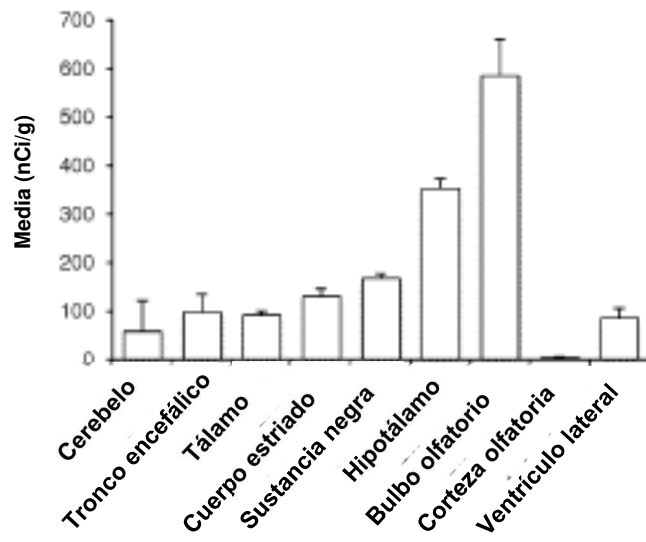


Figura 8