

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 834**

51 Int. Cl.:

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 31/7024 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 21/04 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2012** **PCT/CN2012/080291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014** **WO14026372**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2012** **E 12883034 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017** **EP 2992879**

54 Título: **Composición farmacéutica para inhibir la autofagia de las neuronas motoras y uso de la misma**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2018

73 Titular/es:

CHINA MEDICAL UNIVERSITY (100.0%)
No. 91, Hsueh-Shih Road North District
Taichung 40402, TW

72 Inventor/es:

LIN, SHINN-ZONG;
HARN, HORNG-JYH;
CHIOU, TZYY-WEN y
HSUEH, KUO-WEI

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 655 834 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

Composición farmacéutica para inhibir la autofagia de las neuronas motoras y uso de la misma

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para inhibir la autofagia de las neuronas motoras y sus aplicaciones, especialmente para retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o curar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.

10

Descripciones de la técnica relacionada

Una neurona, también conocida como célula nerviosa, es una de las unidades estructurales y funcionales del sistema nervioso del organismo. Las neuronas pueden transmitir mensajes a otras células mediante señales químicas y eléctricas. Las neuronas pueden variar en forma y tamaño, y los diámetros de las neuronas pueden variar de aproximadamente 4 μm a aproximadamente 100 μm . La estructura de una neurona se puede dividir aproximadamente en tres partes: un cuerpo celular, dendritas y un axón, en el que las dendritas pueden transmitir señales al interior de los cuerpos celulares, y los axones pueden transmitir señales desde los cuerpos celulares.

15

20

25

30

Las neuronas se pueden clasificar en tres tipos dependiendo de la dirección de su señal de transducción y funciones: neuronas sensoriales, neuronas motoras e interneuronas, en las que una neurona motora es una célula nerviosa que controla las actividades corporales de un organismo. En general, las neuronas motoras en el cerebro se conocen como neuronas motoras superiores, mientras que las neuronas motoras en el tallo cerebral y la médula espinal se conocen como neuronas motoras inferiores. Los trastornos funcionales causados por la degeneración de las neuronas motoras pueden provocar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras, como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miastenia grave, miastenia, atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis múltiple, atrofia multisistémica, distrofia muscular espinal, etc. Los pacientes que padecen las mencionadas enfermedades degenerativas de las neuronas motoras mostrarán gradualmente síntomas tales como debilidad muscular, atrofia, temblores, cólico, rigidez, lo que puede provocar dificultad para hablar, dificultad para tragar e insuficiencia respiratoria.

35

El documento US 2008/0268078 A1 divulga un procedimiento para inhibir la síntesis de óxido nítrico y/o prostaglandina E_2 . El procedimiento comprende administrar una composición a un sujeto, en el que la composición comprende una cantidad eficaz de butilidenftalida, citrionelol, geraniol o combinaciones de los mismos, que se pueden usar para reducir o aliviar los síndromes de la inflamación.

El documento CN 101184484 B divulga derivados de lactona bicíclicos tales como butilidenftalimida para su uso como moduladores de la inflamación en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

40

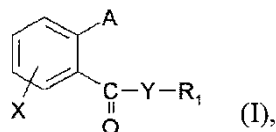
45

La causa real de las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras aún es incierta hasta la fecha. Sin embargo, la investigación ha demostrado que las posibles causas de la enfermedad incluyen muerte de las neuronas causada por autofagia excesiva estimulada por la acumulación de aniones superóxido, trastorno autoinmunitario, excitación neuronal excesiva (por ejemplo, acumulación excesiva de glutamatos), oxidación excesiva y herencia, etc. Los medicamentos actualmente usados en la clínica para tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras incluyen antagonistas de glutamato como Riluzol, antioxidantes tales como vitamina E, factores neurotróficos, moduladores inmunitarios, etc. Sin embargo, los medicamentos mencionados anteriormente no tienen un efecto terapéutico significativo o solo pueden alargar la vida de los pacientes durante 3 a 6 meses. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de un medicamento para retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o curar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.

50

Los inventores de la presente invención encontraron que el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se puede usar para inhibir la autofagia de las neuronas motoras y disminuir la muerte de las neuronas motoras, retrasando así la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o curar las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras en las que la fórmula (I) es

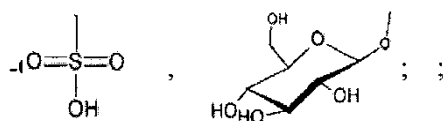
55



en el que, A es un grupo de hidrocarbilos C1-C5 que tiene opcionalmente uno o más enlaces insaturados, y es opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en -OH, =O, y el grupo de hidrocarbilos C1-C3;

60

X es H,



Y es O o S y opcionalmente se une con A para formar un anillo de cinco miembros; y

R1 es H o un grupo de hidrocarbilos C1-C20 sustituido o no sustituido, en el que uno o más -CH₂- en el grupo de hidrocarbilos son opcionalmente sustituido por -NH- o -O-.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para uso en el curado y/o retraso de la aparición de la esclerosis lateral amiotrófica, comprendiendo una cantidad eficaz de un componente activo seleccionado del grupo que consiste en butilidenftalida (BP), una sal farmacéuticamente aceptable de butilidenftalida (BP) y combinaciones de los mismos.

En las reivindicaciones dependientes se reflejan los modos de realización preferidos.

La tecnología detallada y los modos de realización preferidos implementados para la presente invención se describirán en los siguientes párrafos para que las personas expertas en el campo aprecien bien las características de la invención reivindicada.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es un espectro de masas de una mezcla de butilidenftalida y microsomas hepáticos humanos analizados mediante CL-EM/EM;

la figura 1B es un perfil metabólico que muestra el metabolismo de fase I de la butilidenftalida en un organismo;

la figura 1C es un perfil metabólico que muestra el metabolismo de fase II de la butilidenftalida en un organismo;

la figura 2 es un diagrama de curvas de supervivencia que muestra el efecto de la butilidenftalida en el aumento de la tasa de supervivencia de ratones transgénicos SOD1-G93A;

la figura 3 es un diagrama de curvas de supervivencia que muestra el efecto de Riluzol sobre el aumento de la tasa de supervivencia de ratones transgénicos SOD1-G93A;

la figura 4 es una curva a escala BBB que muestra los efectos de la butilidenftalida en los ratones transgénicos SOD1-G93A;

la figura 5A es una imagen de tinción histoquímica que muestra los efectos de la butilidenftalida en el retraso o la prevención de la muerte de las neuronas motoras espinales de ratones transgénicos SOD1-G93A;

la figura 5B es un diagrama de barras que muestra los efectos de la butilidenftalida en el retraso o la prevención de la muerte de las neuronas motoras espinales de ratones transgénicos SOD1-G93A;

la figura 6 es una imagen de bandas Western que muestra el efecto de la butilidenftalida sobre la disminución del nivel de expresión de la proteína LC3-II en la columna lumbar de ratones transgénicos SOD1-G93A; y

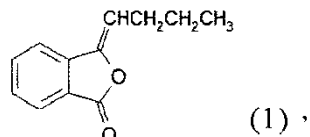
la figura 7 es una imagen de bandas Western que muestra el efecto de la butilidenftalida sobre la inhibición de la autofagia de NSC.

Descripción detallada de la invención

Lo siguiente describirá algunos modos de realización de la presente invención en detalle. Sin embargo, sin apartarse del espíritu de la presente invención, la presente invención se puede materializar en diversos modos de realización y no se debe limitar a los modos de realización descritos en la memoria descriptiva. Además, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, las expresiones "un", "el", o similares, enumeradas en la memoria descriptiva de la presente invención (especialmente en las reivindicaciones) deberían incluir tanto las formas en singular como las formas en plural. Además, el término "cantidad eficaz" usado en esta memoria descriptiva se refiere a la cantidad del compuesto que puede al menos aliviar parcialmente la afección que se está tratando en un sujeto sospechoso cuando se administra al sujeto. El término "sujeto" usado en esta memoria descriptiva se refiere a un mamífero, lo cual incluye animales humanos y no humanos.

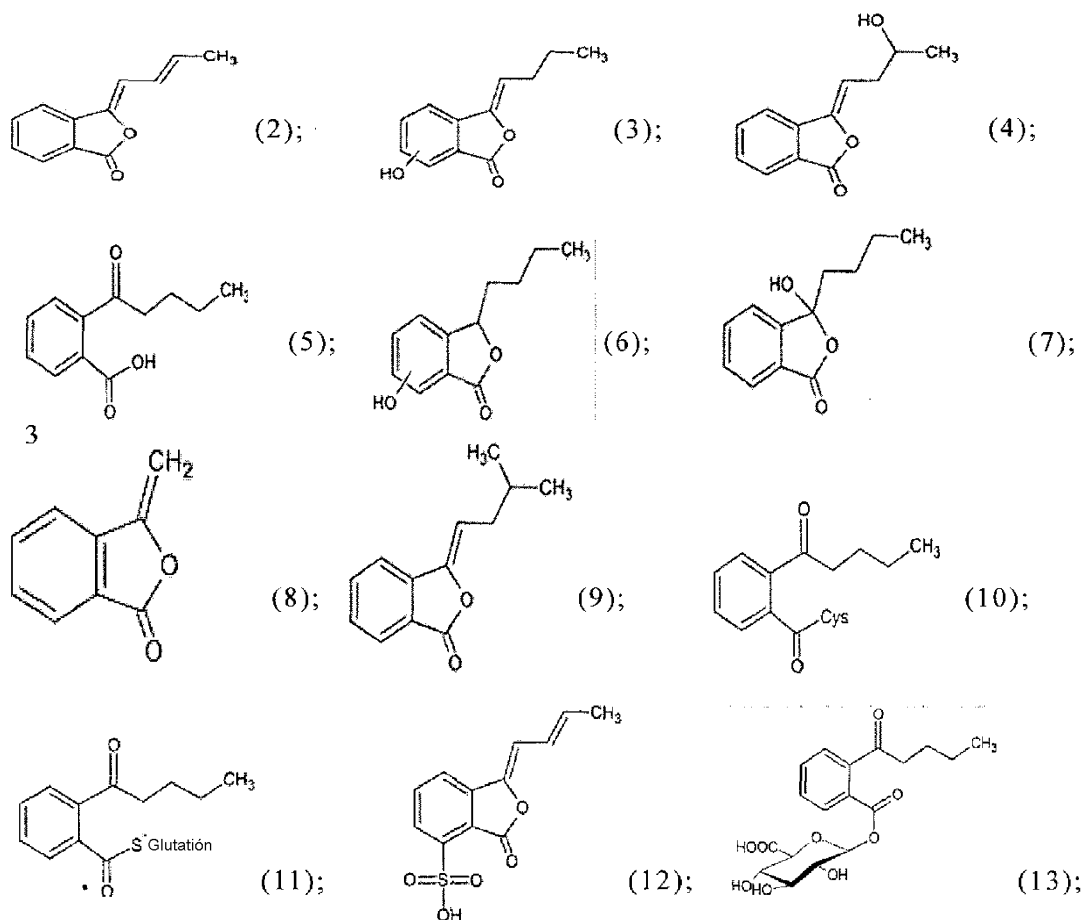
La autofagia es un mecanismo importante para regular el crecimiento celular, la homeostasis celular y la muerte celular, que implica la degradación de los propios organelos u otros materiales de una célula a través de los lisosomas intracelulares de las células. Sin embargo, como se indicó anteriormente, se sabe que la autofagia excesiva de las neuronas motoras es una de las causas de las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras. Por lo tanto, si se puede inhibir la autofagia de las neuronas motoras, entonces se puede aliviar la muerte de las neuronas motoras para tratar las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.

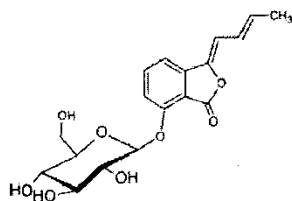
Los inventores de la presente invención han encontrado que el siguiente compuesto (1) puede inhibir eficazmente la autofagia de las neuronas motoras, y por lo tanto, se puede usar para retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o curar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.



El compuesto (1), también conocido como butilidenfthalida (BP), comprende dos isómeros en su estado natural, (Z)-butilidenfthalida (cis-butilidenfthalida) y (E)-butilidenfthalida (trans-butilidenfthalida).

Se ha confirmado que después de que la butilidenfthalida se metabolice mediante el metabolismo de fase I o metabolismo de fase II en el hígado de un organismo, se producirán uno o más de los siguientes compuestos (2) a (14):

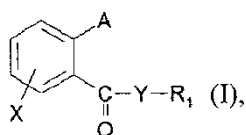




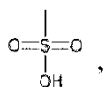
(14);

en el que Cys en el compuesto (10) se refiere a cisteína. Sin estar limitado por la teoría, se cree que el efecto de la butilidenftalida sobre la inhibición de la autofagia de las neuronas motoras en el organismo se origina a partir de la parte estructural común de las estructuras químicas de los compuestos (2) a (14) anteriores.

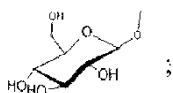
Por lo tanto, se describe una composición farmacéutica para inhibir la autofagia de las neuronas motoras, que comprende administrar una cantidad eficaz de un componente activo seleccionado del grupo que consiste en un compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula (I), un éster farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula (I) y combinaciones de los mismos:



en el que A es un grupo de hidrocarbilos C1-C5 que tiene opcionalmente uno o más enlaces insaturados, y es opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en -OH, =O, y el grupo de hidrocarbilos C1-C3; X es H, -OH,

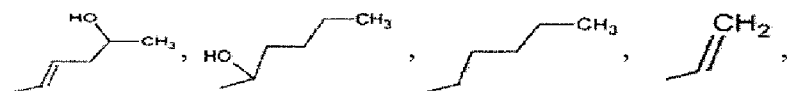


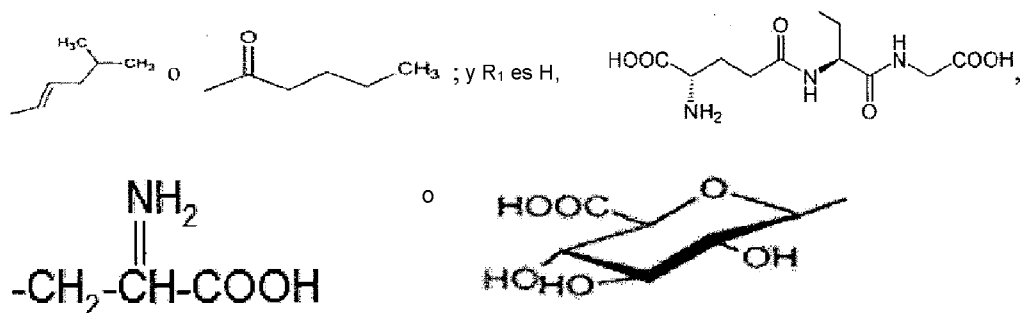
o



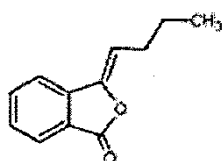
Y es O o S y opcionalmente se une con A para formar un anillo de cinco miembros; y R₁ es H o un grupo de hidrocarbilos C1-C20 sustituido o no sustituido, en el que uno o más -CH₂- en el grupo de hidrocarbilos se han sustituido opcionalmente por -NH- o -O-. Las neuronas motoras incluyen las neuronas motoras superiores, como las neuronas motoras en el cerebro, y las neuronas motoras inferiores, como la neurona motora en el tronco encefálico y la médula espinal.

Preferentemente, en el compuesto de fórmula (I), A es un grupo de alquilos o alquénilos C1-C5 que es opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en -OH, =O y el grupo de alquilos C1-C3; R₁ es H o un grupo de hidrocarbilos C1-C10 sustituido o no sustituido, en el que uno o más -CH₂- en el grupo de hidrocarbilos se han sustituido opcionalmente por -NH- o -O-. Más preferentemente





El compuesto de fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en los compuestos (1) a (14) anteriores. El compuesto de fórmula (I) usado en la presente invención es el compuesto (1) (es decir, butilidenfaldida), y es preferentemente un compuesto de la siguiente fórmula (es decir, (Z)-butilidenfaldida):



La composición farmacéutica de la presente invención puede inhibir la autofagia de las neuronas motoras y puede aliviar la muerte de las neuronas, y por lo tanto, se puede usar para retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o curar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras. Las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras comprenden cualquier enfermedad relacionada con la autofagia de las neuronas motoras, incluida la esclerosis lateral amiotrófica.

En un modo de realización, la composición farmacéutica de la presente invención se usa para curar la esclerosis lateral amiotrófica. Los pacientes de esclerosis lateral amiotrófica mostrarán gradualmente atrofia muscular, que en general causa cuadriplejía, dificultad para tragar e incluso insuficiencia respiratoria al cabo de 2 a 5 años. Las investigaciones han demostrado que la esclerosis lateral amiotrófica puede estar relacionada con la excitación neuronal excesiva (por ejemplo, acumulación excesiva de glutamatos). Por lo tanto, en la actualidad, el antagonista del glutamato, como el Riluzol, se usa en general en la clínica para curar enfermedades neurodegenerativas motoras con el fin de aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes. En comparación con Riluzol, la composición farmacéutica de la presente invención puede retrasar más eficazmente la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o curar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras al inhibir la autofagia de las neuronas motoras, y por lo tanto, puede aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede fabricar en un medicamento de cualquier forma adecuada para administración. Por ejemplo, pero no limitado de ese modo, la composición farmacéutica puede fabricarse en un medicamento con una forma adecuada para administración oral, inyección subcutánea, administración nasal o inyección intravenosa. Debido a que es conveniente un medicamento para administración oral para que los pacientes los tomen regularmente por sí mismos, es preferente que la composición farmacéutica se fabrique en un medicamento en una forma adecuada para la administración oral. Dependiendo de la forma y el propósito del medicamento, la composición farmacéutica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Para fabricar un medicamento adecuado para administración oral, la composición farmacéutica puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable que no tenga influencia adversa sobre la actividad del componente activo comprendido en el mismo, tal como un disolvente, disolvente oleoso, diluyente, estabilizante, agente de retraso de la absorción, disgregante, emulsionante, aglutinante, lubricantes, absorbente de humedad, etc. El medicamento puede estar en una forma adecuada para la administración oral, tal como un comprimido, una cápsula, un gránulo, polvo, un extracto fluido, una solución, jarabe, una suspensión, una emulsión, una tintura, etc.

Como un medicamento adecuado para inyección subcutánea o intravenosa, la composición farmacéutica puede comprender uno o más componentes, tales como una solución isotónica, una solución tampón salina (por ejemplo, una solución tampón de fosfato o una solución tampón de citrato), un solubilizante, un emulsionante, otros vehículos, etc., para fabricar el medicamento como una inyección intravenosa, una inyección intravenosa en emulsión, una inyección en polvo, una inyección en suspensión, una inyección en suspensión en polvo, etc.

Además de los adyuvantes anteriores, la composición farmacéutica puede comprender otros aditivos, tales como un

agente aromatizante, un tónico, un agente colorante, etc. para mejorar el sabor y el atractivo visual del medicamento resultante. Para mejorar la capacidad de almacenamiento del medicamento resultante, la composición farmacéutica también puede comprender una cantidad adecuada de un agente de preservación, un conservante, un antiséptico, un reactivo antifúngico, etc. Además, la composición farmacéutica puede comprender uno o más de otros

- 5 componentes activos, tales como un antioxidante (por ejemplo, vitamina E), factor neurotrófico, inmunomodulador, etc., para mejorar aún más el efecto del procedimiento de la presente invención o aumentar la flexibilidad de aplicación y adaptabilidad para el procedimiento, siempre que los otros componentes activos no tengan un efecto adverso sobre el compuesto de fórmula (I) o sus derivados de sal y éster.
- 10 Dependiendo de los requisitos del sujeto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede aplicar con varias frecuencias de administración, tales como una vez al día, varias veces al día o una vez durante días, etc. Por ejemplo, cuando se aplica al cuerpo humano para inhibir la autofagia de las neuronas motoras, la dosificación de la composición es de aproximadamente 30 mg (como BP/kg-peso corporal a aproximadamente 2000 mg (como BP/kg-
- 15 peso corporal por día, y preferentemente es aproximadamente 100 mg (como BP/kg-peso corporal a aproximadamente 1000 mg (como BP/kg-peso corporal por día, en el que la unidad "mg/kg-peso corporal" significa la dosificación requerida por kg-peso corporal. Sin embargo, para pacientes con afecciones agudas, la dosificación puede aumentarse varias veces o varias decenas de veces, dependiendo de los requisitos prácticos. En un modo de realización que usa la composición farmacéutica de la presente invención para curar la esclerosis lateral amiotrófica, el componente activo es (Z)-butilidenftalida y su dosificación es aproximadamente 500 mg/kg-peso corporal.

20 También se divulga el uso del compuesto de fórmula (I) y/o su(s) sal(es) y éster(es) farmacéuticamente aceptable(s) en la fabricación de un medicamento para inhibir la autofagia de las neuronas motoras. Al inhibir la autofagia de las neuronas motoras, el medicamento se puede usar para retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o curar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras, como la esclerosis lateral

25 amiotrófica, miastenia grave, miastenia, atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis múltiple, atrofia multisistémica, distrofia muscular espinal y combinaciones de los mismos. Las formulaciones y dosificaciones del medicamento y los otros componentes opcionalmente comprendidos en el mismo están en línea con las descripciones anteriores.

30 También se divulga un procedimiento para inhibir la autofagia de las neuronas motoras en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un componente activo seleccionado del grupo que consiste en un compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula (I), un éster farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula (I) y combinaciones de los mismos. Las formulaciones y dosificaciones del componente activo están todas en línea con las descripciones anteriores.

35 La presente invención se ilustrará adicionalmente en detalles con ejemplos específicos de la siguiente manera. Sin embargo, los siguientes ejemplos se proporcionan solo para ilustrar la presente invención, y el alcance de la presente invención no está limitado por ello.

40 **[Ejemplo]**

[Ejemplo 1] Identificación de los metabolitos de butilidenftalida

Se sabe que la vía metabólica de la medicina dentro del hígado de un organismo se puede dividir principalmente en

45 metabolismo de fase I y fase II. El metabolismo de fase I se produce principalmente por la reacción redox o reacción de hidrólisis de la medicina, y el metabolismo de fase II se produce principalmente por el sistema de citocromo P450 (CYP450) monooxigenasa. Este ejemplo simula el metabolismo de la butilidenftalida en fase I y II que se produce dentro del hígado de un organismo mezclando butilidenftalida respectivamente con microsomas hepáticos o

50 hepatocitos crioconservados *in vitro*, y los productos en la solución de reacción se analizaron mediante cromatografía líquida-espectrómetro de masas en tándem (CL-EM/EM) para identificar los metabolitos y el perfil metabólico. Los pasos experimentales fueron los siguientes:

(1) Ensayo de metabolismo de fase I

55 La butilidenftalida (2 mM) se mezcló respectivamente con solución tampón K_3PO_4 (100 mM, pH 7,4) que contenía microsomas hepáticos de humanos, ratas o perros (0,5 mg/ml). La mezcla se mantuvo a 37 °C durante 10 minutos y luego se añadieron a la misma los cofactores precalentados (NADPH (2 mM) y $MgCl_2$ (3 mM)) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 60 minutos. A continuación, se añadió un volumen de 3 veces de acetonitrilo que contenía ácido fórmico al 0,1 % a la mezcla para finalizar la reacción. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos, y el

60 sobrenadante se recogió a continuación y se analizó mediante CL-EM/EM para identificar los metabolitos.

(2) Ensayo de metabolismo de fase II

Un medio E de William que contiene 5×10^5 hepatocitos humanos, de rata o de perro descongelados se añadió

65 respectivamente a una placa de cultivo de 12 receptáculos, y las células se cultivaron durante 6 horas. Luego, se añadieron 0,5 ml de butilidenftalida (50 μM) a la placa de cultivo. Después de incubar las células a 37 °C, 95 % de

humedad relativa y 5 % de CO₂ durante 6 horas, se añadieron 2 ml de acetonitrilo (100 %) para finalizar la reacción. Se recogió la muestra, se mezcló adecuadamente y se centrifugó a 45000 g y 4 °C durante 10 minutos. A continuación el sobrenadante se recogió, se secó y se analizó mediante CL-EM/EM para identificar los metabolitos.

5 (3) Análisis de CL-EM/EM

- Las muestras obtenidas de (1) y (2) se disolvieron por separado en acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1 %, se centrifugaron a 45000 g, 4 °C durante 10 minutos. Luego, las alícuotas (20 µl) de cada muestra se inyectaron en un vial de automuestreador (Agilent Technologies, EE. UU.) de un sistema CL-EM/EM para realizar análisis de CL-EM/EM. El sistema CL-EM/EM comprende un sistema ABSCIEX 5500 Q TRAP™ con sistema HPLC 1200SL (Agilent Technologies, EE. UU.), Una columna HPLC (Symmetry® C18, 3,5 µM, 4,6 × 75 mm) y un automuestreador (Agilent Technologies, EE. UU.). Se usó un sistema de dos disolventes (disolvente A: 0,1 % de ácido fórmico; disolvente B: metanol que contiene 0,1 % de ácido fórmico) para realizar HPLC a un caudal de 0,8 ml/min. El sistema de gradiente de HPLC se estableció de la siguiente manera: 0 a 2 minutos mantenidos al 10 % de disolvente B; 2 a 7 minutos con un gradiente de 10 % a 95 % de disolvente B; 7 a 12 minutos mantenidos al 95 % de disolvente B; 12 a 14 minutos con un gradiente de 95 % a 10 % de disolvente B; 14 a 20 minutos mantenidos al 10 % de disolvente B; y el tiempo de retención del análisis de HPLC es de 20 minutos. El análisis de espectrometría de masas se realizó en modo de ionización por electropulverización de iones positivos (+ ESI) a 5,5 kV, 550 °C y se usó N₂ (nitrógeno) como un gas auxiliar. El software LightSight™ analizó los picos más intensos del espectro CL-EM/EM y los picos desplazados en masa en el espectro CL-EM/EM de cada muestra en comparación con el espectro de butilidenftalida para determinar los metabolitos en las muestras e identificar la vía de biotransformación y perfil metabólico de butilidenftalida en un organismo. Los resultados se muestran en la tabla 1, la tabla 2, la figura 1A, la figura 1B y la figura 1C.
- La figura 1A muestra el espectro del producto del fragmento de la mezcla de butilidenftalida (m/z 189,1) y microsomas hepáticos humanos analizados mediante CL-EM/EM. Como se muestra en la figura 1A, los picos más intensos (m/z) son 171,2 uma, 153,1 uma, 143,0 uma, 128,0 y 115,0 uma.

Tabla 1

Metabolitos de fase I			
Especie	Metabolitos	Vía de biotransformación	Picos desplazados en masa
Rata	Compuesto (2)	Deshidrogenación	m/z 189→187
	Compuesto (3); Compuesto (4)	Oxidación	m/z 189→205
	Compuesto (5); Compuesto (6); Compuesto (7)	Hidrogenación (formando grupo de hidrocarbilos)	m/z 189→207
	Compuesto (8)	Tri-desmetilación	m/z 189→147
	Compuesto (9)	+ Ceto (O _x -2H) o metilación	m/z 189→203
Perro	Compuesto (2)	Deshidrogenación	m/z 189→187
	Compuesto (3); Compuesto (4)	Oxidación	m/z 189→205
	Compuesto (5); Compuesto (6); Compuesto (7)	Hidrogenación (formando grupo de hidrocarbilos)	m/z 189→207
	Compuesto (8)	Tri-desmetilación	m/z 189→147
	Compuesto (9)	+ Ceto (O _x -2H) o metilación	m/z 189→203
Humano	Compuesto (2)	Deshidrogenación	m/z 189→187
	Compuesto (3); Compuesto (4)	Oxidación	m/z 189→205
	Compuesto (5); Compuesto (6); Compuesto (7)	Hidrogenación (formando grupo de hidrocarbilos)	m/z 189→207
	Compuesto (8)	Tri-desmetilación	m/z 189→147
	Compuesto (9)	+ Ceto (O _x -2H) o metilación	m/z 189→203

La tabla 1 muestra los tipos de metabolitos producidos a partir de la reacción de la mezcla de butilidenftalida y microsomas hepáticos (es decir, metabolismo de fase I) y la vía de biotransformación adquirida mediante análisis de software. Los resultados muestran que los compuestos (2) a (9) de la presente invención se pueden producir mediante la reacción de una mezcla de butilidenftalida y los microsomas hepáticos de rata, perro o ser humano, lo

cual indica que la butilidenftalida se puede transformar en metabolitos similares cuando se metaboliza en los hígados de diferentes organismos. La figura 1B muestra el perfil metabólico obtenido a partir de la reacción de la mezcla de butilidenftalida y microsomas hepáticos, y las estructuras químicas de los compuestos (2) a (9).

5 Tabla 2

Metabolitos de fase II			
Especie	Metabolitos	Vía de biotransformación	Cambio masivo
Rata	Compuesto (11)	+ Cisteína	m/z 189→310
	Compuesto (10)	+ S-Glutatión	m/z 189→496
	Compuesto (12)	Deshidrogenación + Sulfonación	m/z 189→267
	Compuesto (13)	Glucoronidación	m/z 189→365
Perro	Compuesto (11)	+ Cisteína	m/z 189→310
	Compuesto (10)	+ S-Glutatión	m/z 189→496
	Compuesto (13)	Glucoronidación	m/z 189→365
	Compuesto (14)	Deshidrogenación + Oxidación + Glucosa	m/z 189→365
Humano	Compuesto (11)	+ Cisteína	m/z 189→310
	Compuesto (10)	+ S-Glutatión	m/z 189→496
	Compuesto (12)	Deshidrogenación + Sulfonación	m/z 189→267
	Compuesto (13)	+ Glucoronidación	m/z 189→365

La tabla 2 muestra los tipos de metabolitos producidos a partir de la reacción de la mezcla de butilidenftalida y hepatocitos crioconservados (es decir, metabolismo de fase II) y la vía de biotransformación adquirida mediante análisis de software. Los resultados muestran que los compuestos (11) a (14) de la presente invención se pueden producir mediante la reacción de una mezcla de butilidenftalida y los hepatocitos crioconservados de rata, perro o ser humano, lo cual indica que la butilidenftalida se puede transformar en metabolitos similares cuando se metaboliza en los hígados de diferentes organismos. La figura 1C muestra el perfil metabólico obtenido a partir de la reacción de la mezcla de butilidenftalida y hepatocitos crioconservados, y las estructuras químicas de los compuestos (11) a (14).

15 [Ejemplo 2] Análisis *in vivo*: la butilidenftalida aumenta la tasa de supervivencia de ratones transgénicos

Se sabe que aproximadamente el 20 % de los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica se asociaron con mutaciones en el gen que codifica la enzima superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD1) y el principal sitio de mutación fue G93A. Los ratones transfectados con SOD1-G93A mutante humana mediante la técnica de transfección génica (de aquí en adelante denominados ratones transgénicos SOD1-G93A) se usaron como modelo animal para el estudio clínico de la esclerosis lateral amiotrófica ya que los ratones presentan un curso de enfermedad similar al humano. Un ratón transgénico SOD1-G93A mostrará los síntomas de la esclerosis lateral amiotrófica dentro de aproximadamente 90 ± 5 días después del nacimiento y morirá dentro de aproximadamente 125 ± 5 días después del nacimiento.

Este ejemplo utilizó los ratones transgénicos SOD1-G93A anteriores como el objeto de estudio para realizar *in vivo* análisis. Los ratones transgénicos SOD1-G93A (60 días) se trataron con butilidenftalida (adquirida de ECHO Chemical) mediante administración oral, con una dosis de 500 mg/kg-peso corporal una vez al día, en el que la unidad "mg/kg-peso corporal" significa la dosificación requerida por kg de peso corporal. Después de que los ratones transgénicos SOD1-G93A se trataron durante 30 días, se observó que podían ver si la butilidenftalida puede alargar la vida de los ratones transgénicos SOD1-G93A (es decir, más de 125 días). Los resultados se muestran en la figura 2 y en la tabla 3.

35 Tabla 3

	Días de supervivencia
Grupo de control (n = 17)	$127 \pm 6,11$
Grupo experimental (n-BP, 500 mg/kg-peso corporal) (n = 8)	$149 \pm 4,39$

Como se muestra en la figura 2 y la tabla 3, los ratones transgénicos SOD1-G93A de 60 días en el grupo experimental que fueron tratados con butilidenftalida por administración oral diaria sobrevivieron durante

aproximadamente $149 \pm 4,39$ días en promedio. Es decir, la vida de los ratones transgénicos SOD1-G93A en el grupo experimental se alargó durante aproximadamente 22 ± 2 días en comparación con los ratones transgénicos SOD1-G93A no tratados en el grupo control (sobrevivieron durante aproximadamente $127 \pm 6,11$). De acuerdo con la figura 3 (obtenida a partir de una referencia "Terapia combinada de riluzol y fenilbutirato de sodio en ratones transgénicos con esclerosis lateral amiotrófica. Esclerosis lateral amiotrófica. 2009; 10: 85-94, "que se incorpora por completo en el presente documento por referencia), cuando el medicamento de esclerosis lateral amiotrófica tradicional, Riluzol, se usó para curar ratones transgénicos SOD1-G93A, los ratones sobrevivieron durante 140 días. Los resultados anteriores muestran que, en comparación con Riluzol, la presente invención que usa el compuesto de fórmula (I) puede aumentar más eficazmente la tasa de supervivencia de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica.

[Ejemplo 3] Análisis *in vivo*: la butilidenftalida retrasa la aparición de la esclerosis lateral amiotrófica

Los ratones transgénicos SOD1-G93A (60 días de edad) se trataron con butilidenftalida por administración oral, con una dosificación de 500 mg/kg-peso corporal una vez al día. Después de que los ratones se trataron durante 30 días, se examinaron las extremidades posteriores de los ratones mediante una escala BBB (Escala de clasificación motriz Basso, Beattie, y Bresnahan (BBB)). La escala BBB de los miembros posteriores de ratones normales fue de 21 puntos, mientras que la escala BBB de ratones transgénicos SOD1-G93A con la enfermedad avanzada disminuyó de 21 a 0 puntos, en la que la escala inferior representa un trastorno de acción más grave en los ratones. La escala BBB se usa para registrar la eficacia del medicamento.

Como se muestra en la figura 4, los ratones transgénicos SOD1-G93A de 60 días de edad en el grupo experimental se trataron con butilidenftalida mediante administración oral diaria. La escala BBB de los miembros posteriores de los ratones disminuyó lentamente de 125 a 135 días (de 21 a 16 puntos) y disminuyó rápidamente después de 135 días (de 16 a 0 puntos); mientras que la escala BBB de las extremidades posteriores de los ratones no tratados en el grupo de control disminuyó rápidamente después de 110 días (de 19 a 0 puntos). Los resultados anteriores mostraron que la butilidenftalida en realidad puede retrasar la aparición de la esclerosis lateral amiotrófica.

[Ejemplo 4] Tinción histoquímica: butilidenftalida puede retrasar y/o prevenir la muerte de las neuronas motoras espinales

Los ratones transgénicos SOD1-G93A (60 días de edad) se trataron con butilidenftalida por administración oral, con una dosificación de 500 mg/kg-peso corporal una vez al día. Los ratones transgénicos SOD1-G93A en el grupo experimental se sacrificaron *in extremis*, y la médula espinal se recogió para realizar tinción con hematoxilina y eosina. El número de las neuronas motoras en la médula espinal se observó y se contó mediante el uso de un microscopio, y los datos se compararon con los del grupo de control no tratado.

Como se muestra en la figura 5A, figura 5B y tabla 4, el número de las neuronas motoras espinales de los ratones transgénicos SOD1-G93A de 60 días de edad en el grupo experimental tratado con butilidenftalida todos los días fue significativamente mayor que el del grupo control (el número del grupo experimental: 24; el número del grupo de control: 3). Los resultados anteriores muestran que la butilidenftalida puede retrasar y/o prevenir efectivamente la muerte de las neuronas motoras espinales, aumentando así la tasa de supervivencia de los ratones transgénicos SOD1-G93A.

Tabla 4

	La cantidad de las neuronas motoras
Grupo de control	$3 \pm 3,1$
Grupo experimental (n-BP, 500 mg/kg-peso corporal)	$24 \pm 4,2$

[Ejemplo 5] Análisis de bandas Western: la butilidenftalida puede inhibir la autofagia

Los ratones transgénicos SOD1-G93A (60 días de edad) se trataron con butilidenftalida por administración oral, con una dosificación de 500 mg/kg-peso corporal una vez al día. Se ha indicado por investigación que los ratones transgénicos SOD1-G93A perdieron sus neuronas motoras espinales debido al aumento significativo de la autofagia durante la última fase de la esclerosis lateral amiotrófica (que se puede observar en imágenes ópticas *in vivo* de autofagia de las neuronas motoras en un modelo de ratón de la esclerosis lateral amiotrófica. Autofagia 7: 9, 1-8; septiembre de 2011, que se incorpora por completo en el presente documento por referencia). Por lo tanto, en este ejemplo, los ratones transgénicos SOD1-G93A en el grupo experimental se sacrificaron *in extremis* para recolectar su médula espinal, y las proteínas se extrajeron de la médula espinal para realizar bandas Western y analizar el biomarcador de proteínas de autofagia, LC3-II, que se usó para determinar si se producía autofagia en las neuronas motoras espinales lumbares de los ratones, en el que se usó β -actina como control interno.

Como se muestra en la figura 6, en comparación con los ratones no tratados en el grupo de control, el nivel de expresión de proteína de LC3-II y pLC3-II en la médula espinal cervical, la médula espinal torácica y la médula

espinal lumbar de los ratones en el grupo experimental disminuyó significativamente. Los resultados anteriores muestran que la butilidenftalida puede inhibir específicamente la autofagia de las neuronas motoras en el organismo y, por lo tanto, retrasa la aparición de la esclerosis lateral amiotrófica, alarga los días de supervivencia de los ratones y logra el efecto de curar la esclerosis lateral amiotrófica.

5 [Ejemplo 6] Experimento celular: la butilidenftalida puede inhibir la autofagia

El experimento celular se realizó mediante el uso de NSC (células madre neurales) que pueden diferenciarse en neuronas motoras de ratón para imitar las neuronas motoras del ratón.

10 Las NSC se incubaron en una placa de cultivo (10 cm de diámetro). Las células se lavaron con PBS cuando se cultivaron hasta una densidad del 60 % de confluencia, y se trataron con diferentes concentraciones de butilidenftalida durante 12 horas. A continuación, las células se trataron con H₂O₂ (2500 µM/ml) durante 12 horas para estimular la autofagia de las células. A continuación, se recogieron las células y se extrajeron las proteínas, y
15 se analizó el nivel de expresión de proteína de LC3-II en NSC mediante SDS-PAGE y bandas Western. El resultado de las bandas Western se muestra en la figura 7.

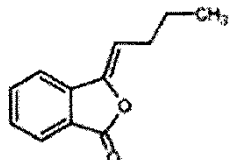
Como se muestra en la figura 7, 10 µg/ml de butilidenftalida puede proteger y prevenir las NSC contra daños de H₂O₂ al inhibir la autofagia (disminuir el nivel de expresión de la proteína de LC3-II).

20 Los ejemplos anteriores se usan para ilustrar el principio y la eficacia de la presente invención y muestran las características inventivas de la misma. Las personas expertas en este campo pueden proceder con una variedad de modificaciones y sustituciones basándose en las divulgaciones y sugerencias de la invención descritas sin apartarse del principio y espíritu de la misma. Por lo tanto, el alcance de la protección de la presente invención es tal como se
25 define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

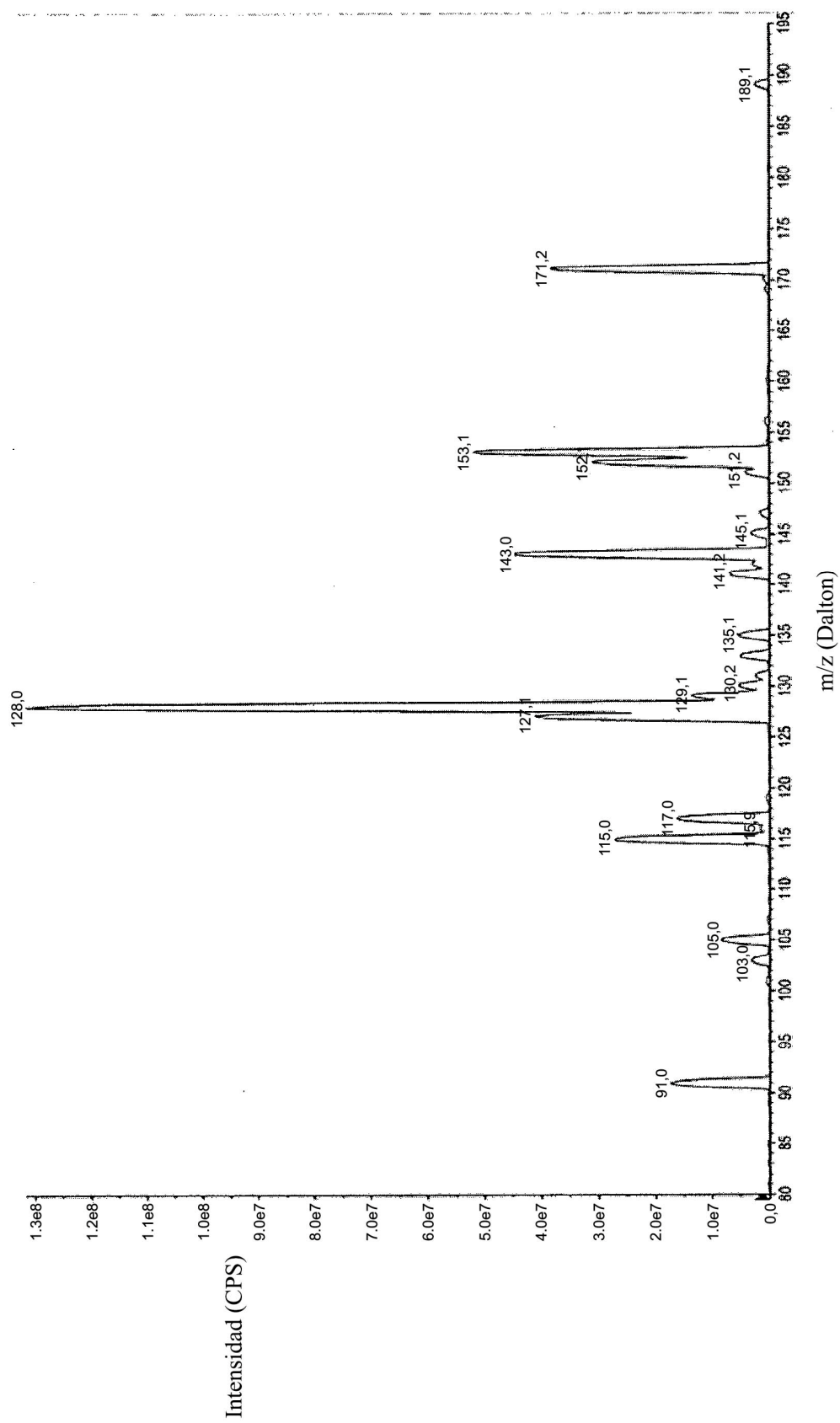
1. Una composición farmacéutica para su uso para curar y/o retrasar la aparición de la esclerosis lateral amiotrófica, que comprende una cantidad eficaz de un componente activo seleccionado del grupo que consiste en butilidenftalida (BP), una sal de butilidenftalida (BP) farmacéuticamente aceptable, y combinaciones de las mismas.

2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el BP es (Z)-BP



3. La composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en la que la composición farmacéutica se administra en una cantidad que varía de aproximadamente 30 mg (como BP)/kg-peso corporal a aproximadamente 2.000 mg (como BP)/kg-peso corporal por día.

4. La composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en la que la composición farmacéutica se administra en una cantidad que varía de aproximadamente 100 mg (como BP)/kg-peso corporal a aproximadamente 1.000 mg (como BP)/kg-peso corporal por día.

FIGURAS**FIG. 1A**

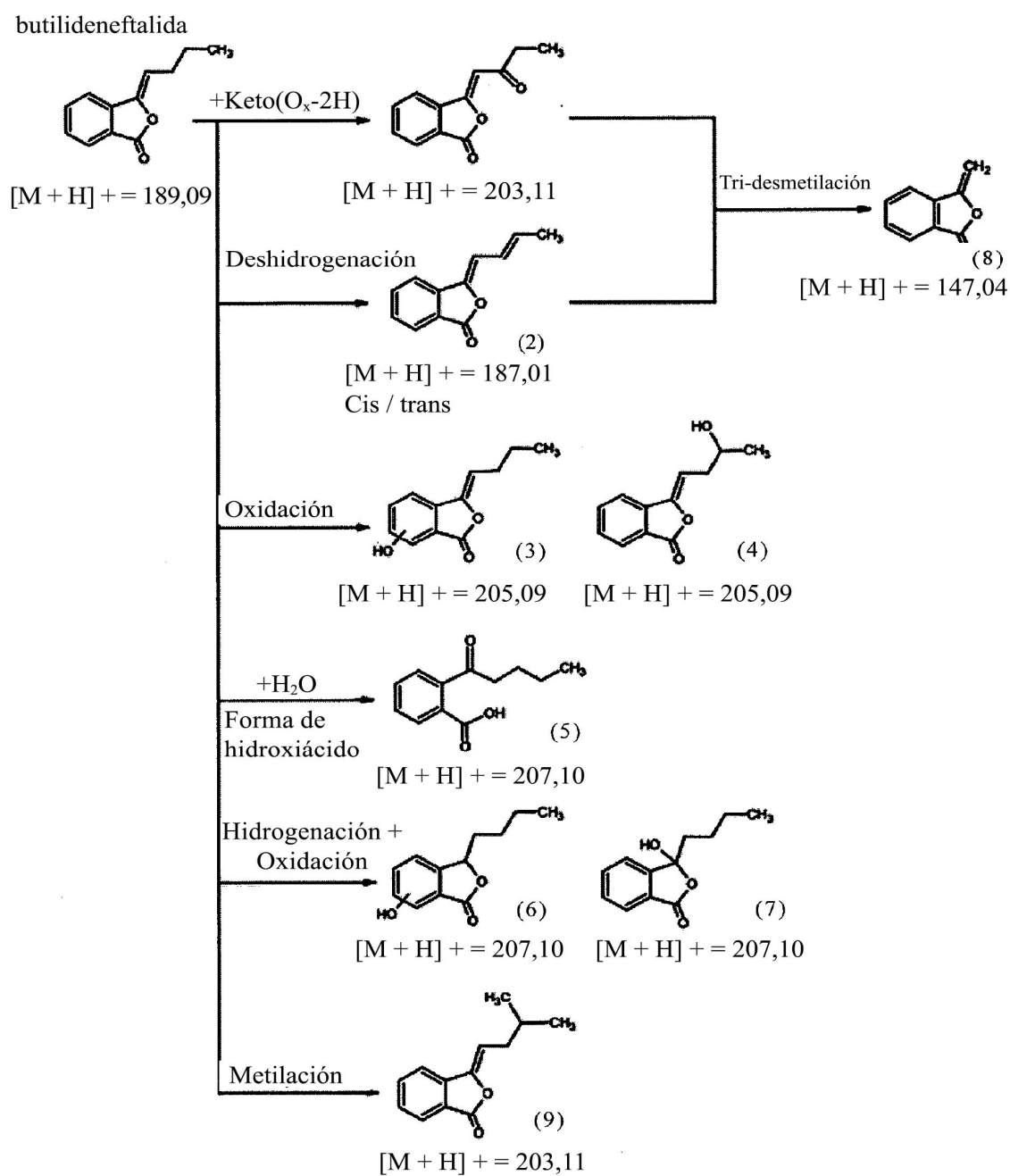


FIG. 1B

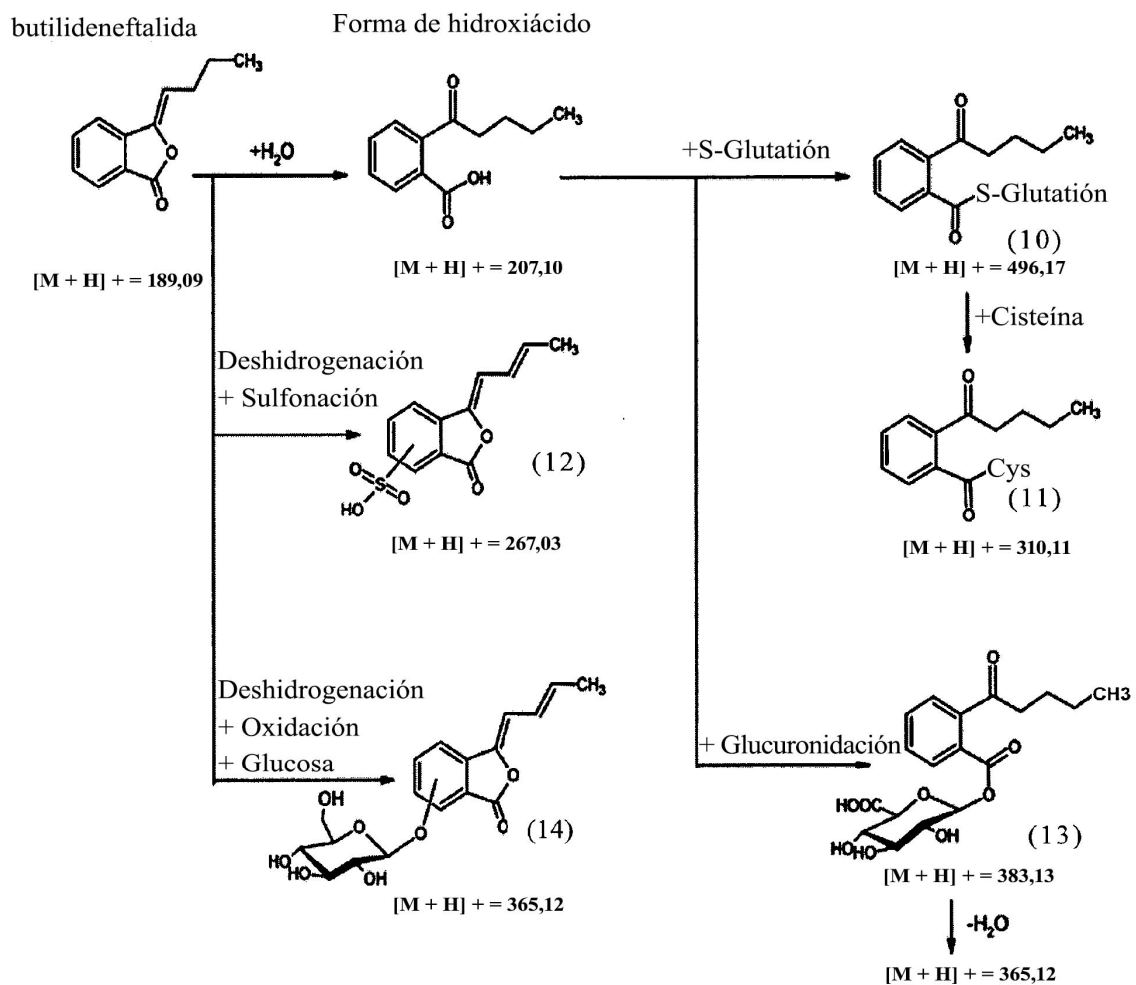


FIG. 1C

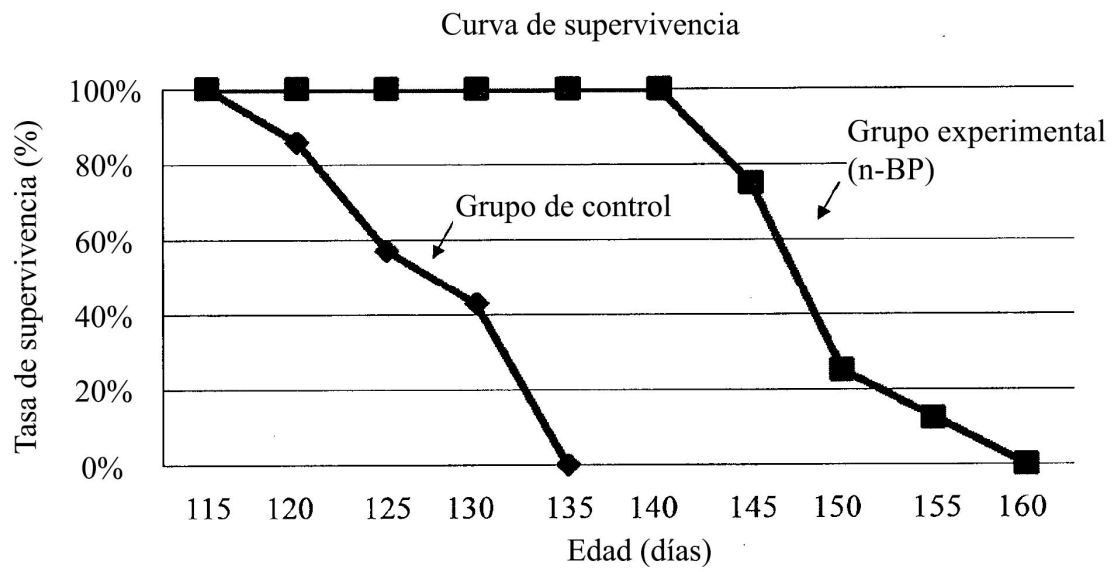


FIG. 2

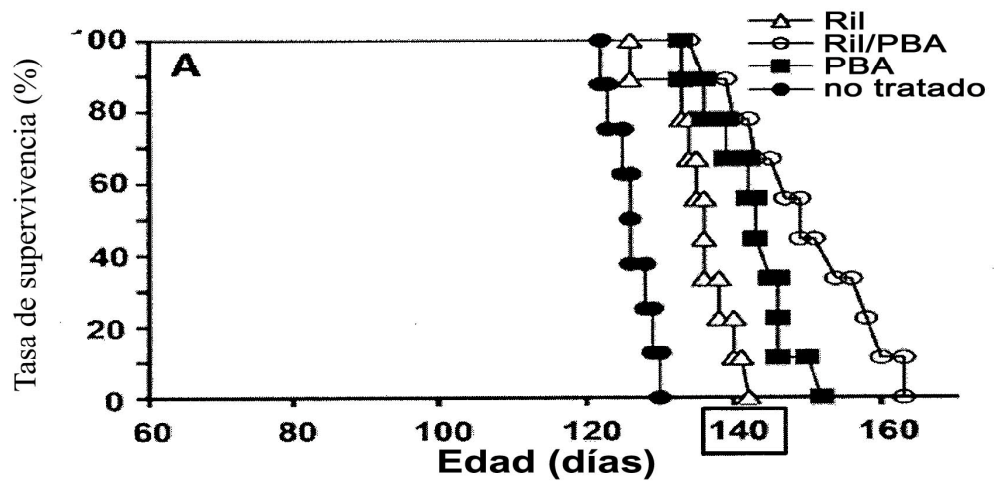


FIG. 3

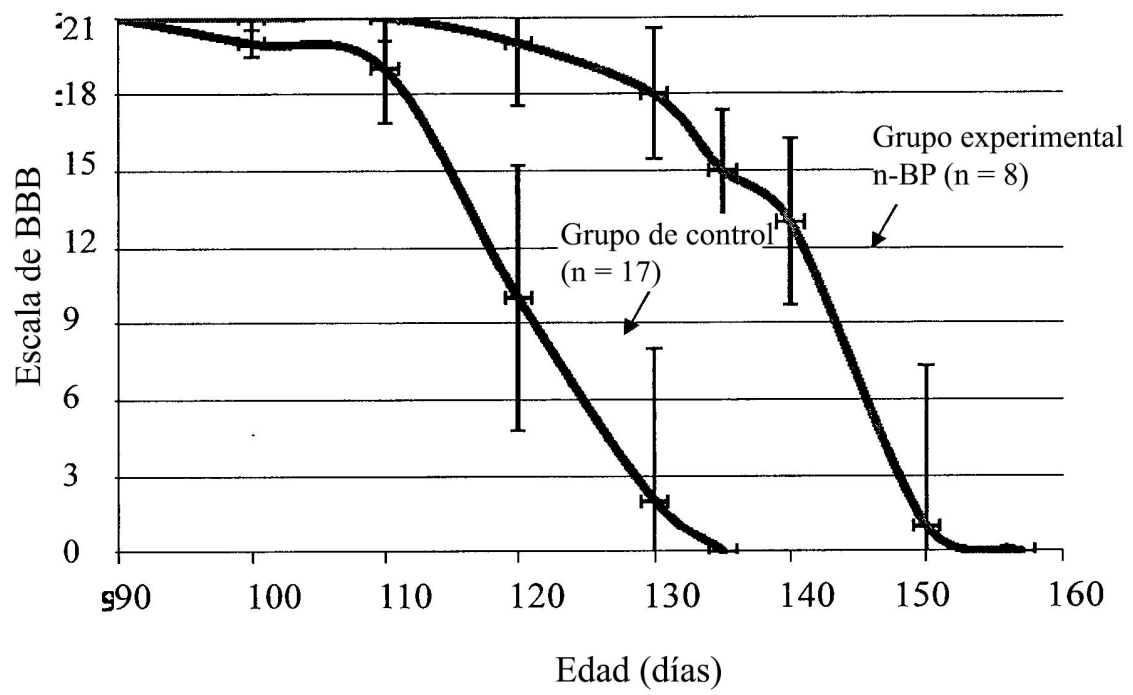
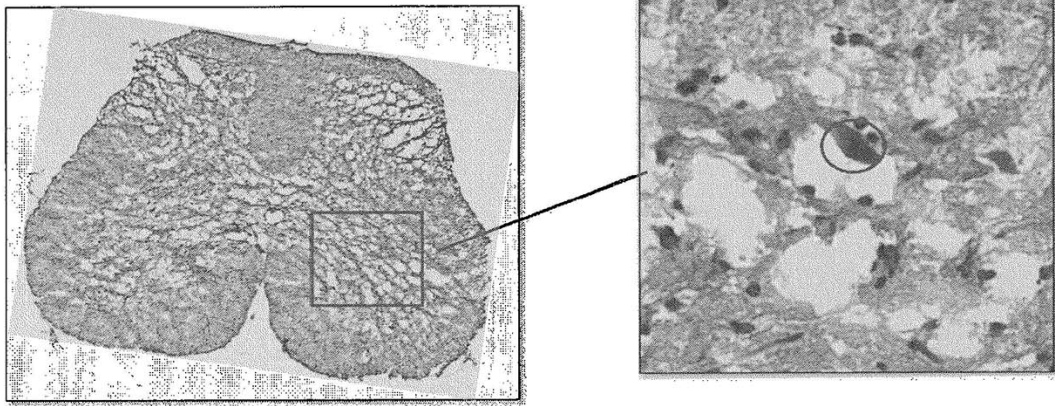
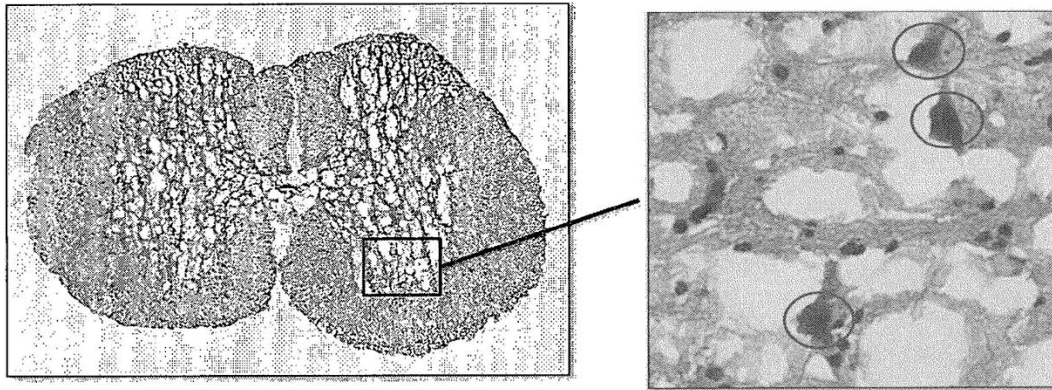


FIG. 4



Grupo de control (sin tratamiento)



Grupo experimental (BP, 500 mg/kg-peso corporal)

FIG. 5A

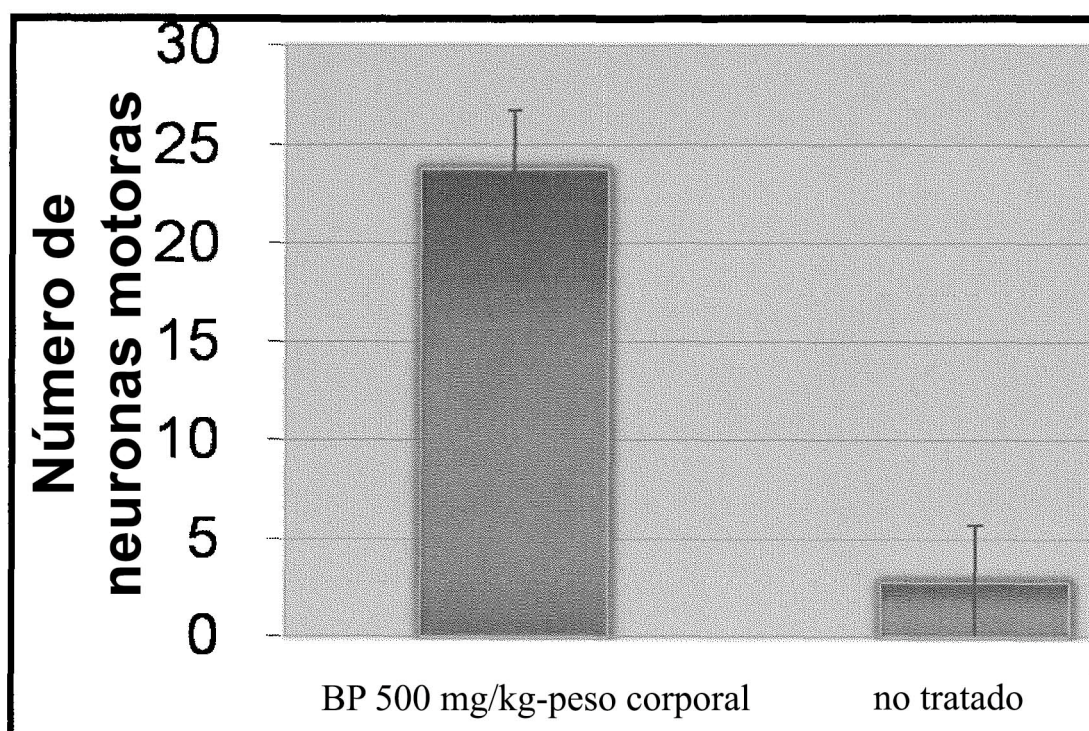


FIG. 5B

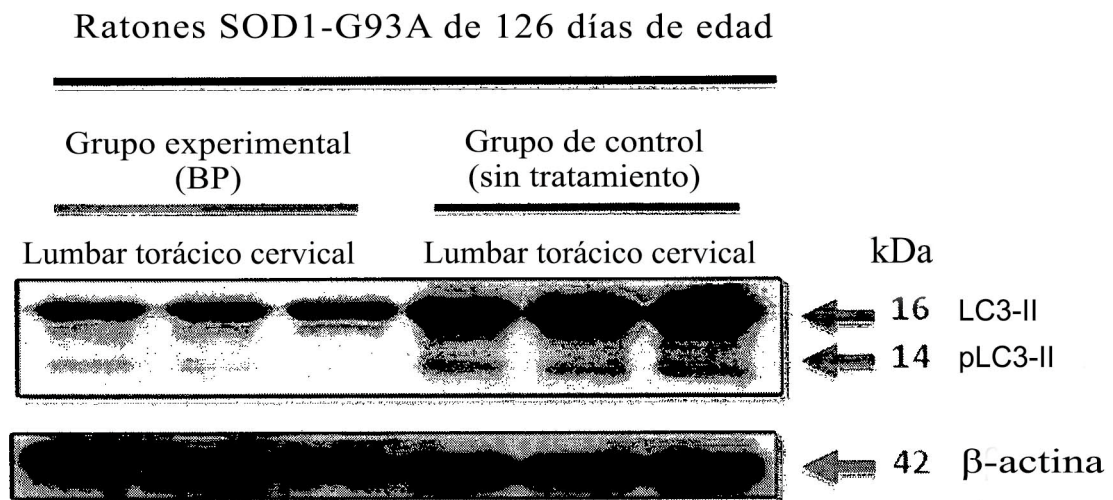


FIG. 6

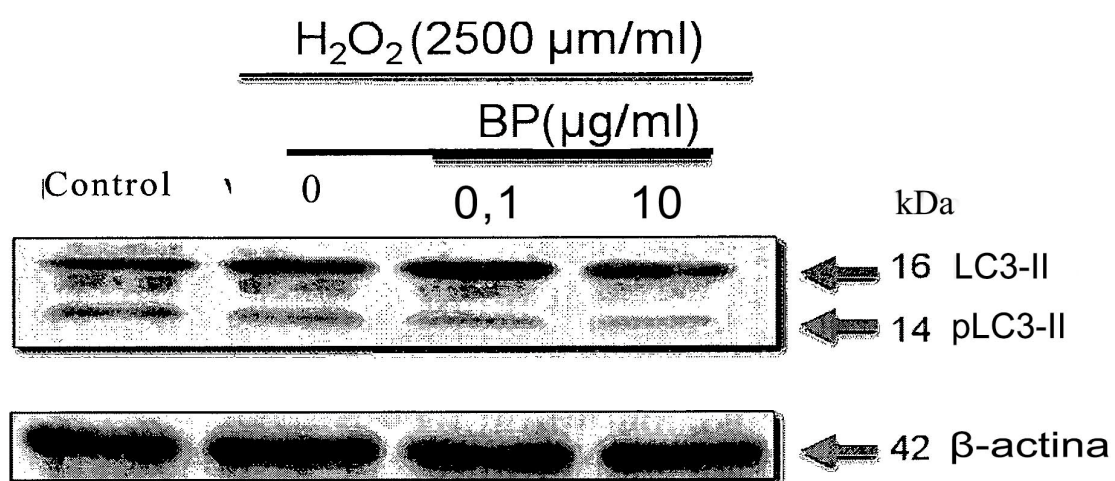


FIG. 7