



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 284**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01) **A61K 31/20** (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) **A61P 25/00** (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01) **A61P 25/14** (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) **A61P 25/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04792173 .9**

96 Fecha de presentación : **01.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1685832**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **Promotores de regeneración de nervios.**

30 Prioridad: **03.10.2003 JP 2003-345123**
01.06.2004 JP 2004-162909

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2011

73 Titular/es: **ONO PHARMACEUTICAL Co., Ltd.**
1-5, Doshomachi 2-chome,
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8526, JP

72 Inventor/es: **Tateishi, Narito;**
Yamamoto, Junki;
Kawaharada, Soichi;
Akiyama, Tsutomu y
Hoshikawa, Masamitsu

74 Agente: **Miltenyi Null, Peter**

ES 2 367 284 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

Promotores de regeneración de nervios

Campo Técnico

5 **[0001]** La presente invención está relacionada con el uso del ácido (2R)-L-propilpentanoico o una sal del mismo para obtener células nerviosas y células nerviosas maduras.

Técnica Anterior

10 **[0002]** Desde hace tiempo se pensaba que las células nerviosas no se regeneraban. Sin embargo, desde que, aproximadamente en 1990, se produjo el cultivo de células madre nerviosas en condiciones no diferenciadas, resultó obvio que existen células madre que pueden diferenciarse en células nerviosas incluso en el cerebro adulto y que los nervios pueden regenerarse.

15 **[0003]** Las células madre nerviosas son células que tienen una capacidad de autorreplicación y también tienen capacidad multipotente de producir células nerviosas (neuronas) y células de soporte tales como astrocitos y oligodendrocitos. Normalmente, las células nerviosas se forman a partir de células madre nerviosas no diferenciadas mediante células precursoras nerviosas. También se sabe que las células madre embrionarias (células ES, del inglés *embryonic stem*), células de la médula ósea (células madre mieloides, etc.) y similares pueden diferenciarse en células nerviosas. Actualmente, en la técnica adelantada al tiempo, tal como en la técnica para regeneración de tejido óseo y cutáneo, es posible conseguir un objetivo hasta cierto grado por reaparición de las condiciones físicas intrínsecas en los tejidos. Sin embargo, para usar la regeneración nerviosa como una técnica médica, no es suficiente que las células nerviosas se formen solo físicamente sino que como maduran y como actúan las células nerviosas es un problema considerable.

20 **[0004]** Las enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral (ALS, siglas en inglés) y enfermedad de Huntington son enfermedades que se producen cuando la muerte de la célula nerviosa tiene lugar de una manera progresiva. Con respecto a un método para el tratamiento de dichas enfermedades neurodegenerativas, en la actualidad se ha realizado principalmente un tratamiento complementario en el que se complementa la deficiencia del neurotransmisor o se realiza un tratamiento sintomático. Sin embargo, en el tratamiento complementario o el tratamiento sintomático, el progreso de la degeneración de los nervios no puede suprimirse completamente ya que el síntoma avanza. Sin embargo se ha sabido que, incluso en dichas enfermedades, las células madre nerviosas endógenas existentes en el cerebro adulto se diferencian en células nerviosas. Por ejemplo, se ha descrito que, en animales de modelos isquémicos la degeneración nerviosa se produce a partir de células madre nerviosas (*J. Neurosci.*, 18, 7768-7778 (1998)).

25 **[0005]** En los últimos años, como objeto de tratamiento de estas enfermedades neurodegenerativas, se han realizado esfuerzos para activar las células madre nerviosas intrínsecas y para regenerar los tejidos nerviosos y funciones trastornados (*Nature Medicine*, 4, 1313-1317 (1998); *Nature Medicine*, 6, 271-277 (2000)). También se realizaron esfuerzos en los que se prepararon células madre nerviosas a partir de células madre embrionarias y de cerebros humanos malogrados o también de tejidos de un paciente como tal y la regeneración nerviosa se enfoca por medio de trasplante (*Nature*, 405, 951-955 (2000); *Eur. J. Neurosci.*, 10, 2026-2036 (1998)). Además, se ha observado un efecto para mejorar los síntomas mediante la administración de células madre procedentes de vasos sanguíneos periféricos no solamente en enfermedades neurodegenerativas sino también en enfermedades desmielinizantes (*Nature*, 422, 688-694 (2003)).

35 **[0006]** Mientras tanto, se ha descrito que derivados del ácido 2-propilpentanoico tienen una acción para mejorar la función de astrocitos y por consiguiente que son útiles como agente de tratamiento y/o agente preventivo para enfermedades neurodegenerativas, disfunción neuronal después de lesión cerebroespinal e ictus cerebral, tumor cerebral, enfermedades cerebroespinales acompañadas por enfermedades infecciosas y similares (por ejemplo, EP-A-0632008).

40 **[0007]** También se ha descrito que dichos derivados del ácido 2-propilpentanoico son útiles como agente de tratamiento y/o agente preventivo para la enfermedad o síndrome de Parkinson (por ejemplo, en el documento EP-A-1174131).

45 **[0008]** Adicionalmente, se han descrito acciones de dichos derivados del ácido 2-propilpentanoico que se deben a una acción para mejorar la función de astrocitos anómalamente activados causados por la acción de disminución del contenido de S100 β intracelular (por ejemplo, Tateishi, N. y ocho más, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22, 723-734 (2002)).

50 **[0009]** También se ha descrito que, en rata madura cuando el axón del nervio ciático se corta, el axón se alarga y la función cinética se recupera cuando se administra ácido 2-propilpentanoico (por ejemplo, Xia Zhang y seis más, *Brian Research*, 975, 229-236 (2003)).

55 **[0010]** Sin embargo, en estas reseñas bibliográficas, no se describe que los derivados del ácido 2-propilpentanoico

aceleren el crecimiento y la diferenciación de las células madre nerviosas y células precursoras nerviosas y no existen referencias de que tengan ninguna acción de inducción de células nerviosas a partir de células no nerviosas tales como células gliales. Adicionalmente, no existe ninguna descripción ni sugerencia alguna de un método en el que los derivados del ácido 2-propilpentanoico se usen para la preparación celular de células nerviosas para trasplante.

5 **[0011]** A pesar del hecho de que las enfermedades neurodegenerativas representadas por la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad del Parkinson son enfermedades graves producidas por falta de nervios, aún no se ha encontrado ningún método eficaz para el tratamiento de las enfermedades que no sea sintomático. Por ejemplo, si en una enfermedad neurodegenerativa se realizase un solo corte de axón, como se muestra en modelos animales mencionados en el documento anterior (Xia Zhang y seis más, *Brian Research*, 975, 229-236 (2003)), existe una
10 posibilidad de que pueda usarse la administración del ácido 2-propilpentanoico como un método de tratamiento eficaz. Sin embargo, enfermedad neurodegenerativa es un nombre genérico de enfermedades en las que no sólo muere gradualmente el axón sino la propia célula nerviosa y aún no se ha descubierto ningún método específico para el tratamiento. Además, aún no se ha descubierto ninguna técnica para la inducción de células madre transplantadas o células madre endógenas que actúen realmente como células nerviosas en el trasplante de células madre o en la
15 activación de células madre endógenas que puedan usarse como un método de tratamiento eficaz para enfermedades neurodegenerativas en un futuro cercano.

[0012] A la vista de estos problemas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como tales, hasta ahora ha existido una enérgica necesidad en los campos médicos actuales para el desarrollo de compuestos que sean útiles como medicamentos tales como agentes preventivos y agentes de tratamiento para enfermedades neurodegenerativas.

20 **[0013]** El documento WO 02/102989 A describe un método para diferenciar una célula madre nerviosa en una célula neuronal tal como un neuroblasto o neuro *in vivo* o *in vitro*. Particularmente, el documento explica un método para la diferenciación de células madre neurales poniendo en contacto la célula madre nerviosa con un compuesto valproato o análogo del mismo.

25 **[0014]** El documento WO 01/39779 A describe el uso de (S)-(-)-alfa-etil-2-oxo-1-pirrolidin acetamida para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos del SNC y nuevas composiciones farmacéuticas que comprenden (S)-(-)-alfa-etil-2-oxo-1-pirrolidin acetamida.

30 **[0015]** El documento JP-A-7 316 092 describe derivados del ácido pentanoico, la producción de los mismos y medicamentos que contienen dichos derivados del ácido pentanoico. El propósito es producir el compuesto objeto que tenga un efecto de mejora sobre la función del astrocito, una toxicidad notablemente reducida y que sea útil para la terapia de una neuropatía tal como enfermedad de Alzheimer.

[0016] El documento JP 2002 097158 A describe agentes terapéuticos, especialmente el ácido (R)-2-propiloctanoico y su sal no tóxica, para la enfermedad del Parkinson que incluye un agente de mejora sobre la función del astrocito.

[0017] El documento Cell, volumen 97, publicación 6, 703-716, 11 de junio 1999 describe que los astrocitos de la zona subventricular son células madre nerviosas en el cerebro de mamífero adulto.

35 **[0018]** El documento JP 2002 308779 A describe agentes para promover la propagación, diferenciación y/o supervivencia de células gliales, que contienen ácido fosfatídico cíclico.

[0019] El documento JP-A-9 263 543 describe un promotor de diferenciación peptídico para un oligodendrocito que comprende un péptido como un ingrediente activo y que es útil para la prevención y tratamiento de trastornos de mielinización y enfermedades desmielinizantes.

40 **[0020]** El documento JP-A-9 238 685 describe un gen relacionado con isquemia cerebral que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos específica, para inducir en astrocitos cuando se exponen a un estado hipóxico tal como reperfusión isquémica cerebral seguido de exposición a oxígeno de nuevo, siendo por lo tanto útil para prevenir/tratar enfermedades isquémicas cerebrales.

Descripción de la Invención

45 **[0021]** Cuando se tienen en cuenta las causas de enfermedades neurodegenerativas y particularmente de las propias células nerviosas, se supone que son útiles los compuestos que tienen (1) acción de tipo factor neurotrófico, (2) acción para potenciar la actividad del factor neurotrófico, (3) acción de neogénesis de células nerviosas después de degeneración nerviosa y (4) acción aceleradora para la regeneración de células nerviosas después de degeneración nerviosa (por ejemplo, (a) compuestos con neogénesis, crecimiento y diferenciación acelerada de células madre
50 nerviosas y células nerviosas precursoras, (b) compuestos con injertación, diferenciación y crecimiento de células transplantadas acelerado cuando se trasplantan células madre nerviosas, células precursoras nerviosas o células nerviosas o (3) compuestos con maduración acelerada de células nerviosas, etc.). Se cree que los compuestos que cumplen estos requisitos suprimen la muerte de las células nerviosas en enfermedades neurodegenerativas y aceleran la regeneración nerviosa de células transplantadas o endógenas incluso después de producirse la muerte de las células
55 nerviosas y por consiguiente que el síntoma de la enfermedad mejora. Por lo tanto, los autores de la invención han realizado intensas investigaciones para descubrir los compuestos que cumplen los requisitos anteriores y, como

resultado, han descubierto que el compuesto de ácido graso, de acuerdo con la presente invención, o una sal del mismo o un profármaco del mismo (en lo sucesivo este documento denominado en ciertas ocasiones el compuesto de la presente invención) es un excelente compuesto que satisface los requisitos con lo cual se consigue la presente invención.

5 **[0022]** Los autores de la invención también han realizado intensas investigaciones en búsqueda de una acción acelerada de la regeneración nerviosa mediante el compuesto de la presente invención y han observado que el compuesto de la presente invención no solamente tiene una acción de aceleración del crecimiento y diferenciación de células madre y células precursoras nerviosas sino que realmente también tiene una excelente acción acelerando la diferenciación de las células gliales, tales como astrocitos, con respecto a las células nerviosas con lo cual han conseguido la presente invención. Por otro lado, en el documento de patente indicado anteriormente (EP-A-0632008), se describe que el compuesto derivado del ácido 2-propilpentanoico tiene una acción de mejora de la función de astrocitos e inhibe la inducción de astrocitos para astrocitos reactivos pero no se describe ni se sugiere en modo alguno que el compuesto tenga una acción de inducción de la diferenciación de astrocitos con respecto a las células nerviosas con lo cual la presente invención no es bastante evidente a partir del documento de patente mencionado anteriormente.

15 **[0023]** Por lo tanto, la presente invención está relacionada con lo siguiente:

1. El uso del ácido (2R)-2-propiloctanoico o una sal del mismo para obtener células nerviosas y células nerviosas maduras por diferenciación de células gliales o células precursoras gliales, en el que el ácido (2R)-2-propiloctanoico o una sal del mismo es un agente aditivo para el cultivo *in vitro* de células gliales o de células precursoras gliales.

2. El uso de acuerdo con el punto 1, en el que las células gliales son astrocitos.

20 **[0024]** La “regeneración nerviosa” como se usa en la presente invención incluye “neogénesis nerviosa” y “regeneración nerviosa” que son expresiones usadas en la técnica pertinente. Por tanto, cuando las células nerviosas y/o las células nerviosas maduras aumentan en el organismo vivo o en el medio, en el caso de administrar el compuesto de la presente invención al organismo vivo o añadirse al medio para el cultivo celular, todas ellas se incluyen en la regeneración nerviosa usada en la presente invención.

25 **[0025]** En la presente invención, la regeneración nerviosa puede clasificarse en regeneración nerviosa cualitativa y regeneración nerviosa cuantitativa. La regeneración nerviosa cuantitativa significa aumento del número de células nerviosas y la regeneración nerviosa cualitativa significa aumento de células nerviosas maduras. En este documento, las células nerviosas maduras significa células nerviosas que están maduras o, en otras palabras, células nerviosas que se han desarrollado hasta un estado en el que es posible la acción funcional tal como envío y recepción de recepción de señales. La regeneración nerviosa como tal puede producirse *in vivo* o *in vitro* y, particularmente en cuanto a regeneración nerviosa *in vivo*, la regeneración nerviosa cuantitativa *in vivo* y la regeneración cualitativa *in vivo* pueden denominarse, por ejemplo, “regeneración del tejido nervioso” y “regeneración de la función nerviosa”, respectivamente.

30 **[0026]** En la presente invención, la regeneración nerviosa también incluye lo que significa que reaparece un procedimiento de desarrollo normal en nervios al menos parcialmente además de lo que significa el aumento indicado anteriormente de las células nerviosas y/o células nerviosas maduras. Por tanto, cuando se induce cualquiera de los procedimientos de injertación, diferenciación, crecimiento y/o maduración de células que finalmente se convierten en células nerviosas o células nerviosas maduras, o se sabe que se convierten en eso, (en lo sucesivo en este documento, denominadas células para regeneración), todos ellos se incluyen en regeneración nerviosa de acuerdo con la presente invención. No es preciso indicar que el procedimiento como tal puede tener lugar tanto *in vivo* como *in vitro*.

40 **[0027]** En la presente invención, la regeneración nerviosa no se limita al tipo y a la fuente de las células para regeneración. Los ejemplos de células para regeneración incluyen células madre (tales como células madre nerviosas, células madre embrionarias y células de la médula ósea), células precursoras nerviosas y células nerviosas. Estas células puede ser células endógenas o exógenas (por ejemplo células transplantadas). Al igual que las células exógenas, también es posible usar células nerviosas maduras. Las células exógenas pueden ser células autólogas o células heterólogas. Además, incluso en el caso de las células que son más indiferenciadas que las células madre nerviosas, todas ellas se incluyen en la regeneración nerviosa de acuerdo con la presente invención, siempre y cuando se diferencien mediante células madre nerviosas. Adicionalmente, incluso en el caso de células en las que la etapa de diferenciación se realiza a partir de células madre nerviosas en dirección distinta a la de las células nerviosas (por ejemplo, células gliales (por ejemplo, astrocitos, oligodendrocitos, microglia, células ependimales, etc.), células precursoras gliales y similares) todas ellas se incluyen en la regeneración nerviosa de acuerdo con la presente invención, siempre y cuando se diferencien en células nerviosas y/o en células nerviosas maduras.

45 **[0028]** En la presente invención, la regeneración nerviosa puede ser basándose en cualquier mecanismo. Por ejemplo, puede ser una basándose en una acción de tipo factor neurotrófico o acción de potenciación para la actividad del factor neurotrófico. En este documento, el factor neurotrófico significa, por ejemplo, factores que actúan como nutrición para las células madre nerviosas, células precursoras nerviosas, células nerviosas maduras y similares. Con respecto al factor neurotrófico, ya se conocían proteínas tales como NGF (factor de crecimiento nervioso), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y factor de crecimiento de tipo insulina. La acción de tipo factor neurotrófico puede ser una acción de los factores neurotróficos y los ejemplos incluyen acción de alargamiento del axón, acción de aceleración

de síntesis para neurotransmisores, acción de aceleración para la diferenciación y crecimiento de células nerviosas, acción como nutrientes para el mantenimiento de la actividad de las células nerviosas, acción de la formación de sinapsis y acción de protección de las células nerviosas siempre que no sea limitativa. La acción de potenciación para la actividad del factor neurotrófico significa la actividad que potencia la acción mediante el factor neurotrófico anterior.

5 **[0029]** Las células madre nerviosas, células precursoras nerviosas, células nerviosas y similares para el trasplante que se extraen del organismo vivo pueden desarrollarse y/o diferenciarse en células que son mucho más diferenciadas. Para ser más específicos, las células madre nerviosas pueden desarrollarse y/o diferenciarse en células precursoras nerviosas, células nerviosas, células nerviosas maduras, células nerviosas funcionales y similares; las células precursoras nerviosas pueden desarrollarse y/o diferenciarse en células nerviosas, células nerviosas maduras, células nerviosas funcionales y similares; y las células nerviosas pueden desarrollarse y/o diferenciarse en células nerviosas maduras, células nerviosas funcionales y similares. Aunque la identificación de estas células puede realizarse por un método conocido, se prefiere, por ejemplo, que la detección se realice usando proteína, ARNm y similar que estas células expresan característicamente diferenciando cada etapa como un índice. Con respecto a dichos índices, para las células madre nerviosas puede usarse nestina y similar; para las células precursoras nerviosas puede usarse PSA-NCAM, doblecortina y similar; para células nerviosas puede usarse β III-tubulina (Tuj1) y similar; para células nerviosas maduras puede usarse MAP 2, NeuN, NSE y similar y para las células nerviosas funcionales puede usarse GABA y similar. Por otro lado, en la presente memoria descriptiva, las células nerviosas y una parte de las células precursoras nerviosas pueden denominarse células nerviosas inmaduras con un sentido de células nerviosas no maduras.

20 **[0030]** Un método de cultivo de células para trasplante en la presente invención se caracteriza añadiendo el compuesto de la presente invención a un medio y, por lo tanto, puede usarse la técnica conocida para condiciones de cultivo tales como un medio básico y otros aditivos. Con respecto a condiciones de cultivo específicas, se ilustran métodos que se mencionarán en los Ejemplos.

25 **[0031]** Con respecto a un método para el cultivo de células para trasplante en la presente invención, puede usarse aquel en el que el compuesto de la presente invención se pone en contacto con las células para trasplante en cualquiera de las etapas durante el periodo de cultivo y no está limitado en función del hecho en el que el tiempo de contacto sea más largo o más corto.

30 **[0032]** El método para el cultivo de células para trasplante en la presente invención también puede proporcionar excelentes efectos combinando con otra técnica conocida. Por ejemplo, se conoce un método en el que se aplica estimulación eléctrica y otra estimulación física o química y similar a células madre embrionarias y similar para preparar una gran cantidad de células madre nerviosas y es posible que el compuesto de la presente invención se añada como un aditivo en el cultivo durante, antes o después de la estimulación.

35 **[0033]** La sal del compuesto de la presente invención incluye todas las sales que son farmacéuticamente aceptables. Se prefieren sales hidrosolubles y no tóxicas como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales adecuadas, por ejemplo, incluyen sales de metales alcalinos (por ejemplo potasio, sodio, litio, *etc.*), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo calcio, magnesio, *etc.*), sales de amonio (por ejemplo sal de tetrametilamonio, *etc.*), sales de aminas orgánicas (por ejemplo trietilamina, metilamina, dimetilamina, ciclopentilamina, bencilamina, fenetilamina, piperidina, monoetanolamina, dietanolamina, tris(hidroximetil)metilamina, lisina, arginina, N-metil-D-glucamina, *etc.*), sales de adición de ácidos (por ejemplo, sales de ácidos inorgánicos (tales como hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, fosfato y nitrato), sales de ácidos orgánicos (tales como acetato, trifluoroacetato, lactato, tartrato, oxalato, fumarato, maleato, benzoato, citrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, isotionato, glucuronato y gluconato), *etc.*), y similares. Las sales de los compuestos de la presente invención incluyen solvatos y solvatos de las sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, sales de amonio, sales de aminas orgánicas y sales de adición de ácidos descritas anteriormente. Los solvatos son preferiblemente no tóxicos e hidrosolubles. Los solvatos adecuados incluyen, por ejemplo, solvatos de agua, disolventes de alcohol (por ejemplo, etanol, *etc.*) y similares. Los compuestos de la presente invención pueden convertirse en sales farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales.

[0034] En la presente invención se emplea el ácido (2R)-2-propiloctanoico o una sal del mismo.

Procedimientos para la preparación del compuesto de la presente invención:

50 **[0035]** El compuesto de la presente invención se conoce como tal o puede prepararse mediante un procedimiento conocido (en el caso del compuesto representado por la fórmula (I), por ejemplo, mediante los procedimientos mencionados en los documentos EP-A-0632008, WO 99/58513, WO 00/48982, WO 03/051852, WO 03/097851, *etc.*) tal como un procedimiento mencionado en *Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations*, 2ª Edición (Richard C. Larock, John Wiley & Sons Inc., 1999) o mediante una combinación apropiada del procedimiento como tal.

55 Toxicidad:

[0036] La toxicidad del compuesto de la presente invención es suficientemente baja y se ha confirmado que es suficientemente inocua para su uso como un medicamento. Por ejemplo, en perros, usando una sola administración intravascular de ácido (2R)-2-propiloctanoico a 100 mg/kg, no se observaron casos de mortalidad.

Aplicación para medicamentos:

[0037] En animales, incluyendo seres humanos y particularmente seres humanos, el compuesto de la presente invención elimina la mortalidad de las células nerviosas como una sustancia para la aceleración de injerto, diferenciación, crecimiento y/o maduración de células madre, células precursoras nerviosas o células nerviosas o como un potenciador para la actividad del factor neurotrófico, sustancias de tipo factor neurotrófico o supresor neurodegenerativo y acelera la reparación y regeneración de los tejidos nerviosos mediante neogénesis, regeneración y/o evolución axonal. Además, el compuesto de la presente invención es útil para la preparación de tejidos cerebrales, médula ósea y/o células madre o células madre embrionarias de células para trasplante (por ejemplo células madre nerviosas, células precursoras nerviosas, células nerviosas, *etc.*) y también acelera el injerto, crecimiento, diferenciación y/o maduración de células para trasplante (por ejemplo células madre nerviosas, células precursoras nerviosas, células nerviosas, *etc.*) por lo cual es útil para la prevención, tratamiento y/o eliminación del avance de enfermedades neurodegenerativas. Para ser más específico, este es útil para la prevención, tratamiento y/o eliminación del avance de, por ejemplo, enfermedad o síndrome de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Down, esclerosis amiotrófica lateral, esclerosis amiotrófica lateral familiar, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelar, atrofia dentatorubral-palidolusiana, atrofia olivopontocerebelosa, desnaturalización del núcleo basal cortical, demencia familiar, demencia frontotemporal, demencia senil, enfermedad difusa de cuerpos de Lewy, degeneración nigroestriada, corea, atetosis, distonía, síndrome de Meige, atrofia cerebelosa cortical tardía, paraplejia espástica familiar, cinesioneurosis, enfermedad de McArdle-Joseph, enfermedad de Pick, ictus o accidente cerebrovascular (por ejemplo, infarto cerebral después de hemorragia cerebral o hemorragia subaracnoide o después de trombo cerebral o embolización, trastorno de la función nerviosa después de infarto cerebral, *etc.*), trastorno de la función nerviosa después de lesión de médula ósea cerebral, trastorno de la función nerviosa por toxinas (por ejemplo, arsénico, cadmio, mercurio orgánico, *etc.*), gas tóxico (por ejemplo, sarina, soman, tabun, gas VX, *etc.*), radioactividad o similar, enfermedades desmielinizantes (por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, meningitis cerebroespinal diseminada aguda, cerebelitis aguda, mielopatía transversal, *etc.*), tumor cerebral (por ejemplo, sarcoma astrocítico, *etc.*), enfermedades cerebroespinales acompañadas por enfermedades infecciosas (por ejemplo, meningitis, absceso cerebral, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia por SIDA (VIH), *etc.*), enfermedades psicóticas (por ejemplo esquizofrenia, dolencias depresivas maníacas, neurosis, trastornos psicosomáticos, *etc.*), trastornos del sueño (por ejemplo, narcolepsia, hipersomnia primaria, hipersomnia recurrente, hipersomnia idiopática, insomnio, *etc.*), epilepsia y similares.

[0038] Adicionalmente, como se ha mencionado anteriormente, el compuesto de la presente invención también es útil para la preparación, a partir del organismo vivo, de tejidos tales como cerebrales, células madre de la médula ósea y/o embrionarias y puede usarse como un aditivo para cultivo *in vitro* o, preferiblemente, como un acelerador para el crecimiento y diferenciación de células madre nerviosas para trasplante, células precursoras nerviosas para trasplante, células nerviosas para trasplante, células nerviosas maduras para trasplante o similares. En este documento, el trasplante no se limita al trasplante autólogo sino que también puede aceptarse el trasplante heterólogo. Con respecto a células para trasplante, las células madre nerviosas y las células precursoras nerviosas son las preferidas.

[0039] Adicionalmente, el compuesto de la presente invención actúa sobre células en las que la etapa de diferenciación está más avanzada que la de las células madre nerviosas o particularmente sobre células gliales (tales como astrocitos, oligodendrocitos, microglia y células ependimales) o células precursoras gliales y pueden diferenciarse en células nerviosas y adicionalmente en células nerviosas maduras. Con respecto al mecanismo de diferenciación de estas células en células nerviosas y células nerviosas maduras, cualquier mecanismo es válido y este ejemplo es un mecanismo por el cual las células gliales o células precursoras gliales como tal se convierten en células madre nerviosas o células precursoras nerviosas por medio de, por ejemplo, inmaduración y después diferenciación y crecimiento en células nerviosas o células nerviosas maduras.

[0040] Durante el uso del compuesto de la presente invención para el objeto mencionado anteriormente, en células de cultivo, el tratamiento se realiza por adición a un líquido de cultivo o directamente por inyección en las células.

[0040] En el caso de células cultivadas, este se añade a un líquido de cultivo dentro de un intervalo de 1 pmol/l a 100 mmol/l o directamente se inyecta en las células dentro de un intervalo de 0,1 fmol/l a 10 μ mol/l (tal como microinyección).

[0041] Por supuesto, como se ha mencionado anteriormente, la dosis para el tratamiento varía dependiendo de diversas afecciones y, por lo tanto, existen determinados casos en los que es suficiente menos dosis que la dosis del tratamiento mencionada anteriormente o existen determinados casos en los que debe tratarse con más dosis que la indicada en intervalo anterior.

Efectos de la Invención

[0042] Debido a que el compuesto de la presente invención se emplea como un aditivo para cultivo en la preparación de células nerviosas para el trasplante *in vitro* para preparar con ello células nerviosas de manera eficiente, se puede utilizar para la preparación de células que tengan un uso farmacéutico. También es posible que las células trasplantadas se cultiven y se diferencien y se desarrollen apropiadamente en presencia del compuesto de la presente invención *in vitro* y después se trasplanten en el organismo vivo. Además, dado que las células nerviosas y las células nerviosas maduras

pueden prepararse incluso a partir de células no nerviosas tales como células gliales, de acuerdo con la presente invención, estas células pueden prepararse en grandes cantidades. Adicionalmente, en la presente invención, pueden prepararse grandes cantidades de células nerviosas y de células nerviosas maduras a partir de una de las propias células o a partir de materiales celulares en una pequeña cantidad recogidas del propio cuerpo y, por lo tanto, no existen problemas éticos.

Breve Descripción de los Dibujos

[0043] La Figura 1 muestra cambios en cuanto al número de células nerviosas pétreas vivas en un modelo de rata de cuatro venas unidas (4VO) en el que se administra ácido (2R)-2-propiloctanoico.

[0044] La Figura 2 muestra microfotografías que muestran los cambios en cuanto al número de células positivas a β III-tubulina en un ensayo de diferenciación de células madre derivadas de cerebro fetal de rata incubadas durante 7 días en un medio DMEM/F12 que comprende suero bovino fetal al 1% (fabricado por Daiippon Pharmaceutical) (grupo sin compuesto añadido) y un medio que comprende ácido (2R)-2-propiloctanoico (grupo con compuesto añadido).

Mejor modo de realizar la invención

[0045] A continuación la presente invención se ilustrará con detalle por medio de los siguientes ejemplos, sin embargo, la presente invención no se limita a ello.

[0046] El hecho de que el compuesto de la presente invención tenga un efecto regenerador en los nervios y un efecto de mejora para la patología se demostró mediante los siguientes experimentos. Con respecto a un método de medición para evaluar el compuesto de la presente invención, se realizó la siguiente mejora con objeto de mejorar la precisión de medición y/o la sensibilidad de medición. De acuerdo con este documento, se mostrarán métodos experimentales detallados.

Ejemplo 1 (Referencia)

Investigación del efecto *in vivo* sobre la diferenciación de células madre nerviosas.

1-A: Evaluación por observación histológica

1-A-1: Preparación de un modelo de rata de cuatro venas unidas (4VO)

[0047] Se preparó un modelo de rata de cuatro venas unidas (4VO) mediante un método parcialmente modificado por Prusiner, et al. (*J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 16, 973-980 (1979)). De tal manera que arterias vertebrales de ambos lados de una rata macho de la cepa Wistar se obstruyeron permanentemente y, al día siguiente, se expuso toda la arteria carótida y se obstruyó temporalmente durante 10 minutos usando una pequeña pinza. Se advirtió que las ratas no respondían inmediatamente después de la obstrucción de toda la arteria carótida en ambos lados y que la respuesta orientada hacia delante desaparecía cuando se usó para el experimento.

1-A-2: Evaluación de la acción de regeneración de nervios

1-A-2-1: Evaluación por tinción de Nissl

[0048] Se realizó una evaluación de regeneración de células nerviosas preparando una muestra de tejido cerebral por tinción de Nissl y se realizó un recuento del número de células nerviosas en las regiones derecha e izquierda CA1 del hipocampo. Se realizó la administración del medio (Tween 80 al 0,1% de vol) y un compuesto de ensayo (10 mg/kg) mediante una administración oral forzada una vez al día durante 40 días desde el 8º día después del tratamiento 4VO en el que se observó una muerte retrasada de las células nerviosas pétreas de la región CA1 del hipocampo.

Resultado:

[0049] El resultado fue que, en comparación con el grupo normal, el número de células nerviosas pétreas existentes en la región CA1 del hipocampo disminuyó significativamente en un grupo tratado con un medio sometido a isquemia cerebral anterior durante 10 minutos.

[0050] Por ejemplo, en la Figura 1 se muestra el resultado cuando se usó ácido (2R)-2-propiloctanoico como un compuesto de ensayo.

1-A-2-2: Evaluación de BrdU y NeuN por una doble inmunotinción.

[0051] La confirmación del hecho de que las células nerviosas pétreas aumentadas en el Ejemplo 1-A-2-1 eran células nerviosas regeneradas se realizó preparando una muestra de tejido cerebral inmunoteñida con BrdU y NeuN y realizando el recuento del número de células nerviosas que eran positivas a tinción doble en las regiones derecha e izquierda CA1 del hipocampo. A propósito, se usó anticuerpo anti-NeuN con objeto de detectar células nerviosas maduras mientras que se usó anticuerpo BrdU y anti-BrdU con objeto de detectar células recién formadas. La administración del medio (Tween 80 al 0,5% de vol) y del compuesto de ensayo (10 mg/kg) se realizó de la misma

manera a la indicada anteriormente. La administración de BrdU se realizó por administración intraperitoneal (50 mg/kg) una vez al día durante el periodo inmediatamente después de la reperusión en sangre en el tratamiento 4VO hasta la excisión del tejido. El número de células nerviosas que resultaron positivas a la doble tinción se calculó como número por longitud unitaria (mm) usando una longitud de capa de células nerviosas de la región CA1 del hipocampo y número de células nerviosas que resultaron positivas a la doble tinción.

Resultados:

[0052] El resultado fue que, en comparación con un grupo al cual se administró medio, hubo un aumento significativo de células existentes en la región CA1 del hipocampo que resultaron positivas a la doble tinción por el anticuerpo anti-BrdU y el anticuerpo anti-NeuN en un grupo al cual se administró el compuesto.

[0053] Por ejemplo, hubo $2,5 \pm 0,7$ células que resultaron positivas a la doble tinción por mm en un grupo ($n = 13$) tratado con un medio, mientras que en un grupo ($n = 13$) al cual se añadió el compuesto del ensayo, hubo $5,7 \pm 1,2$ células/mm ($p = 0,0322$; ensayo t) cuando se usó ácido (2R)-2-propiloctanoico como un compuesto de ensayo.

1-B: Evaluación mediante un ensayo farmacológico conductual

1-B-1: Preparación de un modelo de rata de cuatro venas unidas (4VO) y administración del medicamento.

[0054] Se preparó un modelo de rata de cuatro venas unidas (4VO) de acuerdo con un método mencionado en el Ejemplo 1-A-1 y se sometió al siguiente ensayo. A propósito, se realizó la administración de un medio (Tween 80 al 0,1% de vol) y de un compuesto de ensayo (ácido (2R)-2-propiloctanoico; 1, 3, 10 mg/kg) mediante una administración oral repetida forzada de cinco días a la semana 8 días después del tratamiento 4VO en el que las células nerviosas pétreas de la región CA1 del hipocampo mostraron ciertamente un retraso en la muerte de células nerviosas 48 días después. En la siguiente Tabla 1 se muestran los grupos constituidos.

Tabla 1

Grupos	tratamiento 4VO	Tratamiento con agente	Número de casos
Grupo normal	No tratado	Medio	18
Grupo de control	Tratado	Medio	20
Grupo de 1 mg/kg	Tratado	Ácido (2R)-2-propiloctanoico, 1 mg/kg, administración oral	22
Grupo de 3 mg/kg	Tratado	Ácido (2R)-2-propiloctanoico, 3 mg/kg, administración oral	22
Grupo de 10 mg/kg	Tratado	Ácido (2R)-2-propiloctanoico, 10 mg/kg, administración oral	20

1-B-2: Evaluación en ensayo de aprendizaje del laberinto de agua

[0055] En el ensayo de aprendizaje del laberinto de agua, se usó una piscina circular negra (fabricada por Neuroscience) de 150 cm diámetro y 50 cm de altura. La piscina se llenó con agua corriente a aproximadamente 23°C hasta una altura de aproximadamente 30 cm (la superficie de la plataforma tenía aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie del agua). La plataforma (fabricada de acrilato incoloro y transparente de forma circular tenía 10 cm de diámetro) que iba a ser un objetivo se colocó a una distancia de aproximadamente 35 cm desde la pared interna de la piscina. Durante el periodo del ensayo, la posición de las cosas que eran indicios de reconocimiento de espacio tal como rejillas, instrumentos de iluminación y personal que realizaba los experimentos fueron constantes y el nivel de iluminación también se mantuvo constante.

[0056] Al tercer día de completar las administraciones repetitivas se dejó que las ratas permaneciesen en una posición de inicio y se midió el tiempo hasta el cual treparon hasta la plataforma (tiempo de espera de escape (segundos)). El tiempo de nado máximo para trepar hasta la plataforma fue de 90 segundos y, cuando una rata trepó hasta la plataforma, se dejó que permaneciese ahí durante aproximadamente 30 segundos después de volverla a introducirla en una jaula. Cuando una rata no era capaz de trepar hasta la plataforma en un tiempo de medición de 90 segundos, la rata se volvió a introducir en el agua, a transferirse sobre la plataforma, permitiéndola estar ahí durante aproximadamente 30 segundos y regresar a la jaula. A propósito, el tiempo de espera de escape en ese momento se contó como 90 segundos. El intervalo entre los experimentos fue de aproximadamente 30 minutos, se realizaron cuatro experimentos al día y se definieron como una sesión. Dicha sesión se realizó durante cuatro días sucesivos y se evaluó

(1) el tiempo de espera de escape y (2) los tiempos satisfactorios (tiempos en los que se conseguía alcanzar la plataforma durante cuatro experimentos).

Resultados:

(1) Tiempo de espera de escape

5 **[0057]** En la Tabla 2 se muestra el resultado del tiempo de espera de escape.

Tabla 2

Nombre de los grupos	Número de casos	Tiempo de espera de escape (segundos)			
		Sesiones			
		1	2	3	4
Grupo normal	18	61,1 ±4,3	31,2±3,7	24,3 ± 3,2	16,3 ±1,7
Grupo control	20	66,0 ±3,4	54,9 ±4,3	52,5 ±5,9	54,3 ± 5,8
Grupo de 1 mg/kg	22	68,2 ± 3,5	61,8 ±4,4	52,5 ± 6,9	46,9 ± 7,6
Grupo de 3 mg/kg	22	63,2 ±3,8	48,7 ±5,5	42,8 ± 6,4	34,9 ± 5,7
Grupo de 10 mg/kg	20	66,8 ±3,7	44,5 ± 4,5	41,4 ±5,2	31,2 ±6,2

10 **[0058]** En el grupo de control que se sometió a un tratamiento 4VO, el tiempo de espera de escape fue significativamente mayor en la segunda, tercera y cuarta sesión en comparación con el grupo normal (Sesiones segunda, tercera y cuarta: $p < 0,001$: ensayo de suma de rangos de Wilcoxon).

[0059] En los grupos de 3 mg/kg y 10 mg/kg con ácido (2R)-2-propiloctanoico, el tiempo de espera de escape fue significativamente mejor en la cuarta sesión en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$: ensayo de suma de rangos de Wilcoxon).

(2) Tiempos satisfactorios

15 **[0060]** Se calculó la proporción del número de ratas en tiempos satisfactorios y el resultado se muestra en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

Nombres de los grupos	Número de casos	Tiempos satisfactorios	Tiempo de espera de escape (segundos)			
			Sesiones			
			1	2	3	4
Grupo normal	18	0	0,0	0,0	0,0	0,0
		1	27,8	0,0	0,0	0,0
		2	33,3	5,6	5,6	0,0
		3	33,3	44,4	11,1	11,1
		4	5,6	50,0	83,3	88,9
Grupo de control	20	0	15,0	5,0	10,0	5,0
		1	25,0	20,0	25,0	30,0
		2	35,0	30,0	10,0	20,0
		3	20,0	35,0	20,0	25,0
		4	5,0	10,0	35,0	20,0

Nombres de los grupos	Número de casos	Tiempos satisfactorios	Tiempo de espera de escape (segundos)			
			Sesiones			
			1	2	3	4
Grupo de 1 mg/kg	22	0	22,7	9,1	22,7	18,2
		1	27,3	22,7	22,7	22,7
		2	31,8	31,8	0,0	4,5
		3	13,8	27,3	4,5	9,1
		4	4,5	9,1	50,0	45,5
Grupo de 3 mg/kg	22	0	18,2	9,1	13,6	45,5
		1	18,2	13,6	4,5	4,5
		2	40,9	9,1	22,7	0,0
		3	13,6	27,3	9,1	31,8
		4	9,1	40,9	50,0	54,5
Grupo de 10 mg/kg	20	0	15,0	0,0	0,0	0,0
		1	35,0	15,0	15,0	5,0
		2	5,0	10,0	10,0	10,0
		3	35,0	50,0	40,0	15,0
		4	10,0	25,0	35,0	70,0

[0061] En la segunda, tercera y cuarta sesión el grupos de control mostró diferencias significativas en comparación con el grupo normal (segunda y tercera sesión: $p < 0,05$: ensayo de χ^2 ; cuarta sesión: $p < 0,001$: ensayo de χ^2).

5 **[0062]** En los grupos de 3 mg/kg y 10 mg/kg con ácido (2R)-2-propiloctanoico, el tiempo de espera de escape mostró diferencias significativas en la cuarta sesión en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$: ensayo de χ^2).

1-B-3: Evaluación por observación histológica

[0063] Al siguiente día de completar el ensayo de aprendizaje del laberinto del agua, se administró a las ratas una inyección de pentobarbital (aproximadamente 35 mg/kg de Nembutal (marca comercial registrada); fabricado por Dainippon Pharmaceutical) por vía intraperitoneal para anestesarlas.

10 **[0064]** Después de esto, se realizó una perfusión transcárdial en el cerebro con una solución salina fisiológica (Physisalz-PL, fabricada por Fuso Yakuin Kogyo) a la que se añadió heparina (solución de inyección de heparina sódica 10 U/ml; fabricada por Shimizu Seiyaku) y después se realizó una perfusión cerebral y se fijó con formalina tamponada neutra al 10% (fabricada por Wako Pure Chemical). Se extirpó todo el cerebro y se conservó en formalina tamponada neutra al 10% y, después de esto, se prepararon muestras para ensayo histopatológico.

15 **[0065]** Con respecto a las muestras para ensayo histopatológico, se prepararon tres tipos de muestras, es decir (1) muestra teñida con Nissl (un sitio de 5,7 mm desde la línea interaural), (2) muestra teñida con hematoxilina-eosina y (3) muestra no teñida (grosor: 10 μ m) por muestra de tejido cerebral de un animal. Entre estas, con respecto a la muestra teñida con Nissl, se midió la longitud de la capa celular nerviosa del hipocampo CA1 derecho e izquierdo y el número de células nerviosas usando un analizador de imagen (MCID Elite 7.0 Rev. 1.0) y se calculó el número por unidad de longitud (mm) para realizar una evaluación histológica.

Resultados:

[0066] En la siguiente Tabla 4 se muestra el resultado de la medición del número de células nerviosas en la región CA1 del hipocampo.

Tabla 4

Nombres de los grupos	Número de casos	Densidad de las células nerviosas (células/mm)	Valor p
Grupo normal	18	129,9 ±3,3	-
Grupo de control	20	43,6 ±6,2	< 0,0001
Grupo de 1 mg/kg	22	45,0 ±5,6	0,7818
Grupo de 3 mg/kg	22	61,0 ±4,8	0,0495
Grupo de 10 mg/kg	20	71,4 ±5,5	0,0015

[0067] Se observó una disminución significativa en cuanto al número de células nerviosas en el grupo de control en comparación con el grupo normal ($p < 0,001$: ensayo de suma de rangos de Wilcoxon).

- 5 **[0068]** En los grupos de 3 mg/kg y 10 mg/kg con ácido (2R)-2-propiloctanoico, el número de células nerviosas aumentó significativamente en comparación con el grupo de control (3 mg/kg: $p < 0,05$: ensayo de suma de rangos de Wilcoxon; 10 mg/kg: $p < 0,01$: ensayo de suma de rangos de Wilcoxon).

Ejemplo 2

Investigación del efecto sobre la diferenciación de células madre nerviosas *in vitro*:

- 10 2-A: Evaluación por ensayo de diferenciación de células madre derivadas de cerebro fetal de ratas.

2-A-1: Preparación de muestras y evaluación del número de células nerviosas

- 15 **[0069]** Se extrajeron fetos de una rata gestante de la cepa Wistar y se extirpó el estriatum del cerebro de los fetos. Las células se dispersaron mediante pipeteado y se incubaron durante seis a siete días en un medio de cultivo (medio DMEM/F12 (fabricado por Gibco) que contenía aditivo N2 (complemento más N2; R&D Systems), antibióticos, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF 20 ng/ml; fabricado por R&D Systems) y factor de crecimiento celular epitelial (EGF 20 ng/ml; fabricado por R&D Systems). Las neuroesferas resultantes se recuperaron, las células se dispersaron por medio de pipeteado y se cultivaron durante seis a siete días más usando un medio de cultivo. Las neuroesferas que se produjeron de nuevo se recuperaron y, después de dispersar las células, se cultivaron en un portaobjetos con cámara con un recubrimiento de poli L ornitina. Después de incubación durante 24 horas, se cambió a un medio diferenciado que comprendía un compuesto de ensayo (un medio DMEM/F12 que comprendía aditivo N2, antibiótico y suero bovino fetal al 1%). Después de la diferenciación durante siete días, se realizó la fijación con paraformaldehído al 4% y se realizó una inmunotinción usando un anticuerpo anti- β III tubulina de ratón (anticuerpo secundario: anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC) que va a ser un índice para diferenciar células madre nerviosas de células nerviosas.

- 25 Resultado:

- 30 **[0070]** Las células madre nerviosas derivadas del estriatum de rata se incubaron durante siete días en un medio DMEM/F12 que comprendía suero bovino fetal al 1% (Dainippon Pharmaceutical) (grupo sin compuesto añadido) o en un medio que comprendía un compuesto de ensayo (grupo con compuesto añadido) y, como resultado, el número de células, por campo visual al microscopio (100 aumentos), que resultó ser positivo a β III tubulina (Tuj 1⁺) aumentó significativamente en el grupo al que se añadió compuesto en comparación con el grupo sin compuesto añadido. Por ejemplo, cuando se usaron 30 μ mol/l de ácido (2R)-2-propiloctanoico, el número de células en el grupo sin compuesto añadido fue de $8 \pm 1,3$ (en ocho campos visuales) mientras que en el grupo al que se añadió compuesto fue de $31 \pm 4,6$ (en ocho campos visuales). En la Figura 2 se muestran los resultados.

2-A-2: Confirmación de etapa de diferenciación de células nerviosas

- 35 **[0071]** Con respecto a las células nerviosas anteriores preparadas por diferenciación de células madre nerviosas procedentes del estriatum de ratas, la etapa de diferenciación se confirmó mediante inmunotinción. A propósito, para la confirmación de células nerviosas maduras, se usó anticuerpo anti-MAP2 mientras que, para la confirmación de las células nerviosas funcionales, se usó anticuerpo anti-GABA.

Resultados:

- 40 **[0072]** El resultado del recuento del número de células positivas, por campo visual, teñidas usando un anticuerpo anti-MAP2 fue que, en el grupo sin compuesto añadido, había $34 \pm 0,9$ mientras que en un grupo al que se añadieron 30 μ mol/l de ácido (2R)-2-propiloctanoico fue de $50 \pm 7,4$.

[0073] El resultado del recuento del número de células positivas, por campo visual, teñidas usando un anticuerpo anti-GABA fue que, en el grupo sin compuesto añadido, había $19 \pm 2,7$ mientras que en un grupo al que se añadieron $30 \mu\text{mol/l}$ de ácido (2R)-2-propiloctanoico fue de $101 \pm 9,5$.

5 **[0074]** A partir de los resultados anteriores, se encontró que las células nerviosas maduras y las células nerviosas funcionales se prepararon cuando las células madre nerviosas derivadas del estriatum de fetos de rata se diferenciaron en células nerviosas usando un medio al que se añadió ácido (2R)-2-propiloctanoico.

Ejemplo 3

Investigación del efecto sobre la diferenciación de astrocitos en cultivo primario a células nerviosas:

3-A: Evaluación por ensayo de diferenciación de astrocitos derivados del córtex cerebral de ratas

10 3-A-1: Preparación de muestras

15 **[0075]** Se extirpó el cerebro de ratas recién nacidas de la cepa Wistar y, después de eliminar la meninge al microscopio estereoscópico, se molió con una parte helada de un portaobjetos de vidrio con congelación en un medio DMEM enfriado con hielo para preparar una suspensión. Se realizó la separación por centrifugación a $100 \times g$ durante 3 minutos y el precipitado se suspendió en un medio DMEM con suero fetal bovino al 10% y se sembró en un matraz de 75 cm^2 . Después de dos días desde el inicio del cultivo, se realizó la purificación de las células.

20 **[0076]** El día 19 desde el inicio del cultivo, se recuperaron los astrocitos usando tripsina al 0,05% / EDTA y las células se resuspendieron de nuevo usando un medio de diferenciación (un medio DMEM/F12 (Gibco) que contenía aditivo N2 (complemento más N2; R&D Systems) y suero bovino fetal al 1% (fabricado por Dainippon Pharmaceutical). Esto se sembró en un portaobjetos con cámara y, al día siguiente, la solución de cultivo se cambió a un medio diferenciado (un medio DMEM/F12 que comprendía aditivo N2, antibiótico y suero bovino fetal al 1%) que contenía un compuesto de ensayo. Después de la diferenciación durante siete días, se realizó la fijación usando paraformaldehído al 4% y a continuación se realizó la inmunotinción.

3-A-2: Confirmación de la etapa de diferenciación de las células nerviosas

25 **[0077]** Con respecto a las células nerviosas preparadas por diferenciación de astrocitos derivados de córtex cerebral de ratas, su etapa de diferenciación se confirmó mediante inmunotinción. A propósito, para la confirmación de células nerviosas jóvenes, se usó el anticuerpo anti- β III-tubulina y anticuerpo anti-doble cortina; y para la confirmación de células nerviosas maduras, se usó el anticuerpo anti-MAP2, el anticuerpo anti-NeuN y el anticuerpo anti-NSE; el anticuerpo anti-GABA se usó para la confirmación de células nerviosas funcionales.

Resultados:

30 **[0078]** Como resultado del recuento del número de células positivas, por campo visual, teñidas por un anticuerpo anti- β III-tubulina, hubo $93 \pm 10,9$ en el grupo sin compuesto añadido, $177 \pm 11,8$ en un grupo al cual se habían añadido $30 \mu\text{mol/l}$ de ácido (2R)-2-propiloctanoico, $230 \pm 11,0$ en un grupo al cual se habían añadido $100 \mu\text{mol/l}$ de ácido (2R)-2-propiloctanoico y $174,8 \pm 7,8$ en un grupo al cual se habían añadido $300 \mu\text{mol/l}$ de ácido 2-propilpentanoico.

35 **[0079]** Como resultado del recuento del número de células positivas teñidas por el anticuerpo anti-doble cortina hubo $55 \pm 5,7$ en el grupo sin compuesto añadido y $168 \pm 16,6$ en un grupo al cual se habían añadido $30 \mu\text{mol/l}$ de ácido (2R)-2-propiloctanoico.

[0080] Como resultado del recuento del número de células positivas teñidas por el anticuerpo anti-MAP2, hubo $50 \pm 7,4$ en el grupo sin compuesto añadido y $104 \pm 10,3$ en un grupo al cual se habían añadido $30 \mu\text{mol/l}$ de ácido (2R)-2-propiloctanoico.

40 **[0081]** Como resultado del recuento del número de células positivas teñidas por el anticuerpo anti-NeuN, hubo 106 en el grupo sin compuesto añadido y 199 en un grupo al cual se habían añadido $30 \mu\text{mol/l}$ de ácido (2R)-2-propiloctanoico.

[0082] Como resultado del recuento del número de células positivas teñidas por el anticuerpo anti-NSE, hubo 108 en el grupo sin compuesto añadido y 166 en un grupo al cual se habían añadido $30 \mu\text{mol/l}$ de ácido (2R)-2-propiloctanoico.

45 **[0083]** Como resultado del recuento del número de células positivas teñidas por el anticuerpo anti-GABA, hubo $20 \pm 1,0$ en el grupo sin compuesto añadido y $60 \pm 8,8$ en un grupo al cual se habían añadido $30 \mu\text{mol/l}$ de ácido (2R)-2-propiloctanoico.

[0084] A partir de los resultados anteriores, se encontró que las células nerviosas maduras y las células nerviosas funcionales se obtuvieron cuando los astrocitos derivados del córtex cerebral de ratas se diferenciaban en células nerviosas usando un medio al cual se había añadido ácido (2R)-2-propiloctanoico.

50

Ejemplo de preparación 1: (Referencia)

5 **[0085]** Se añadió ácido (2R)-2-Propiloctanoico (2,0 kg) y fosfato trisódico dodecahidrato (3,54 kg) y se preparó en 40 l usando agua para inyección. Después de realizar esto en una solución uniforme, se filtró a través de un filtro aséptico (membrana Durapore de 0,22 μm) cada 2 ml de los mismos se cargó en una ampolla y se sometió a una esterilización con vapor a alta presión (a 123°C durante 15 minutos) para proporcionar 20.000 ampollas conteniendo cada una 100 mg del ingrediente activo.

Aplicabilidad Industrial

10 **[0086]** Dado que el compuesto de la presente invención tiene una acción de aceleración para la regeneración nerviosa en animales, incluyendo seres humanos o particularmente en seres humanos, este es útil para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y, por lo tanto, puede utilizarse como producto farmacéutico. Por otra parte, cuando este se usa como un aditivo para cultivar en la preparación de células nerviosas para trasplante *in vitro*, las células nerviosas pueden prepararse eficazmente y, por lo tanto, puede utilizarse para la preparación de células que tienen usos farmacéuticos.

REIVINDICACIONES

1. Uso del ácido (2R)-2-propiloctanoico o una sal del mismo para obtener células nerviosas y células nerviosas maduras por diferenciación de células gliales o células precursoras gliales, en el que el ácido (2R)-2-propiloctanoico o una sal del mismo es un agente aditivo para el cultivo *in vitro* de las células gliales o las células precursoras gliales.
- 5
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células gliales son astrocitos.

1/2

FIG. 1

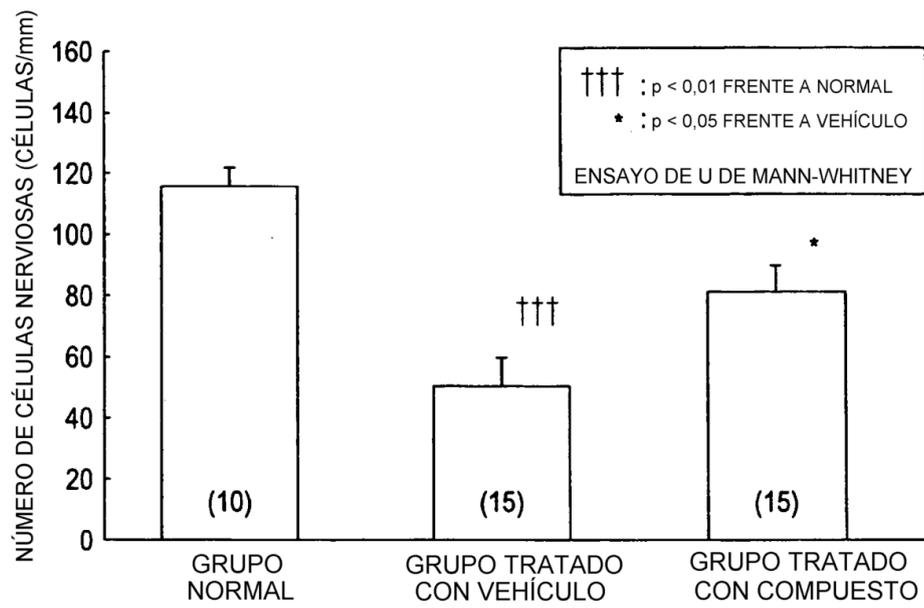
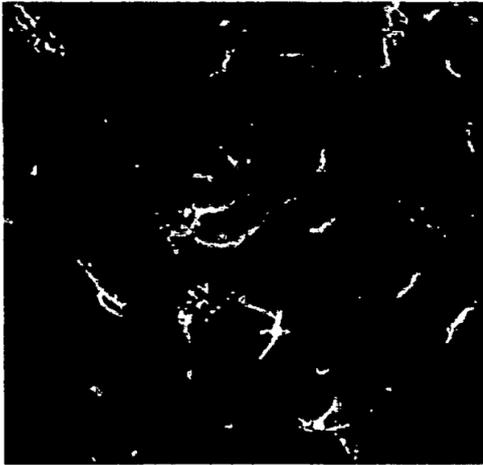
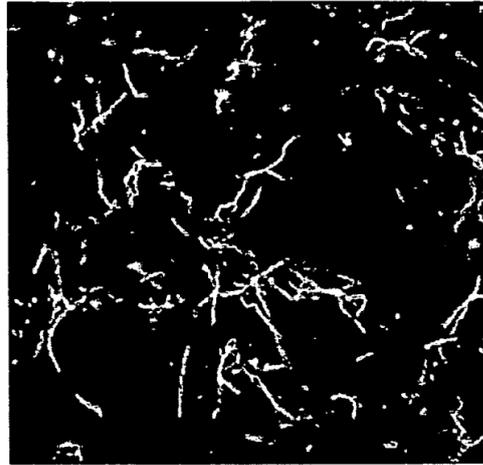


FIG. 2

FOTOGRAFÍAS INMUNOTEÑIDAS (POSITIVAS AL ANTICUERPO ANTI- β III-TUBULINA)



GRUPO SIN COMPUESTO AÑADIDO



GRUPO CON COMPUESTO AÑADIDO