

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 999**

51 Int. Cl.:

A61K 31/365 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/235 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2014 PCT/CN2014/000155**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14139318**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2014 E 14764587 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2974723**

54 Título: **Aplicación de compuestos ftálicas**

30 Prioridad:

12.03.2013 US 201361777127 P

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

12.06.2018

73 Titular/es:

HAWKING BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.
(100.0%)
11F.-3 No.31 Ln.169 Kangning St. Xizhi Dist.
New Taipei City, TW

72 Inventor/es:

LIN, SHINN-ZONG;
HARN, HORNG-JYH;
CHIOU, TZYU-WEN;
HSUEH, KUO-WEI y
HUANG, MAO-HSUAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 671 999 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

Aplicación de compuestos ftalidas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de una ftalida, especialmente al uso de una ftalida en la fabricación de un medicamento para aumentar el nivel de expresión de al menos uno entre telomerasa, factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDK), factor 1 derivado de células estromales (FDCE1), receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4), y un factor inmunorregulador en una célula madre, en particular el uso de una ftalida en la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o para retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.

Descripciones de la técnica relacionada

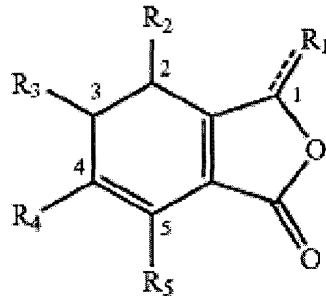
10 Una neurona, también conocida como célula nerviosa, es una de las unidades estructurales y funcionales del sistema nervioso de un organismo. Las neuronas pueden transmitir mensajes a otras células mediante señales químicas y eléctricas. Las neuronas pueden variar en forma y tamaño, y los diámetros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

20 Las neuronas se pueden clasificar en tres tipos dependiendo de sus funciones y las direcciones de transmisión de las señales: 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 son conocidas como neuronas motoras superiores, mientras que las neuronas motoras en el tronco encefálico y la médula espinal son conocidas como neuronas motoras inferiores. Las funciones anormales causadas por la degeneración de las neuronas motoras pueden dar lugar a enfermedades degenerativas de las neuronas motoras, tales como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miastenia gravis, miastenia, atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis múltiple, atrofia sistémica múltiple y distrofia muscular espinal. Los pacientes que padecen las
25 mencionadas enfermedades degenerativas de las neuronas motoras mostrarán gradualmente síntomas tales como debilidad muscular, atrofia, temblores, calambres, rigidez, lo que puede provocar dificultad para hablar, dificultad para tragar e insuficiencia respiratoria.

30 La verdadera causa de las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras aún es incierta hasta la fecha. Sin embargo, las investigaciones demostraron que las posibles causas de las enfermedades incluyen muerte neuronal causada por autofagia excesiva estimulada por la acumulación de aniones superóxido, trastorno autoinmune, excitación excesiva de neuronas (p. ej., acumulación excesiva de glutamatos), oxidación excesiva de neuronas, herencia, etc. Las medicinas utilizadas actualmente en la clínica para tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras incluyen antagonistas de glutamato, tales como Riluzol, antioxidantes, tales como vitamina E, factores neurotróficos, inmoduladores, etc. Sin embargo, las medicinas antes mencionadas no tienen
35 generalmente efectos terapéuticos significativos o solo pueden prolongar la vida de los pacientes durante 3 a 6 meses.

40 Además, las investigaciones descubrieron que una célula madre puede diferenciarse en una célula neuronal, lo que da esperanzas para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso, tales como enfermedad de Parkinson, apoplejía, lesión cerebral y lesión medular. Por ejemplo, las investigaciones descubrieron que una célula madre puede atravesar la barrera hematoencefálica por medio de una inyección intravenosa (es decir, trasplante intravenoso) para aliviar la neurodegeneración causada por el envejecimiento y puede reparar y reconstruir el la función cerebrovascular dañada para mantener la normalización y/o el rejuvenecimiento de los nervios craneales. Es más, las investigaciones revelaron que una terapia con células madre ha demostrado un efecto terapéutico evidente en numerosos pacientes que padecen atrofia cerebral y enfermedad de Alzheimer combinadas. Sin embargo, las
45 investigaciones mencionadas anteriormente también mostraron que la terapia con células madre no tiene ningún efecto terapéutico significativo sobre las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras o solo puede proporcionar un efecto limitado, tal como la prolongación de la longevidad de los ratones que padecen ELA a aproximadamente 140 días (véase "Garbuzova-Davis y col., *Human umbilical cord blood treatment in a mouse model of ALS: optimization of cell dose*, 2008", que se incorpora por completo en la presente memoria por referencia). Por lo tanto, todavía existe la necesidad de un medicamento para tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o para retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.

50 El documento US 2011/0177106 A1 desvela un procedimiento de tratamiento de un sujeto para reducir la inflamación y/o para modular una respuesta inmunitaria, en el que dicho procedimiento comprende la administración, a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento, de una cantidad eficaz de un compuesto aislado que tiene la siguiente fórmula:



en la que

— — — — — representa un enlace simple carbono-carbono o un doble enlace carbono-carbono;

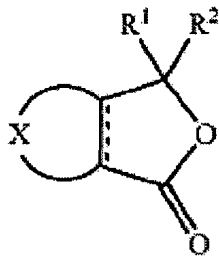
R₁ es alquilo o CR₆, en el que R₆ es alquilo, acilo, haloalquilo, alquilamino o hidroxilalquilo;

R₂, R₃ y R₄ son, independientemente, H, acilo, halo, haloalquilo, amino, alquilamino, hidroxilo, alquilo, hidroxilalquilo, o ---COOH; y

R₅ es ---H, alquilo, halo, haloalquilo, amino, alquilamino, hidroxilalquilo, o ---COOH.

El documento US 2009/0176873 A1 desvela un procedimiento de control o tratamiento de afecciones que requieren la modulación de la inflamación en un mamífero que comprende la administración a un mamífero en necesidad de dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un compuesto representado por la fórmula (I)

(I)

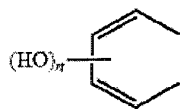


en la que

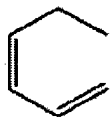
la línea de puntos es un enlace opcional;

R¹ es butilo o butirilo si R² es hidroxilo pero es butilo si R² es hidrógeno; o R¹ y R², tomados en conjunto, son 1-butilideno opcionalmente sustituido con hidroxilo, metilo o 3-(a,(3-dimetilacrililo)-pentilideno);

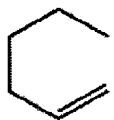
X es un residuo seleccionado entre el grupo que consiste en X1, X2, X3, X4 y X5;



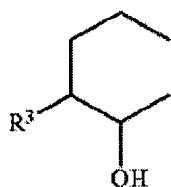
X1



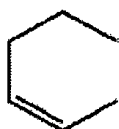
X2



X3



X4



X5

- 5 en la que
 X es X2, X3 o X5 si la línea de puntos en la fórmula (I) está ausente;
 y X es X1, X4 o X5 si la línea de puntos significa un enlace en la fórmula (I) anterior;
 R³ es hidroxilo o butirilo; y
 n es 1 o 2.

El documento US 2012/0020930 A1 desvela un procedimiento de preparación de células madre de tejido adiposo que comprende exponer dichas células madre derivadas de tejido adiposo a un antagonista o inhibidor CD26.

- 10 Los inventores de la presente invención descubrieron que la ftalida puede aumentar los niveles de expresión de la telomerasa, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor 1 derivado de células estromales, receptor 4 de quimiocina CXC y/o un factor inmunorregulador (tal como interleucina 6 e interleucina 8) en una célula madre. Además, un uso combinado de una ftalida y una célula madre puede proporcionar un efecto en el tratamiento y/o retraso de la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.

15 Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un uso de una ftalida en la fabricación de un medicamento para aumentar el nivel de expresión de al menos uno entre telomerasa, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor 1 derivado de células estromales, receptor 4 de quimiocina CXC y un factor inmunorregulador en una célula madre.

- 20 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un kit, que comprende: una primera composición que comprende una ftalida; y una segunda composición que comprende una célula madre, en la que la primera composición y la segunda composición se van a administrar de forma simultánea o por separado a un sujeto en necesidad.

- 25 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un uso de un precursor metabólico de una ftalida en la fabricación de un medicamento para tratar y/o para retrasar la aparición de una enfermedad degenerativa de las neuronas motoras, en el que el precursor metabólico es 3-butilideno-4,5-dihidroftalida (ligustilida).

La tecnología detallada y las realizaciones preferentes implementadas para la presente invención se describirán en los siguientes párrafos para que los expertos en el campo aprecien adecuadamente las características de la invención reivindicada.

- 30 La presente invención se refleja en las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferentes se describen en las reivindicaciones dependientes.

Breve descripción de los dibujos

- 35 La **Fig. 1** muestra el metabolismo de la n-butilidenftalida (BP) en un organismo, en la que la **Fig. 1A** es un espectro LC-MS/MS de la muestra de una mezcla de la reacción de la BP y microsomas hepáticos humanos, la **Fig. 1B** es un perfil metabólico que muestra el metabolismo en fase I de la BP en un organismo, y la **Fig. 1C** es un perfil metabólico que muestra el metabolismo en fase II de la BP en un organismo;
 La **Fig. 2** es un diagrama de curvas que muestra el índice de supervivencia de ratones transgénicos SOD1-G93A tratados con diferentes condiciones;
 La **Fig. 3** es un diagrama de curvas que muestra las curvas a escala de BBB de ratones transgénicos SOD1-G93A tratados con diferentes condiciones;
 40 La **Fig. 4** es un diagrama de barras que muestra los niveles de expresión de la telomerasa de células madre tratadas con diferentes ingredientes;
 La **Fig. 5** es una imagen de electroforesis que muestra los niveles de expresión génica de FNDC, FDCE1, CXCR4, IL-6 e IL-8 en células madre tratadas con diferentes ingredientes; y
 45 La **Fig. 6** muestra los niveles de expresión proteica en los ratones transgénicos SOD1-G93A tratados con una combinación de BP y células madre, en la que la **Fig. 6A** es una imagen que muestra la tinción

inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo anti-mitocondrial humano, la **Fig. 6B** es una imagen que muestra la tinción inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo anti-FNDC humano, y la **Fig. 6C** es una imagen que muestra la tinción inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo anti-CXCR4 humano.

Descripción detallada de la invención

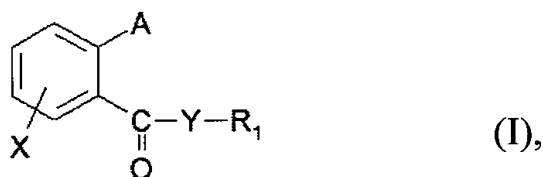
5 Lo siguiente describirá algunas realizaciones de la presente invención en detalle. Sin embargo, sin apartarse del espíritu de la presente invención, la presente invención puede realizarse de diversas formas y no debe limitarse a las realizaciones descritas en la memoria descriptiva. Además, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria, el término "un", "una", "el", "la", o similares que se menciona en la memoria descriptiva de la presente invención (especialmente en las reivindicaciones) debe incluir tanto las formas en singular como en plural. La expresión "opcionalmente sustituido" u "opcionalmente reemplazado" utilizada en la presente memoria descriptiva debe incluir tanto las condiciones de ser sustituido o reemplazado como las de no ser sustituido o reemplazado. Además, la expresión "cantidad eficaz" utilizada en la presente memoria descriptiva se refiere a la cantidad del compuesto que puede aliviar al menos parcialmente la afección que se está tratando en un sujeto sospechoso cuando se administra al sujeto. El término "sujeto" utilizado en la presente memoria descriptiva se refiere a un mamífero, que incluye animales humanos y no humanos. La expresión "mg/peso corporal en kg" utilizada en la presente memoria descriptiva se refiere a la dosificación (mg) requerida por peso corporal en kg. El término "hidrocarbilo" utilizado en la presente memoria descriptiva se refiere a un hidrocarbilo saturado o a un hidrocarbilo no saturado con uno o más π -enlaces. La expresión "terapia con células madre" utilizada en la presente memoria descriptiva se refiere a cualquier terapia que comprende la administración de cualquier manera a un sujeto de una célula madre.

El telómero es una región de secuencias de nucleótidos repetitivas en cada extremo de una cromátida. Se sabe que la longitud de los telómeros puede determinar la longevidad de una célula. La telomerasa es una transcriptasa inversa y puede extender la longitud de los telómeros y, de este modo, desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento celular, en el mantenimiento de la homeostasis celular y en la inhibición de la apoptosis celular. Como se ha descrito anteriormente, investigaciones previas revelaron que una terapia con células madre no tiene un efecto terapéutico significativo sobre las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras, lo que probablemente se deba al corto ciclo de vida de las células madre trasplantadas. Por lo tanto, si el ciclo de vida de las células madre trasplantadas puede prolongarse (p. ej., la actividad de la telomerasa es potenciada), se puede mejorar el efecto terapéutico de las células madre sobre las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.

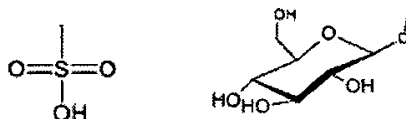
Además, en terapias con células madre, se sabe que el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), el factor 1 derivado de células estromales (FDCE1) y el receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) secretado por células madre tienen un efecto sobre la inhibición de la apoptosis de las neuronas motoras y la promoción de la proliferación de las neuronas motoras, y de este modo, se puede utilizar para proteger las neuronas motoras (los efectos de FNDC y FDCE1 en las neuronas se pueden ver en "Park, D. y col., *Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve cognitive function and physical activity in ageing mice. J Neurosci Res*, 2013", que está incorporado por completo en la presente memoria por referencia). En otro aspecto, se sabe que los factores inmunorreguladores secretados por las células madre, tales como interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), pueden mantener la neurogénesis mediante la regulación de la respuesta inmunitaria (las investigaciones acerca del mantenimiento de la neurogénesis mediante la regulación de las respuestas inmunitarias puede verse en "Kohman, R.A. y col., *Neurogenesis, inflammation and behavior*". *Brain Behav Immun*, 2013. 27 (1): págs. 22-32", que está incorporado por completo en la presente memoria por referencia). Por consiguiente, si se pueden aumentar los niveles de expresión de FNDC, FDCE1, CXCR4 y/o factores inmunorreguladores (p. ej., IL-6, IL-8) en una célula madre, puede mejorarse el efecto terapéutico de la terapia con células madre sobre las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.

Los inventores de la presente invención descubrieron que una ftalida puede aumentar los niveles de expresión de la telomerasa, FNDC, FDCE1, CXCR4, y/o un factor inmunorregulador (p. ej., IL-6 y/o IL-8) en células madre.

Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de una ftalida en la fabricación de un medicamento para aumentar el nivel de expresión de al menos uno entre telomerasa, FNDC, FDCE1, CXCR4 y un factor inmunorregulador (tal como IL-6 e IL-8) en una célula madre. Según la invención, la ftalida se selecciona entre el grupo: n-butilidentalida (BP), 3-butilideno-4,5-dihidroftalida (ligustilida), y combinaciones de los mismos. Cuando el medicamento se administra a un sujeto tratado con una terapia con células madre (es decir, un sujeto administrado con una célula madre) o un sujeto a ser tratado con una terapia con células madre (es decir, un sujeto a ser administrado con una célula madre), la ftalida puede aumentar los niveles de expresión de la telomerasa, FNDC, FDCE1, CXCR4 y/o un factor inmunorregulador en una célula madre, y de este modo, puede prolongar el ciclo de vida de las células madre, inhibir la apoptosis de las neuronas motoras y/o promover la proliferación de las neuronas motoras, y puede tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras. La ftalida como se desvela en la presente memoria puede ser al menos uno seleccionado entre el siguiente grupo: 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:

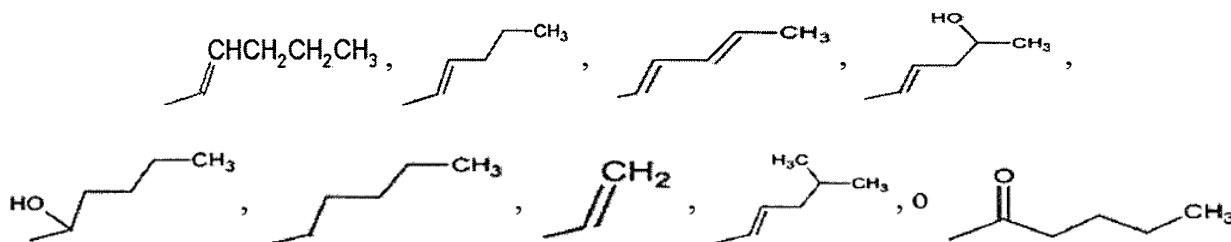


en el que, A es un hidrocarbilo C1-C5 que está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes

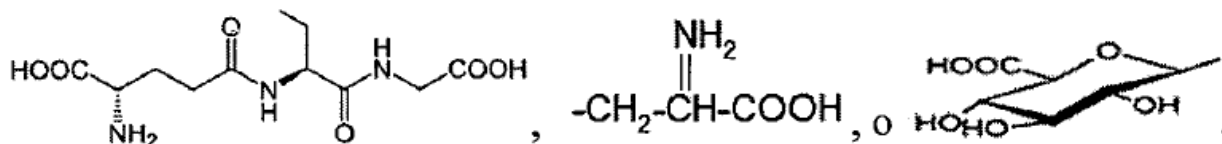


5 seleccionado entre -OH, =O, e hidrocarbilo C1-C3; X es H, -OH, o; R₁ es H o un hidrocarbilo C1-C20 sustituido o no sustituido, en el que uno o más -CH₂- en el hidrocarbilo están opcionalmente reemplazados con -NH- o -O-; Y es O o S y opcionalmente se une con A para formar un anillo de cinco miembros, con la condición de que cuando Y se une con A para formar un anillo de cinco miembros, R₁ no está presente.

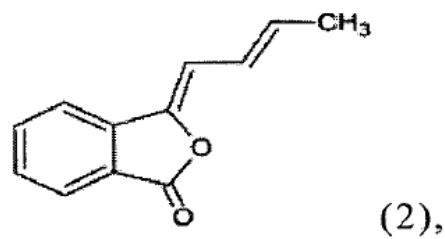
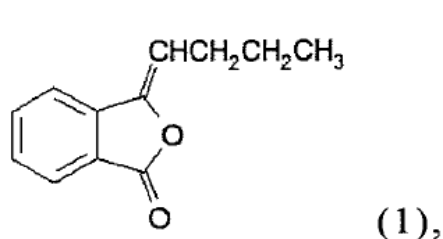
10 La ftalida desvelada en la presente memoria también comprende un compuesto de fórmula (I), en la que A es un alquilo o alqueno C1-C5 que está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre -OH, =O y alquilo C1-C3; y R₁, si está presente, es H o un hidrocarbilo C1-C10 sustituido o no sustituido, en el que uno o más -CH₂- en el hidrocarbilo están opcionalmente reemplazados con -NH- o -O-. Preferentemente, en el compuesto de fórmula (I), A es

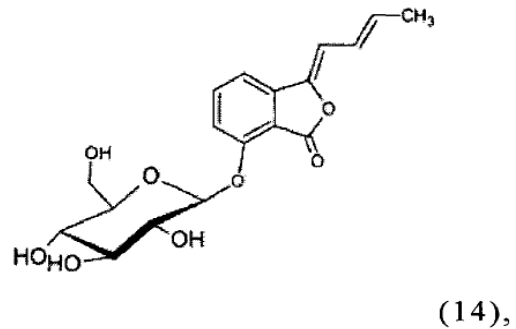
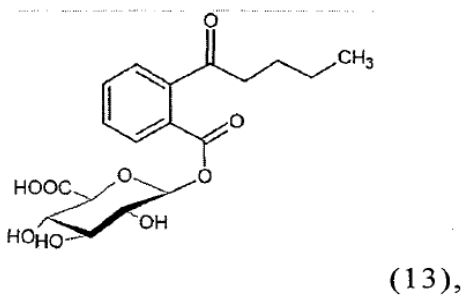
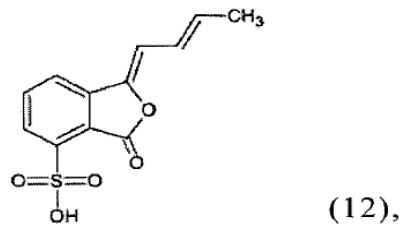
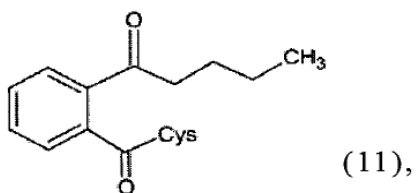
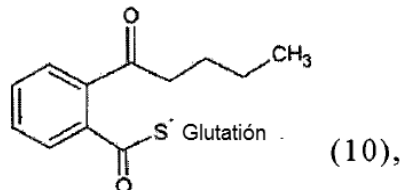
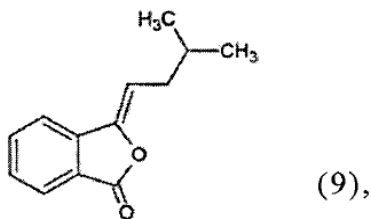
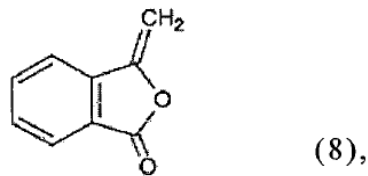
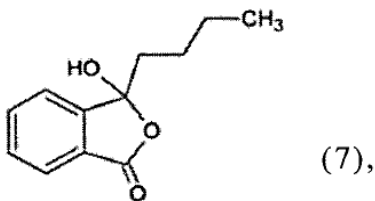
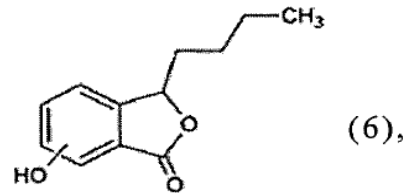
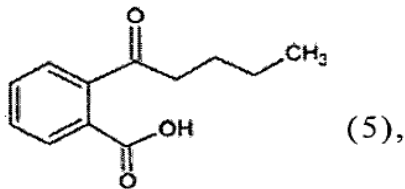
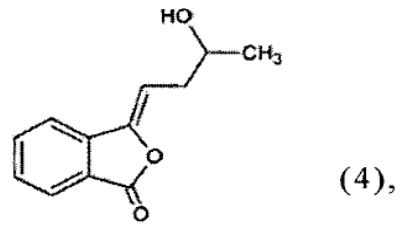
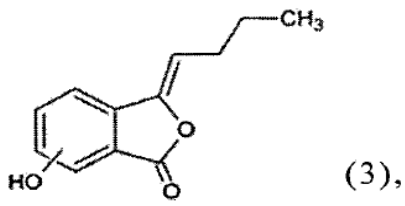


15 ; y R₁, si está presente, es H,



Más específicamente, la ftalida como se desvela en la presente memoria se puede seleccionar entre el grupo que consiste en los siguientes Compuestos (1) a (14), una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, un éster farmacéuticamente aceptable de los mismos y combinaciones de los mismos:





5 en el que "Cys" en el Compuesto (10) se refiere a cisteína. Según la invención, la falida se selecciona entre el grupo: n-butilidenftalida (BP), 3-butilideno-4,5-dihidroftalida (ligustilida), y combinaciones de los mismos. Los inventores de la presente invención descubrieron que la n-butilidenftalida, cuando se administra a un organismo, puede aumentar los niveles de expresión de la telomerasa, FNDC, FDCE1, CXCR4, y/o un factor inmunorregulador

en las células madre del organismo. En los Compuestos (1) a (14) anteriores, el Compuesto (1) es n-butilidenoftalida (BP), y los Compuestos (2) a (14) son metabolitos de BP, a saber, los compuestos generados por el metabolismo en fase I o fase II de BP en un organismo como se ilustra por los ejemplos proporcionados más adelante en la presente memoria descriptiva. Se cree que la actividad farmacéutica de un compuesto en un organismo podría ser atribuible a los metabolitos del compuesto. Por lo tanto, se prefiere que la ftalida utilizada en la presente invención se seleccione entre el siguiente grupo: Compuestos (1) a (14), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.

Además del compuesto de fórmula (I), la ftalida utilizada en la presente invención podría ser otro análogo estructural de BP, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un éster farmacéuticamente aceptable del mismo o una combinación de los mismos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" utilizada en la presente memoria descriptiva se refiere a una sal farmacéuticamente aceptable formada por un compuesto mencionado anteriormente que tiene grupo(s) funcional(es) ácido(s) y una base orgánica o inorgánica. Las sales formadas con bases inorgánicas incluyen, entre otros, sales de metales alcalinos (p. ej., sales de sodio, sales de potasio), sales de metales alcalinotérreos (p. ej., sales de calcio, sales de magnesio), sales de metales de transición (p. ej., sales de hierro, sales de cinc, sales de cobre, sales de manganeso y sales de aluminio) y sales de amonio. Las sales formadas con bases orgánicas incluyen, entre otros, las sales formadas con metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, isopropilamina, tripropilamina, tributilamina, etanolamina, dietanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperidina, N-etilpiperidina, compuestos de tetrametilamonio, compuestos de tetraetilamonio, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dicitclohexilamina, dibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina, 1-efenamina, N,N'-dibenciletilendiamina y resinas de poliamina.

La expresión "éster farmacéuticamente aceptable" utilizada en la presente memoria descriptiva incluye un éster formado a partir de la reacción de un ácido y un compuesto mencionado anteriormente que tiene como tal grupo(s) -OH funcional(es). El ácido puede ser un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido nítrico y ácido fosfórico, o un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido benzenosulfónico, ácido benzoico, ácido butírico, ácido canfórico, ácido canforsulfónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido diglucónico, ácido etanosulfónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido glicerofosfórico, ácido hemisúlfico, ácido hexanoico, ácido fórmico, ácido 2-hidroxietano-sulfónico (ácido isetiónico), ácido láctico, ácido hidroximaleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido mesitilensulfónico, ácido metanosulfónico, ácido naftalensulfónico, ácido nicotínico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido oxálico, ácido pamoico, ácido pectínico, ácido fenilacético, ácido 3-fenilpropiónico, ácido pivalico, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfanílico, ácido tartárico, ácido p-toluensulfónico y ácido undecanoico.

La expresión "análogo estructural de BP" utilizada en la presente memoria descriptiva se refiere a un compuesto que no es idéntico a BP, pero es parcial o totalmente similar a parte o la totalidad de BP en términos de estructura química, distribución de electrones y/o características farmacéuticas. Además del compuesto de fórmula (I), los ejemplos de un análogo estructural de BP incluyen, entre otros, un precursor metabólico de BP, un isómero de BP o un isómero de un precursor metabólico de BP, y una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos. La expresión "precursor metabólico de BP" utilizada en la presente memoria descriptiva se refiere a un compuesto cuyo metabolismo en un organismo generará BP. Los ejemplos específicos de un análogo estructural de BP incluyen, entre otros, 3-butilideno-4,5-dihidroftalida (ligustilida) y 3-butil-3a,4,5,7a-tetrahidro-1(3H)-isobenzofuranona (cnidilida).

En algunas realizaciones de la presente invención, la ftalida utilizada en la presente invención es 3-butilideno-4,5-dihidroftalida.

En el uso de la presente invención, la célula madre puede ser cualquier célula madre adecuada para una terapia con células madre, tal como una célula madre seleccionada entre el siguiente grupo: una célula madre embrionaria, una célula madre adulta (p. ej., una célula madre mesenquimal), una célula madre hematopoyética), una célula madre pluripotente inducida (CMPi) y combinaciones de las mismas. Los ejemplos de células madre mesenquimales incluyen, entre otros, una célula madre de médula ósea, una célula madre de sangre de cordón umbilical, una célula madre de placenta, una célula madre derivada de tejido adiposo (CMDTA), una célula madre oral, una célula madre de bulbo olfativo, una célula madre de líquido amniótico, una célula madre amniótica, una célula madre de cordón umbilical y una célula madre que recubre el cordón umbilical. En algunas realizaciones del uso de la presente invención, la célula madre es una célula madre derivada de tejido adiposo.

Como se ha descrito anteriormente, en el uso de la presente invención, el medicamento proporcionado es eficaz para aumentar los niveles de expresión de la telomerasa, FNDC, FDCE1, CXCR4 y un factor inmunorregulador (p. ej., IL-6, IL-8) en una célula madre, y de este modo, puede utilizarse para prevenir la apoptosis de las neuronas motoras, proteger las neuronas motoras y/o promover la proliferación de las neuronas motoras, y puede utilizarse para tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o para retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.

En algunas realizaciones, el medicamento proporcionado por la presente invención se utiliza para tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o para retrasar la aparición de las enfermedades. Las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras incluyen cualquier enfermedad relacionada con la degeneración de las neuronas motoras incluyendo, entre otros, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miastenia gravis, atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis múltiple, atrofia sistémica múltiple y atrofia muscular espinal.

Según una realización de la presente invención, el medicamento se puede utilizar para tratar ELA. Se sabe que los pacientes que padecen ELA mostrarán gradualmente atrofia muscular, que generalmente causa cuadriplejía, dificultad para tragar e incluso insuficiencia respiratoria en 2 a 5 años desde la aparición de la enfermedad. Las investigaciones mostraron que ELA puede ser relevante para la excitación excesiva de las neuronas (p. ej., acumulación excesiva de glutamatos). Por lo tanto, en la actualidad, el antagonista del glutamato, tal como Riluzol, se utiliza principalmente en la clínica para tratar ELA y aumentar el índice de supervivencia de los pacientes. En comparación con la administración de Riluzol, el medicamento proporcionado por la presente invención puede retrasar de manera más eficaz la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y aumentar el índice de supervivencia de los pacientes.

En la presente invención, el medicamento puede proporcionarse en cualquier forma adecuada y administrarse de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, el medicamento puede aplicarse mediante administración oral, administración nasal, inyección en el tracto corticoespinal, inyección intratecal, inyección intracerebral, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, y/o inyección subcutánea a un sujeto en necesidad, pero no está limitado de ese modo. Debido a que un medicamento en una forma para administración oral es conveniente para el sujeto a aplicar por sí mismo, en una realización según la presente invención, el medicamento se proporciona en una forma adecuada para administración oral, tal como un comprimido, una cápsula, un gránulo, un polvo, un extracto fluido, una solución, un jarabe, una suspensión, una emulsión o una tintura. Dependiendo de la forma y el fin, el medicamento puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En cuanto a la forma de dosificación adecuada para administración oral, el medicamento puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable que no afectará negativamente a la actividad del componente activo (es decir, la ftalida) comprendida en el mismo, tal como un disolvente, un disolvente oleoso, un diluyente, un estabilizador, un retardador de la absorción, un desintegrante, un emulsionante, un antioxidante, un aglutinante, un lubricante y un absorbente de la humedad. La composición se puede proporcionar en cualquier forma adecuada para administración oral de cualquier manera adecuada.

En cuanto a la forma de dosificación adecuada para inyección en el tracto corticoespinal, inyección intratecal, inyección intracerebral, inyección intravenosa o inyección subcutánea, el medicamento puede comprender uno o más componentes, tales como una solución isotónica, una solución salina tamponada (p. ej., una solución tampón fosfato o solución tampón citrato), un solubilizante, un emulsionante y otros vehículos para fabricar el medicamento como una inyección intravenosa, una inyección intravenosa en emulsión, una inyección en polvo, una inyección en suspensión, o una inyección en suspensión y en polvo.

Además de los adyuvantes anteriores, el medicamento puede comprender opcionalmente otros aditivos, tales como un agente aromatizante, un tónico, un agente colorante, para potenciar el sabor y la percepción visual del medicamento resultante. Para mejorar la capacidad de almacenamiento del medicamento resultante, el medicamento también puede comprender una cantidad adecuada de un conservante, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, etc. Además, el medicamento proporcionado por la presente invención puede comprender opcionalmente uno o más componentes activos, tales como un antioxidante (p. ej., vitamina E), un factor neurotrófico, un inmunomodulador, para potenciar aún más la eficacia del medicamento o para aumentar la flexibilidad y adaptabilidad de aplicación del medicamento proporcionado de este modo, siempre que (el)los otro(s) componente(s) activo(s) no afecte(n) al efecto deseado de la ftalida utilizada en el mismo.

Para hacer que el medicamento proporcionado por la presente invención aumente los niveles de expresión de la telomerasa, FNDC, FDCE1, CXCR4 y/o un factor inmunorregulador (p. ej., IL-6 e IL-8) en una célula madre y así mejorar la eficacia de una terapia con células madre en un sujeto, el medicamento puede administrarse al sujeto antes, después o simultáneamente con la administración de la célula madre al sujeto. En la terapia con células madre anteriormente mencionada, la dosificación de las células madre es preferentemente de aproximadamente 1×10^2 células/sitio de administración a aproximadamente 1×10^{15} células/sitio de administración, y más preferentemente de aproximadamente 1×10^5 células/sitio de administración a aproximadamente 1×10^8 células/sitio de administración. Sin embargo, para los pacientes que padecen afecciones agudas, la dosificación de las células madre se puede aumentar varias veces o varias decenas de veces, dependiendo de la demanda real. Además, en función de la demanda del sujeto a administrar, el medicamento se puede aplicar con varias frecuencias de administración, tales como una vez al día, varias veces al día o una vez durante días. Por ejemplo, cuando se aplica a un cuerpo humano para tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o para retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras, la dosificación del medicamento es preferentemente de aproximadamente 100 mg (como la ftalida)/peso corporal en kg a aproximadamente 1.000 mg (como la ftalida)/peso corporal en kg por día, y más preferentemente de aproximadamente 250 mg (como la ftalida)/peso corporal en kg a aproximadamente 800 mg (como la ftalida)/peso corporal en kg por día. Además, dependiendo de la demanda, la dosificación diaria del medicamento puede ajustarse opcionalmente para administrarse en una o más veces, para

mejorar adicionalmente el efecto terapéutico de la ftalida. Por ejemplo, cuando la dosificación deseada del medicamento es de 500 mg/peso corporal en kg por día, el medicamento puede administrarse una vez a una dosificación de 500 mg/peso corporal en kg o administrarse dos veces al día con una dosificación de 250 mg/peso corporal en kg.

- 5 La presente invención también proporciona un kit, que comprende: una primera composición que comprende una ftalida, y una segunda composición que comprende una célula madre, en el que la primera composición y la segunda composición se van a administrar de forma simultánea o por separado a un sujeto en necesidad. Además, cuando se utiliza el kit de la presente invención, la primera composición y la segunda composición se pueden aplicar opcionalmente con las mismas o diferentes frecuencias de administración, tales como una vez al día, varias veces al día o una vez durante días. Las propiedades, características y las realizaciones preferentes de la ftalida y las células madre están en línea con las descripciones anteriores.

10 El kit de la presente invención puede utilizarse para aumentar el nivel de expresión de al menos uno entre telomerasa, FNDC, FDCE1, CXCR4 y un factor inmunorregulador (p. ej., IL-6 e IL-8) en una célula madre. Por lo tanto, el kit puede utilizarse para prevenir la apoptosis de las neuronas motoras, proteger las neuronas motoras y/o promover la proliferación de las neuronas motoras y, de este modo, puede utilizarse para tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o para retrasar la aparición de las enfermedades. Preferentemente, el kit de la presente invención se utiliza para tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras espinales y/o para retrasar la aparición de las enfermedades. Las enfermedades degenerativas de las neuronas motoras incluyen cualquier enfermedad relacionada con la degeneración de las neuronas motoras, tales como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miastenia gravis, atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis múltiple, atrofia sistémica múltiple y atrofia muscular espinal, pero no se limitan de esa manera. Según una realización de la presente invención, el kit se utiliza para tratar ELA.

15 En el kit de la presente invención, la primera composición y la segunda composición se colocan preferentemente en diferentes envases, tales como diferentes bolsas de plástico, botellas de plástico, botellas de vidrio, ampollas, cajas de cartón o cajas de plástico. Los envases se pueden conectar o separar el uno del otro. Además, la primera composición y la segunda composición se pueden proporcionar independientemente en cualquier forma adecuada para la administración y en la misma forma o en diferentes formas. Por ejemplo, la primera composición y la segunda composición se pueden aplicar independientemente a un sujeto en necesidad a través de administración oral, administración nasal, inyección en el tracto corticoespinal, inyección intratecal, inyección intracerebral, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal y/o inyección subcutánea, pero no se limita de esa manera. En algunas realizaciones según la presente invención, la primera composición se proporciona en una forma de dosificación para administración oral (p. ej., un comprimido), y la segunda composición se proporciona en una botella de vidrio como una forma de dosificación adecuada para inyección intracerebral o inyección intravenosa.

20 Dependiendo de la forma y el fin, la primera composición y la segunda composición pueden comprender además cualquier vehículo, adyuvante y aditivo farmacéuticamente aceptable para proporcionarse en la forma deseada para administración, siempre que los vehículos, adyuvantes y aditivos no afecten negativamente al efecto deseado de la ftalida y/o las células madre.

25 En cuanto a la forma de dosificación adecuada para administración oral, la primera composición y la segunda composición pueden comprender independientemente un vehículo farmacéuticamente aceptable que no afectará negativamente a la actividad deseada del componente activo (es decir, la ftalida o la célula madre) comprendido en el mismo, tal como un disolvente, un disolvente oleoso, un diluyente, un estabilizador, un retardador de la absorción, un desintegrante, un emulsionante, un antioxidante, un aglutinante, un lubricante y un absorbente de la humedad. La primera composición y/o la segunda composición se pueden proporcionar en una forma adecuada para la administración oral de cualquier manera adecuada, tal como un comprimido, una cápsula, un gránulo, un polvo, un extracto fluido, una solución, un jarabe, una suspensión, una emulsión, o una tintura.

30 En cuanto a la forma de dosificación para inyección en el tracto corticoespinal, inyección intratecal, inyección intracerebral, inyección intravenosa o inyección subcutánea, la primera composición y la segunda composición pueden comprender independientemente uno o más componentes tales como una solución isotónica, una solución salina tamponada (p. ej., una solución tampón fosfato o una solución tampón citrato), un solubilizante, un emulsionante y otros vehículos para fabricarse como una inyección intravenosa, una inyección intravenosa en emulsión, una inyección en polvo, una inyección en suspensión, una inyección en suspensión y en polvo, etc.

35 Además de los adyuvantes anteriores, la primera composición y/o la segunda composición pueden comprender opcionalmente otro(s) aditivo(s), tal como un agente aromatizante, un tónico y un agente colorante para potenciar el sabor y la percepción visual del medicamento resultante. Para mejorar la capacidad de almacenamiento del medicamento resultante, la primera composición y/o la segunda composición también pueden comprender una cantidad adecuada de un conservante, un conservador, un agente antibacteriano y/o un agente antifúngico. Además, la primera composición y/o la segunda composición del kit de la presente invención pueden comprender opcionalmente uno o más componentes activos para mejorar aún más la eficacia del medicamento proporcionado por la presente invención o para aumentar la flexibilidad y la adaptabilidad de aplicación de la formulación resultante, siempre que los otros componentes activos no afecten negativamente al efecto deseado de la ftalida y/o la célula

madre en el kit.

Además, dependiendo de la demanda real, la dosificación de la primera composición y la segunda composición del kit de la presente invención se pueden ajustar a la adecuada para su uso único o múltiple. Por lo tanto, el kit de la presente invención puede comprender adicionalmente una instrucción para mostrar la manera de utilizar la primera composición y la segunda composición. Por ejemplo, cuando el kit de la presente invención se aplica a un cuerpo humano para tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o para retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras, la dosificación de la primera composición es preferentemente de aproximadamente 100 mg (como la ftalida)/peso corporal en kg a aproximadamente 1.000 mg (como la ftalida)/peso corporal en kg por día, y más preferentemente de aproximadamente 250 mg (como la ftalida)/peso corporal en kg a aproximadamente 800 mg (como la ftalida)/peso corporal en kg por día. La dosificación de la segunda composición es preferentemente de aproximadamente 1×10^2 células (como las células madre)/sitio de administración a aproximadamente 1×10^{15} células (como las células madre)/sitio de administración, y más preferentemente de aproximadamente 1×10^5 células (como las células madre)/sitio de administración a aproximadamente 1×10^8 células (como las células madre)/sitio de administración. Sin embargo, para pacientes que padecen afecciones agudas, la dosificación puede aumentarse varias veces o varias decenas de veces, dependiendo de la demanda real. En una realización del tratamiento de ELA según la presente invención, la ftalida es BP y su dosificación es aproximadamente 500 mg/peso corporal en kg por día, y la célula madre es una célula madre derivada de tejido adiposo y su dosificación es de aproximadamente 2×10^6 células una vez para inyección intracerebral y 1×10^6 células una vez para inyección intravenosa.

El kit de la presente invención puede comprender además una tercera composición que comprende un disolvente y/o una solución. La tercera composición se coloca preferentemente en un envase (p. ej., una bolsa de plástico, una botella de plástico, una botella de vidrio o una ampolla) diferente de la primera composición y la segunda composición, y se puede mezclar con la primera composición y/o la segunda composición para proporcionar una solución de inyección. Los ejemplos del disolvente adecuado para la tercera composición incluyen, entre otros, disolventes polares, tales como agua, DMSO y etanol. Los ejemplos de la solución adecuada para la tercera composición incluyen, entre otros, soluciones salinas tamponadas y cualquier otra solución de inyección adecuada para proporcionar una forma adecuada para inyección. Los ejemplos de la solución salina tamponada incluyen, entre otros, una solución tampón fosfato (STF), una solución tampón citrato y una solución salina fisiológica. En una realización de la presente invención, la segunda composición (que comprende una célula madre) se mezcla con la tercera composición (que comprende STF) para proporcionar una forma adecuada para inyección antes de administrarse.

Además, los inventores de la presente invención descubrieron que un precursor metabólico de una ftalida también tiene los efectos sobre el tratamiento de una enfermedad degenerativa de las neuronas motoras y/o el retraso de la aparición de la enfermedad, y la eficacia del precursor metabólico de una ftalida es no solo superior a la de utilizar solo BP, sino también superior al uso de BP en combinación con una célula madre. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un uso de un precursor metabólico de una ftalida en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad degenerativa de las neuronas motoras y/o para retrasar la aparición de la enfermedad, en el que el precursor metabólico es 3-butilideno-4,5-dihidroftalida (ligustilida).

Según la presente invención, un medicamento proporcionado utilizando un precursor metabólico de una ftalida puede utilizarse para tratar y/o para retrasar la aparición de las siguientes enfermedades: esclerosis lateral amiotrófica, miastenia gravis, miastenia, atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis múltiple, atrofia sistémica múltiple, atrofia muscular espinal y combinaciones de las mismas, y especialmente puede utilizarse en el tratamiento de la ELA y/o en el retraso de la aparición de la ELA. La forma de dosificación, el modo de administración y la dosificación del medicamento están en línea con las descripciones anteriores.

La presente invención se ilustrará adicionalmente con detalle 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 de esa manera.

Ejemplos

[Ejemplo 1] Metabolitos de n-butilidenoftalida (BP)

Se sabe que la vía metabólica en medicina dentro del hígado de un organismo se puede dividir principalmente en metabolismo en fase I y fase II. El metabolismo en fase I se produce principalmente por la reacción redox o la reacción de hidrólisis de la medicina, mientras que el metabolismo en fase II se produce principalmente por el sistema de la citocromo P450 (CYP450) monooxigenasa. Este ejemplo simuló el metabolismo en fase I y II de la BP que se produce dentro del hígado de un organismo mezclando, respectivamente, BP con microsomas hepáticos o hepatocitos criopreservados *in vitro*. Los productos en la solución de reacción se analizaron mediante cromatografía líquida-espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS) para identificar los metabolitos y el perfil metabólico.

(1) Ensayo de metabolismo en fase I

BP (que comprende Z-BP al 95 % + E-BP al 5 %; adquiridas en ECHO Chemical) (2 μ M) se mezcló respectivamente con solución tampón K_3PO_4 (100 mM, pH 7,4) que contenía micrasomas hepáticos humanos, de rata o de perro (0,5 mg/ml). La mezcla se mantuvo a 37 °C durante 10 minutos, y luego se añadieron co-factores pre-calentados (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 13.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue luego recogido y analizado por LC-MS/MS para identificar los metabolitos.

(2) Ensayo de metabolismo en fase II

El medio E de William que contenía 5×10^5 hepatocitos humanos, de rata o de perro descongelados se añadió respectivamente a una placa de cultivo de 12 pocillos, y las células se cultivaron durante 6 horas. A continuación, se añadieron a la placa de cultivo 0,5 ml de BP (que comprendía Z-BP al 95 % + E-BP al 5 %, adquiridas en ECHO Chemical) (50 μ M). Después de incubar las células a 37 °C, 95 % de humedad relativa y 5 % de CO_2 durante 6 horas, se añadieron 2 ml de acetonitrilo (100 %) para finalizar la reacción. La muestra se recogió, se mezcló adecuadamente y se centrifugó a 45.000 g, 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió, se secó y se analizó mediante LC-MS/MS para identificar los metabolitos de BP.

(3) Análisis por LC-MS/MS

Las muestras obtenidas de (1) y (2) se disolvieron por separado en acetonitrilo que contenía ácido fórmico al 0,1 %, se centrifugaron a 45.000 g, 4 °C durante 10 minutos. Luego, se inyectó una alícuota de cada muestra en un vial automuestreador (Agilent Technologies, EE. UU.) para realizar un análisis por LC-MS/MS. El sistema de LC-MS/MS comprende un sistema ABSCIEX 5500 Q TRAP™ con un sistema 1200SL HPLC (Agilent Technologies, EE. UU.), una columna de HPLC (Symmetry® C18, 3,5 μ M, 4,6 x 75 mm) y un automuestreador (Agilent Technologies, EE. UU.). El análisis de espectrometría de masas se realizó en modo de ionización por electrospray de ion positivo (+ESI) a 5,5 kV, 550 °C, y se utilizó N_2 (nitrógeno) como gas auxiliar. Se utilizó un sistema de dos disolventes (disolvente A: ácido fórmico al 0,1 %, disolvente B: metanol que contiene ácido fórmico al 0,1 %) para realizar HPLC a un caudal de 0,8 ml/min. El sistema de gradientes de HPLC se estableció de la siguiente manera: 0 a 2 minutos mantenido al 10 % de disolvente B; 2 a 7 minutos con un gradiente de 10 % a 95 % de disolvente B; 7 a 12 minutos mantenido al 95 % de disolvente B; 12 a 14 minutos con un gradiente de 95 % a 10 % de disolvente B; 14 a 20 minutos mantenido al 10 % de disolvente B; y el tiempo de retención del análisis de HPLC es de 20 minutos. Las alícuotas (20 μ l) de cada muestra se inyectaron en el sistema LC-MS/MS para realizar el análisis. El software LightSight™ analizó los picos más intensos del espectro LC-MS/MS y los picos de masas desplazadas en el espectro LC-MS/MS de cada muestra en comparación con el espectro de BP para determinar los metabolitos en las muestras e identificar la vía de biotransformación y el perfil metabólico de la BP 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 BP ($m/z = 189,1$) y microsomas hepáticos humanos analizados por LC-MS/MS. Como se muestra en la Figura 1A, los picos más intensos (m/z) son 171,2 amu, 153,1 amu, 143,0 amu, 128,0 y 115,0 amu. La Figura 1B muestra el perfil metabólico obtenido a partir de la reacción de la mezcla de BP y microsomas hepáticos, y las estructuras químicas de los compuestos (2) a (9). La Figura 1C muestra el perfil metabólico obtenido de la reacción de la mezcla de BP y hepatocitos crioconservados, y las estructuras químicas de los compuestos (11) a (14).

La Tabla 1 muestra los tipos de metabolitos obtenidos de la reacción de la mezcla de BP y microsomas hepáticos (es decir, metabolismo en fase I) y la vía de biotransformación adquirida mediante análisis por software. Los resultados muestran que los compuestos (2) a (9) de la presente invención se pueden producir mediante la reacción de una mezcla de BP y los microsomas hepáticos de rata, perro o ser humano, lo que indica que la BP puede transformarse en metabolitos similares cuando se metaboliza en el hígado de diferentes organismos.

Tabla 1

Metabolitos en fase I			
Especies	Metabolitos	Vía de biotransformación	Picos de masas desplazadas
Rata	Compuesto (2)	Deshidrogenación	m/z 189→187
	Compuesto (3); Compuesto (4)	Oxidación	m/z 189→205
	Compuesto (5); Compuesto (6); Compuesto (7)	Hidrogenación (grupo que forma hidrocarbilo)	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 (grupo que forma hidrocarbilo)	m/z 189→207
	Compuesto (8)	Tri-desmetilación	m/z 189→147
	Compuesto (9)	+Ceto (O _x -2H) o metilación	m/z 189→203
Ser humano	Compuesto (2)	Deshidrogenación	m/z 189→187
	Compuesto (3); Compuesto (4)	Oxidación	m/z 189→205
	Compuesto (5); Compuesto (6); Compuesto (7)	Hidrogenación (grupo que forma hidrocarbilo)	m/z 189→207
	Compuesto (8)	Tri-desmetilación	m/z 189→147
	Compuesto (9)	+Ceto (O _x -2H) o metilación	m/z 189→203

5 La Tabla 2 muestra los tipos de metabolitos obtenidos de la reacción de la mezcla de BP y hepatocitos crioconservados (es decir, metabolismo en fase II) y la vía de biotransformación adquirida mediante análisis por software. Los resultados muestran que los compuestos (11) a (14) de la presente invención pueden producirse mediante la reacción de una mezcla de BP y los hepatocitos criopreservados de rata, perro o ser humano, lo que indica que la BP puede transformarse en metabolitos similares cuando se metaboliza en los hígados de diferentes organismos.

Tabla 2

Metabolitos en fase II			
Especies	Metabolitos	Vía de biotransformación	Desplazamiento en masa
Rata	Compuesto (11)	+ Cisteína	m/z 189→310
	Compuesto (10)	+ S-glutación	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-glutación	m/z 189→496
	Compuesto (13)	Glucoronidación	m/z 189→365
	Compuesto (14)	Deshidrogenación + oxidación + glucosa	m/z 189→365
Ser humano	Compuesto (11)	+ Cisteína	m/z 189→310
	Compuesto (10)	+ S-glutación	m/z 189→496
	Compuesto (12)	Deshidrogenación + sulfonación	m/z 189→267
	Compuesto (13)	Glucoronidación	m/z 189→365

10 **[Ejemplo 2] Ensayo *in vivo*: el índice de supervivencia de ratones transgénicos**

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

Este ejemplo utilizó los ratones transgénicos SOD1-G93A anteriores como el objeto de estudio para llevar a cabo el ensayo *in vivo*. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes seis grupos: (A) grupo de control (no tratado); (B) grupo tratado con Riluzol: los ratones transgénicos SOD1-G93A a los 60 días después del nacimiento

se trataron con Riluzol a una dosificación de 16 mg/peso corporal en kg una vez al día mediante inyección intraperitoneal; (C) grupo tratado con BP (BP 500 mg/kg/*qd*): los ratones transgénicos SOD1-G93A a los 60 días después del nacimiento fueron tratados con BP (que comprende Z-BP al 95 % + E-BP al 5 %; adquiridas en ECHO Chemical) a una dosificación de 500 mg/peso corporal en kg una vez al día por administración oral; (D) grupo tratado con BP (BP 250 mg/kg/*bid*): los ratones transgénicos SOD1-G93A a los 60 días después del nacimiento fueron tratados con BP (que comprende Z-BP al 95 % + E-BP al 5 %; adquiridas en ECHO Chemical) a una dosificación de 250 mg/peso corporal en kg dos veces al día mediante administración oral; (E) grupo tratado combinado (CMDTA + BP): los ratones transgénicos SOD1-G93A se trataron con BP (es decir, que comprendía Z-BP al 95 % + E-BP al 5 %, adquiridas en ECHO Chemical) a una dosificación de 500 mg/peso corporal en kg una vez al día mediante administración oral a los 60 días después del nacimiento, se trasplantaron con CMDTA (2×10^6 células/30 μ l de STF) mediante inyección intracerebral una vez a los 60 días después del nacimiento, y luego se trasplantaron con CMDTA (1×10^6 células/150 μ l de STF) mediante inyección intravenosa a los 90 días después del nacimiento; (F) grupo tratado con ligustilida: los ratones transgénicos SOD1-G93A a los 60 días después del nacimiento fueron tratados con ligustilida (es decir, 3-butilideno-4,5-dihidroftalida: un precursor metabólico de BP, adquirido en Pharmaron) a una dosificación de 500 mg/peso corporal en kg una vez al día mediante administración oral. Después de que los ratones transgénicos SOD1-G93A se trataran durante 30 días, se observaron para ver si un uso combinado de BP y CMDTA puede prolongar la longevidad 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.

Tabla 3

Grupo	Días de supervivencia
Grupo de control (n = 14)	126,4 \pm 7,2
Grupo tratado con Riluzol (n = 3)	133,7 \pm 6,4
Grupo tratado con BP (BP 500 mg/kg/ <i>qd</i>) (n= 8)	149,1 \pm 4,4
Grupo tratado con BP (n-BP 250 mg/kg/ <i>bid</i>) (n= 3)	217,7 \pm 23,2
Grupo tratado combinado (CMDTA+BP) (n = 4)	185 \pm 7,5
Grupo tratado con ligustilida (n = 5)	201,2 \pm 6,0

Como se muestra en la Figura 2 y en la Tabla 3, en comparación con la longevidad de los ratones transgénicos SOD1-G93A en el grupo control (sobrevivieron durante aproximadamente 126,4 \pm 7,2), la longevidad de los ratones transgénicos SOD1-G93A en el grupo tratado con Riluzol (sobrevivieron durante aproximadamente 133,7 \pm 6,4) simplemente se prolongó durante aproximadamente 7,3 \pm 0,8 días; la longevidad de los ratones transgénicos SOD1-G93A en el grupo tratado con BP (n-BP 250 mg/kg/*bid*) (sobrevivieron durante aproximadamente 217,7 \pm 23,2) se prolongó durante aproximadamente 91,3 \pm 16 días; la longevidad de los ratones transgénicos SOD1-G93A en el grupo tratado con ligustilida (sobrevivieron durante aproximadamente 201,2 \pm 6,0) se prolongó durante aproximadamente 74,8 \pm 1,2 días; la longevidad de los ratones transgénicos SOD1-G93A en el grupo tratado combinado (sobrevivieron durante aproximadamente 185 \pm 7,5) se prolongó durante aproximadamente 58,6 \pm 0,3 días.

Los resultados anteriores muestran que, en comparación con el uso de Riluzol o BP solo una vez al día mediante administración oral, el uso de BP en combinación con CMDTA de la presente invención puede aumentar de forma más eficaz el índice de supervivencia de los ratones que padecen ELA. Además, el uso de ligustilida (es decir, un precursor metabólico de una ftalida) o BP solo dos veces al día mediante administración oral puede aumentar eficazmente el índice de supervivencia de los ratones que padecen ELA, y el índice de supervivencia aumentado es no solo mucho mayor que el del uso de BP solo una vez al día mediante administración oral, sino también mayor que el uso de una combinación de CMDTA con BP.

[Ejemplo 3] Ensayo *in vivo*: esclerosis lateral amiotrófica

Los ratones transgénicos SOD1-G93A anteriores se utilizaron como el objeto de estudio para llevar a cabo un análisis *in vivo* en este ejemplo. Los ratones transgénicos SOD1-G93A de 60 días de edad se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes seis grupos: (A) grupo de control (no tratado); (B) grupo tratado con Riluzol: los ratones transgénicos SOD1-G93A a los 60 días después del nacimiento se trataron con Riluzol a una dosificación de 16 mg/peso corporal en kg una vez al día mediante inyección intraperitoneal; (C) grupo tratado con BP (BP 500 mg/kg/*qd*): los ratones transgénicos SOD1-G93A a los 60 días después del nacimiento fueron tratados con BP (que comprende Z-BP al 95 % + E-BP al 5 %; adquiridas en ECHO Chemical) a una dosificación de 500 mg/peso corporal en kg una vez al día por administración oral; (D) grupo tratado con BP (BP 250 mg/kg/*bid*): los ratones transgénicos SOD1-G93A a los 60 días después del nacimiento fueron tratados con BP (que comprende Z-BP al 95 % + E-BP al 5 %; adquiridas en ECHO Chemical) a una dosificación de 250 mg/peso corporal en kg dos veces al día mediante administración oral; (E) grupo tratado combinado (CMDTA + BP): los ratones transgénicos SOD1-G93A se trataron con BP (que comprende Z-BP al 95 % + E-BP al 5 %, adquiridas en ECHO Chemical) a una dosificación de 500

mg/peso corporal en kg una vez al día mediante administración oral a los 60 días después del nacimiento, y luego se trasplantaron con CMDTA (2×10^6 células/30 μ l de STF) mediante inyección intracerebral una vez a los 60 días después del nacimiento, y acto seguido se trasplantaron con CMDTA (1×10^6 células/150 μ l de STF) mediante inyección intravenosa a los 90 días después del nacimiento; (F) grupo tratado con ligustilida: los ratones transgénicos SOD1-G93A a los 60 días después del nacimiento fueron tratados con ligustilida (es decir, 3-butilideno-4,5-dihidroftalida: un precursor metabólico de BP, adquirido en Pharmaron) a una dosificación de 500 mg/peso corporal en kg una vez al día mediante administración oral.

Después de que los ratones fuesen tratados durante 30 días, se examinaron las extremidades posteriores de los ratones mediante una escala de BBB (Escala de Calificación Locomotora de Basso, Beattie, y Bresnahan (BBB)). La escala de BBB de las extremidades posteriores de ratones normales fue de 21 puntos, mientras que la escala de BBB de ratones transgénicos SOD1-G93A con enfermedad avanzada disminuyó de 21 a 0 puntos, en el que la escala más baja representa un trastorno motor más severo en los ratones. La escala de BBB se utiliza para registrar la eficacia de los tratamientos.

Como se muestra en la Figura 3, la escala de BBB de las extremidades posteriores de los ratones no tratados en el grupo control disminuyó rápidamente después de aproximadamente 110 días (de 19 a 0 puntos) después del nacimiento. La escala de BBB de las extremidades posteriores de los ratones en el grupo tratado con Riluzol disminuyó lentamente de aproximadamente 90 a 125 días (de 21 a 16 puntos), y disminuyó rápidamente después de aproximadamente 125 días (de 16 a 0 puntos). La escala de BBB de las extremidades posteriores de los ratones en el grupo tratado con BP (BP 500 mg/kg/*q*d) disminuyó lentamente de aproximadamente 125 a 135 días (de 21 a 16 puntos), y disminuyó rápidamente después de aproximadamente 135 días (de 16 a 0 puntos). La escala de BBB de las extremidades posteriores de los ratones del grupo tratado con ligustilida disminuyó lentamente de aproximadamente 130 a 170 días (de 21 a 18 puntos), y disminuyó rápidamente después de aproximadamente 170 días (de 18 a 0 puntos). La escala de BBB de las extremidades posteriores de los ratones en el grupo tratado combinado (CMDTA + BP) disminuyó lentamente de aproximadamente 150 a 190 días después del nacimiento (de 21 a 0 puntos).

Los resultados anteriores muestran que, en comparación con el uso de Riluzol o BP solo una vez al día mediante administración oral, el uso de BP en combinación con CMDTA de la presente invención puede retrasar de manera más eficaz la aparición de ELA. Además, el uso de ligustilida también puede retrasar de forma más eficaz la aparición de ELA, y la eficacia de retrasar la aparición de ELA no solo es muy superior al uso de BP solo una vez al día mediante administración oral, sino que también es superior al uso de BP en combinación con CMDTA.

[Ejemplo 4] Estudio *in vitro*: aumento del nivel de expresión de la telomerasa de CMDTA

Las CMDTA se aislaron del tejido adiposo humano mediante las siguientes etapas. El tejido adiposo humano (obtenido de investigaciones clínicas) se lavó con solución salina tamponada con fosfato (STF) y se trituró con tijeras finas. Luego, el tejido se digirió con 0,075 % de colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.) a 37 °C durante 30 a 60 minutos, y luego se añadió medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/F-12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) que contenía un 10 % de suero fetal bovino (SFB, Invitrogen) para terminar la digestión. Las células de tejido adiposo digeridas se filtraron a través de una malla de nylon de 100 μ m para eliminar los restos celulares. La suspensión celular se centrifugó durante 10 minutos para obtener un precipitado, y luego se cultivó el precipitado a 37 °C, CO₂ al 5 % en un medio de cultivo DMEM/F-12 (que contiene 10 % de SFB, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina). A continuación, las células cultivadas se lavaron con STF para eliminar los glóbulos rojos no adherentes residuales. Las células resultantes (es decir, la fracción vascular estromal (FVE) que contenía CMDTA) se cultivaron luego a 37 °C, CO₂ al 5 % en un medio de cultivo DMEM/F-12 que contenía SFB al 10 %. Las células adherentes se mantuvieron en los medios de cultivo, y los medios se cambiaron cada 2 días. Al alcanzar una confluencia del 80 %, las células se digirieron con 0,25 % de tripsina/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 37 °C, se centrifugaron y luego se volvieron a suspender en los medios de cultivo DMEM/F-12. Acto seguido, las suspensiones celulares se sembraron en placas en un matraz nuevo y se siguieron cultivando. Después de subcultivarlas durante 3 veces, las células resultantes se utilizaron para el siguiente análisis.

Las CMDTA se cultivaron en una placa de cultivo de 10 cm y se trataron con diferentes concentraciones de ácido valpróico (AVP) (1 μ M o 10 μ M) o BP (que comprendía Z-BP al 95 % + E-BP al 5 %) (100 μ M o 250 μ M) durante 24 horas. Luego, el nivel de expresión de la telomerasa de las CMDTA se determinó mediante un kit PCR ELISA con telomerasa (n.º cat. 11854666910, Roche). En este experimento, el grupo de CMDTA se refirió al grupo que no se trata con BP; el grupo de control positivo se refirió a la muestra proporcionada por el kit de ELISA que tiene un alto nivel de expresión de telomerasa (un extracto de células liofilizadas reconstituido); el grupo de control negativo se refirió a la muestra proporcionada por el kit de ELISA que tiene un alto nivel de expresión de la telomerasa cuya actividad proteica se inactivó mediante el calentamiento a 85 °C durante 10 minutos. Además, investigaciones previas demostraron que el AVP puede utilizarse para aumentar la actividad de la telomerasa de las CMDTA y, de este modo, se utilizó AVP en este experimento como grupo de control. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Como se muestra en la Figura 4, cuando las CMDTA se trataron con BP (100 μ M o 250 μ M), la actividad de la telomerasa de las CMDTA se puede aumentar de manera efectiva (es decir, se puede aumentar el nivel de expresión de la telomerasa de las CMDTA). Los resultados anteriores muestran que BP puede aumentar el nivel de

expresión de la telomerasa de las CMDTA, prolongando así la vida útil de las CMDTA.

[Ejemplo 5] Estudio *in vitro*: aumento de los niveles de expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, factor 1 derivado de células estromales, receptor 4 de quimiocina CXC y factores inmunorreguladores de las CMDTA

- 5 Se cultivaron CMDTA humanas (2×10^5 células/pocillo) en una placa de cultivo de 6 pocillos a 37 °C durante la noche. Luego, las CMDTA se añadieron a BP (que comprende 95 % de Z-BP + 5 % de E-BP) de diferentes concentraciones (10 µg/ml, 20 µg/ml o 50 µg/ml) y se incubaron durante 12 horas. Los niveles de expresión génica del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor 1 derivado de células estromales (FDCE1), receptor 4 de quimiocina CXC tipo 4 (CXCR4), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) de las CMDTA se determinaron mediante RT-PCR. Las secuencias de los cebadores utilizados en la RT-PCR son la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 como se muestra en la Tabla 4 y el listado de secuencias anexo. Se utilizó β-actina como grupo de control en el experimento. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Tabla 4

Cebador	SEQ ID NO	Secuencia (5' a 3')
Cebador FNDC - secuencia directa	SEQ ID NO: 1	gtgtgcgaca gcattagcca gtgg
Cebador FNDC - secuencia inversa	SEQ ID NO: 2	cacatacatg aaactggtaa ttctcc
Cebador FDCE1 - secuencia directa	SEQ ID NO: 3	atgaacgcca aggtcgtggt c
Cebador FDCE1 - secuencia inversa	SEQ ID NO: 4	tcatggacct ctttcgaaat ttgttc
Cebador CXCR4 - secuencia directa	SEQ ID NO: 5	ggccctcaag accacagtca
Cebador CXCR4 - secuencia inversa	SEQ ID NO: 6	gaagtcaaa agtgaggctg att
Cebador interleucina 6 - secuencia directa	SEQ ID NO: 7	tgccagcctg ctgacgaagc
Cebador interleucina 6 - secuencia inversa	SEQ ID NO: 8	tctgtgcca gtggacaggt
Cebador interleucina 8 - secuencia directa	SEQ ID NO: 9	gctggcctg gctctctgg
Cebador interleucina 8 - secuencia inversa	SEQ ID NO: 10	tccacaacc tctgcacca

- 15 Como se muestra en la Figura 5, después de que las CMDTA se trataran con BP (especialmente a la concentración de 20 µg/ml) durante 12 horas, los niveles de expresión génica de FNDC, FDCE1, CXCR4 aumentaron. Además, después de que las CMDTA se trataran con BP, los niveles de expresión génica de IL-6 e IL-8 también aumentaron, lo que indica que la BP puede aumentar los niveles de expresión génica de las citoquinas para regular la respuesta inmunitaria y mantener así la neurogénesis. Los resultados anteriores muestran que el uso de BP en combinación con CMDTA puede aumentar los niveles de expresión de FNDC, SDF 1, CXCR4, IL-6 e IL-8 de las CMDTA, y de este modo, puede inhibir la apoptosis de las neuronas y promover la proliferación de neuronas.

[Ejemplo 6] Estudio *in vivo*: aumento de los niveles de expresión proteica del factor neurotrófico derivado del cerebro y receptor 4 de quimiocina CXC de CMDTA

- 25 Los ratones transgénicos SOD1-G93A se trataron con BP (que comprende Z-BP al 95 % + E-BP al 5 %) a una dosificación de 500 mg/peso corporal en kg una vez al día mediante administración oral a los 60 días después del nacimiento, y luego se trasplantaron con CMDTA (2×10^6 células/30 µl de STF) mediante inyección intracerebral una vez a los 60 días después del nacimiento, y luego se trasplantaron con CMDTA (1×10^6 células/150 µl de STF) mediante inyección intravenosa una vez a los 90 días después del nacimiento. Los ratones se anestesiaron con hidrato de cloral y se sacrificaron a los 90 días después del nacimiento. Las médulas espinales y los tejidos cerebrales de los ratones se extirparon para análisis de inmunohistoquímica (IHQ). Las médulas espinales y los tejidos cerebrales extirpados se fijaron posteriormente durante la noche en paraformaldehído al 4 % y posteriormente se crioprotegieron en sacarosa al 30 % y se seccionaron con un criostato Leica hasta un espesor de 10 µm. Las secciones seriales se cortaron de la médula espinal, la corteza frontal o el hipocampo de los ratones, y se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina. Los portaobjetos se incubaron en una solución de bloqueo, y luego se incubaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo anti-mitocondrial humano (adquirido en Abcan) (que se puede utilizar para identificar las CMDTA inyectadas), un anticuerpo anti-FNDC humano (adquirido en GeneTex), o un anticuerpo anti-CXCR4 humano (adquirido en GeneTex). Los resultados se muestran en las Figuras 6A, 6B y 6C.

- 40 Como se muestra en la Figura 6A, pueden detectarse CMDTA humanas (véanse las posiciones marcadas con círculos en la Figura 6A) en la médula espinal de los ratones que se han tratado con BP en combinación con CMDTA. Este resultado demuestra que las CMDTA inyectadas intracerebralmente (o inyectadas por vía intravenosa) pueden migrar desde el cerebro (o la vena) a la médula espinal y, por lo tanto, pueden proteger las neuronas

motoras espinales. Además, como se muestra en las Figuras 6B y 6C, los niveles de FNDC humano (véanse las posiciones marcadas con círculos en la Figura 6B) y CXCR4 humano (véanse las posiciones marcadas con círculos en la Figura 6C) detectados en el cerebro y la médula espinal de los ratones aumentaron significativamente después de que los ratones transgénicos SOD1-G93A se trataran con BP en combinación con CMDTA.

- 5 Los resultados anteriores muestran que el uso de BP en combinación con CMDTA puede aumentar los niveles de expresión proteica de FNDC y CXCR4 de CMDTA, y de este modo, puede inhibir la apoptosis de las neuronas y promover la proliferación de las neuronas.

10 Los resultados en los ejemplos anteriores muestran que el uso de una ftalida en combinación con una célula madre puede aumentar los niveles de expresión de la telomerasa, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor 1 derivado de células estromales, receptor 4 de quimiocina CXC y factores inmunorreguladores (p. ej., IL-6 e IL-8) en una célula madre de un sujeto, y de este modo, puede inhibir la apoptosis de las neuronas motoras, proteger las neuronas motoras, y/o promover la proliferación de las neuronas motoras en el sujeto, y puede tratar enfermedades degenerativas de las neuronas motoras y/o retrasar la aparición de enfermedades degenerativas de las neuronas motoras.

15 Los ejemplos anteriores se utilizan para ilustrar el principio y la eficacia de la presente invención, pero no se utilizan para limitar la presente invención. Los expertos en este campo pueden proseguir con una variedad de modificaciones y reemplazos en base a las divulgaciones y sugerencias de la invención definidas en las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> HAWKING BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD

<120> APLICACIÓN DE COMPUESTOS FTALIDAS

25 <130> 03850PCT-EP

<140> PCT/CN2014/000155

<141> 13-02-2014

30 <150> US 61/777.127

<151> 12-03-2013

<160> 10

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador FNDC - secuencia directa

45 <400> 1

gtgtgcgaca gcattagcca gtgg 24

<210> 2

<211> 26

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador FNDC - secuencia inversa

55 <400> 2

cacatacatg aaactggtaa ttctcc 26

<210> 3

<211> 21

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador FDCE1 - secuencia directa
 5 <400> 3
 atgaacgcca aggtcgtggt 21
 <210> 4
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador FDCE1 - secuencia inversa
 15 <400> 4
 tcatggacct ctttcgaaat ttgttc 26
 <210> 5
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador CXCR4 - secuencia directa
 25 <400> 5
 ggccctcaag accacagtca 20
 <210> 6
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador CXCR4 - secuencia inversa
 35 <400> 6
 gaagttcaaa agtgaggctcg att 23
 40 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador interleucina 6 - secuencia directa
 <400> 7
 50 tgccagcctg ctgacgaagc 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador interleucina 6 - secuencia inversa
 <400> 8
 60 tctgtgcca gtggacaggt 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 671 999 T3

<220>
<223> Cebador interleucina 8 - secuencia directa

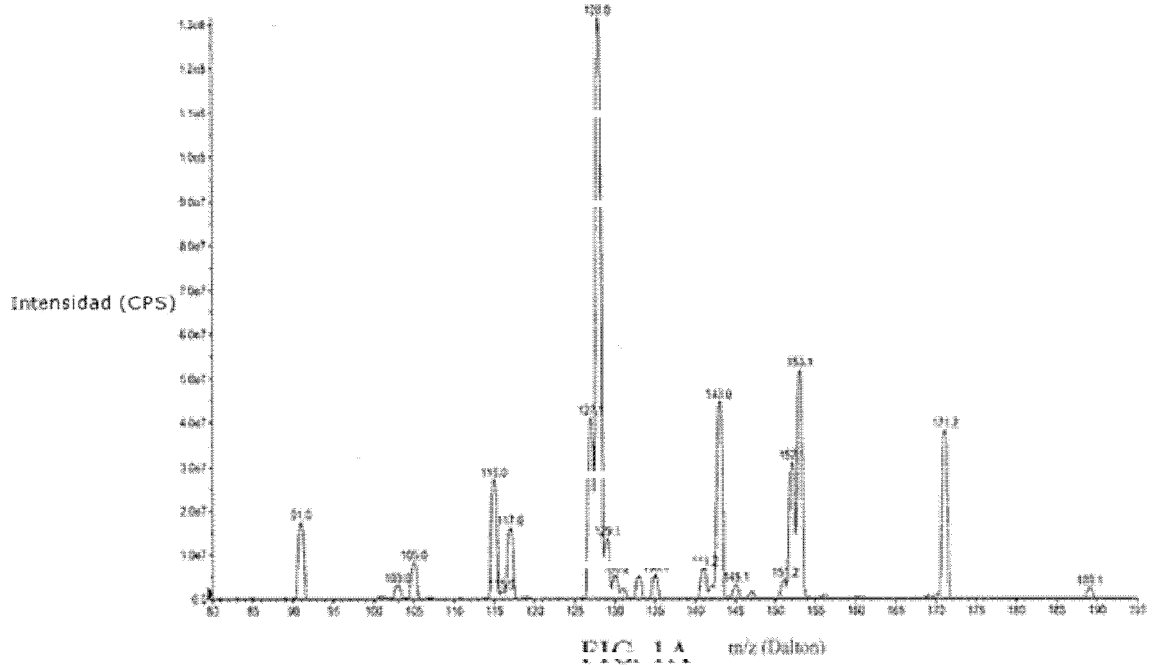
5 <400> 9
 gctggccgtg gctctcttgg 20

<210> 10
<211> 20
10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador interleucina 8 - secuencia inversa

15 <400> 10
 tccacaacct tctgcaccca 20

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una ftalida para su uso como medicamento para inhibir la apoptosis de las neuronas motoras, proteger las neuronas motoras, y/o promover la proliferación de neuronas motoras mediante el aumento del nivel de expresión de al menos uno entre telomerasa, factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDK), factor 1 derivado de células estromales (FDCE1), receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4), IL-6 e IL-8 en una célula madre, en la que la ftalida y una célula madre son administradas de forma simultánea o por separado a un sujeto, y la ftalida se selecciona entre el siguiente grupo: n-butilidencilfalida (BP), 3-butiliden-4,5-dihidroftalida (ligustilida), y combinaciones de los mismos.
2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la ftalida es n-butilidencilfalida.
3. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la célula madre se selecciona entre el grupo que consiste en una célula madre embrionaria, una célula madre adulta, una célula madre pluripotente inducida y combinaciones de las mismas.
4. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la célula madre se selecciona entre el grupo que consiste en una célula madre mesenquimal, una célula madre hematopoyética y combinaciones de las mismas.
5. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la célula madre es una célula madre mesenquimal seleccionada entre el grupo que consiste en una célula madre de médula ósea, una célula madre de sangre de cordón umbilical, una célula madre de placenta, una célula madre de tejido adiposo, una célula madre oral, una célula madre de bulbo olfatorio, una célula madre de líquido amniótico, una célula madre amniótica, una célula madre de cordón umbilical, una célula madre que recubre el cordón umbilical y combinaciones de las mismas.
6. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la ftalida y una célula madre son administradas de forma simultánea o por separado a un sujeto para tratar una enfermedad degenerativa de las neuronas motoras y/o para retrasar la aparición de una enfermedad degenerativa de las neuronas motoras.
7. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que la enfermedad degenerativa de las neuronas motoras se selecciona entre el grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica, miastenia gravis, miastenia, atrofia muscular, distrofia muscular, esclerosis múltiple, atrofia sistémica múltiple, atrofia muscular espinal y combinaciones de las mismas.
8. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que la enfermedad degenerativa de las neuronas motoras es la esclerosis lateral amiotrófica.
9. Un kit para su uso como medicamento, que comprende:
una primera composición, que comprende una ftalida; y
una segunda composición, que comprende una célula madre;
en el que la primera composición y la segunda composición se van a administrar de forma simultánea o por separado a un sujeto en necesidad; y en el que el medicamento se selecciona entre el siguiente grupo: n-butilidencilfalida (BP), 3-butiliden-4,5-dihidroftalida (ligustilida) y combinaciones de los mismos.
10. El kit según la reivindicación 9, en el que la ftalida es n-butilidencilfalida.
11. El kit según la reivindicación 9 o 10, en el que la célula madre se selecciona entre el grupo que consiste en una célula madre embrionaria, una célula madre adulta, una célula madre pluripotente inducida y combinaciones de las mismas.
12. El kit según la reivindicación 9 o 10, en el que la célula madre se selecciona entre el grupo que consiste en una célula madre mesenquimal, una célula madre hematopoyética y combinaciones de las mismas.
13. El kit según las reivindicaciones 9 a 12, en el que la célula madre es una célula madre mesenquimal seleccionada entre el siguiente grupo: una célula madre de médula ósea, una célula madre de sangre de cordón umbilical, una célula madre de placenta, una célula madre de tejido adiposo, una célula madre oral, una célula madre de bulbo olfativo, una célula madre de líquido amniótico, una célula madre amniótica, una célula madre de cordón umbilical, una célula madre que recubre el cordón umbilical y combinaciones de las mismas.
14. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, que comprende además una tercera composición que comprende un disolvente o una solución y se puede mezclar con la primera composición y/o la segunda composición para proporcionar una solución para inyección.
15. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que la primera composición se encuentra en forma de administración oral, administración nasal, inyección en el tracto corticoespinal, inyección intratecal, inyección intracerebral, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal y/o inyección subcutánea; y la segunda composición se encuentra en forma de inyección en el tracto corticoespinal, inyección intratecal, inyección intracerebral, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal y/o inyección subcutánea.



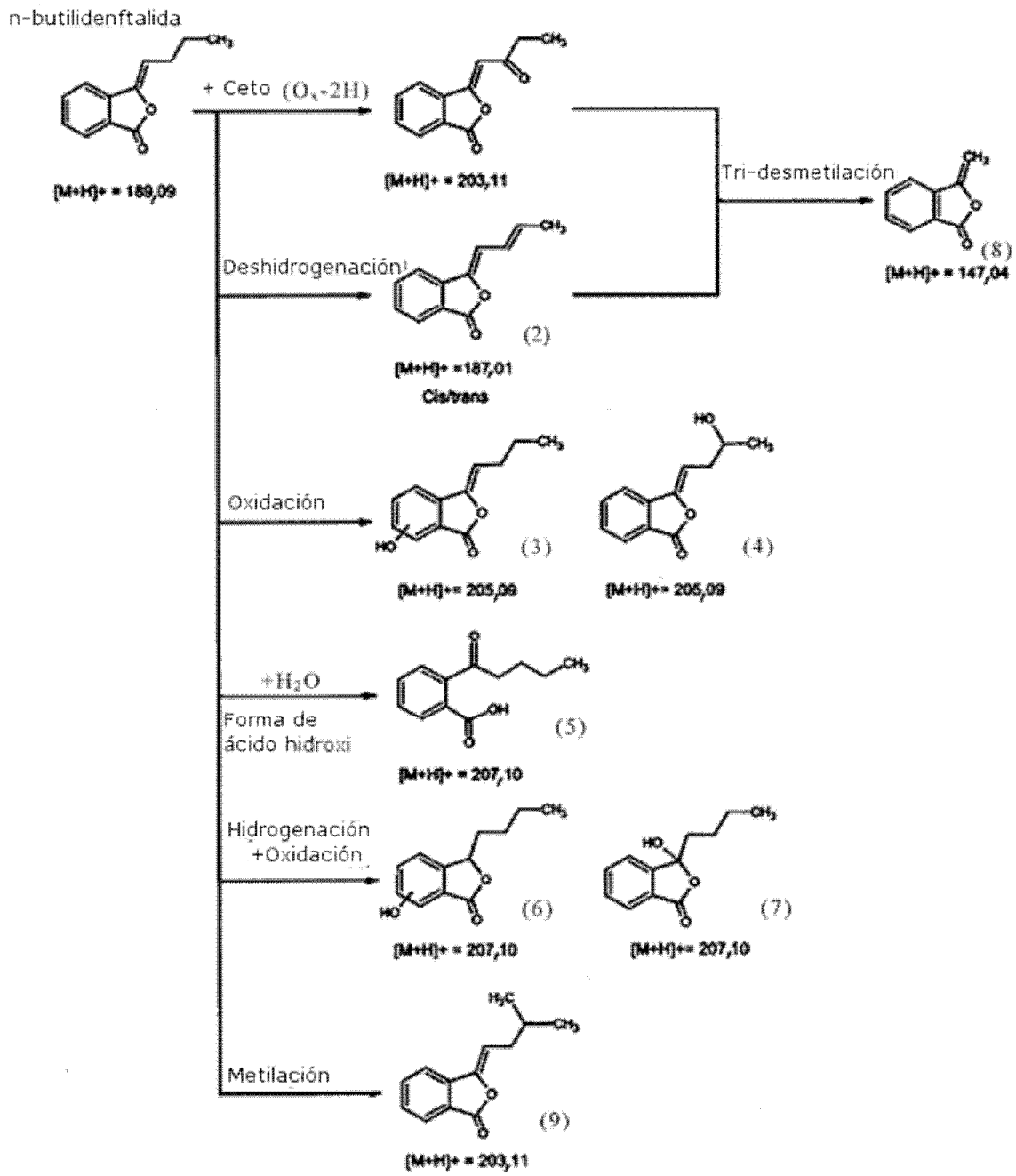


FIG. 1B

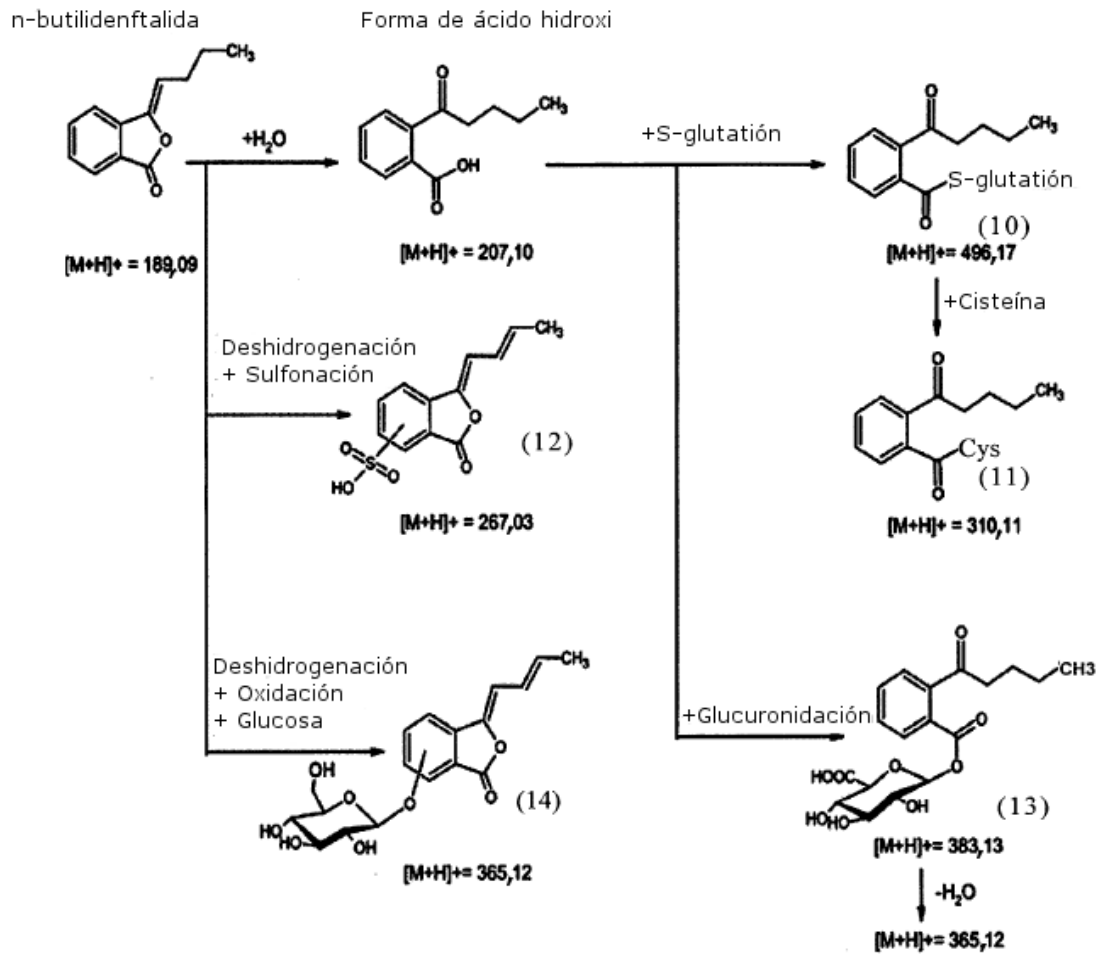


FIG. 1C

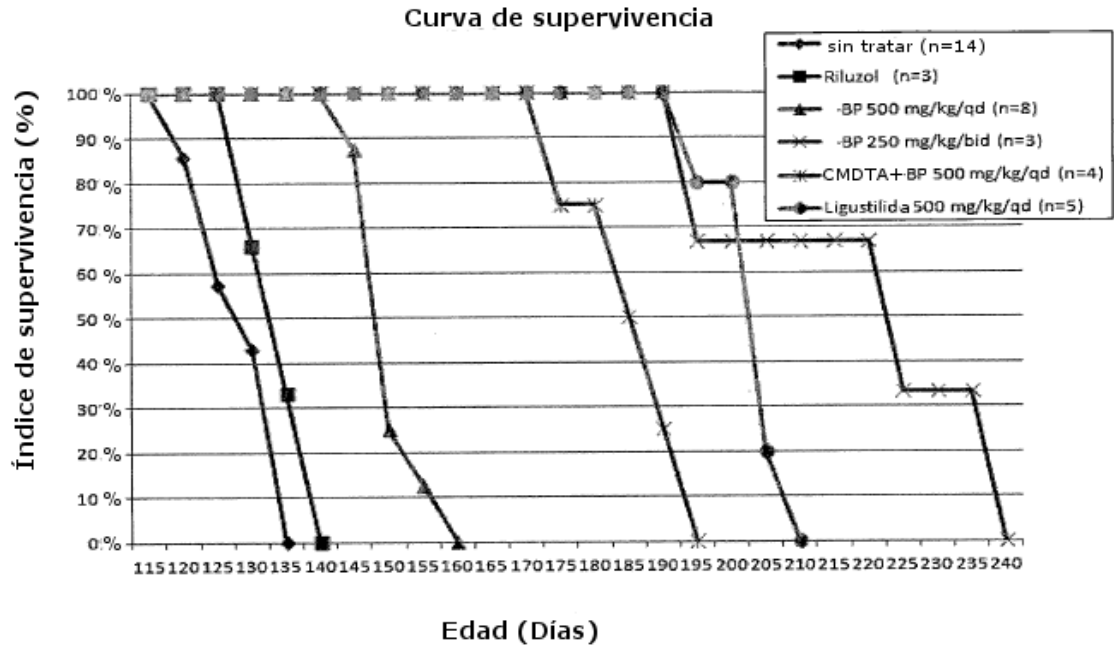


FIG. 2

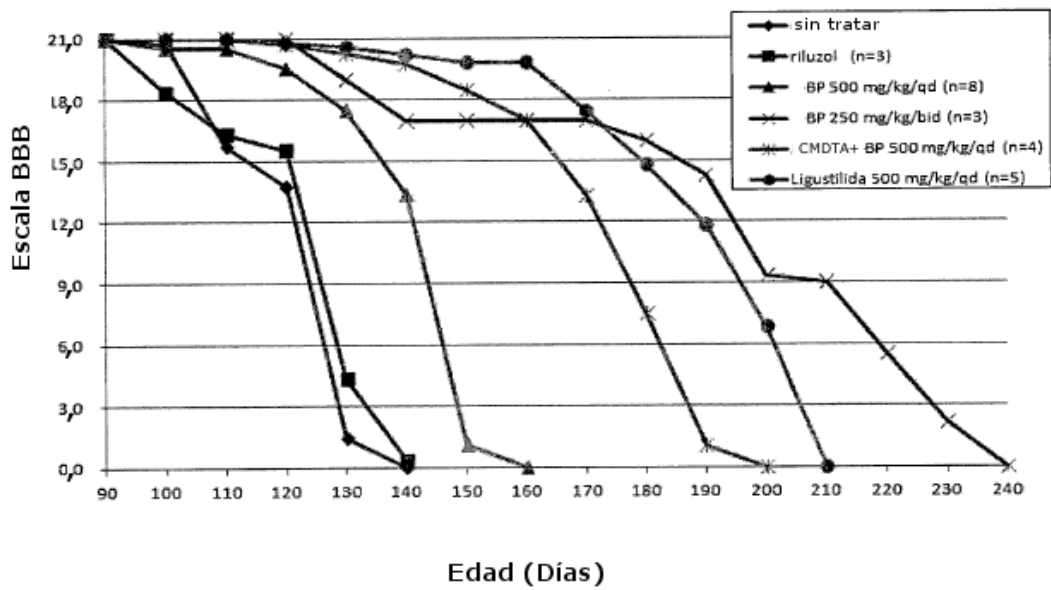


FIG. 3

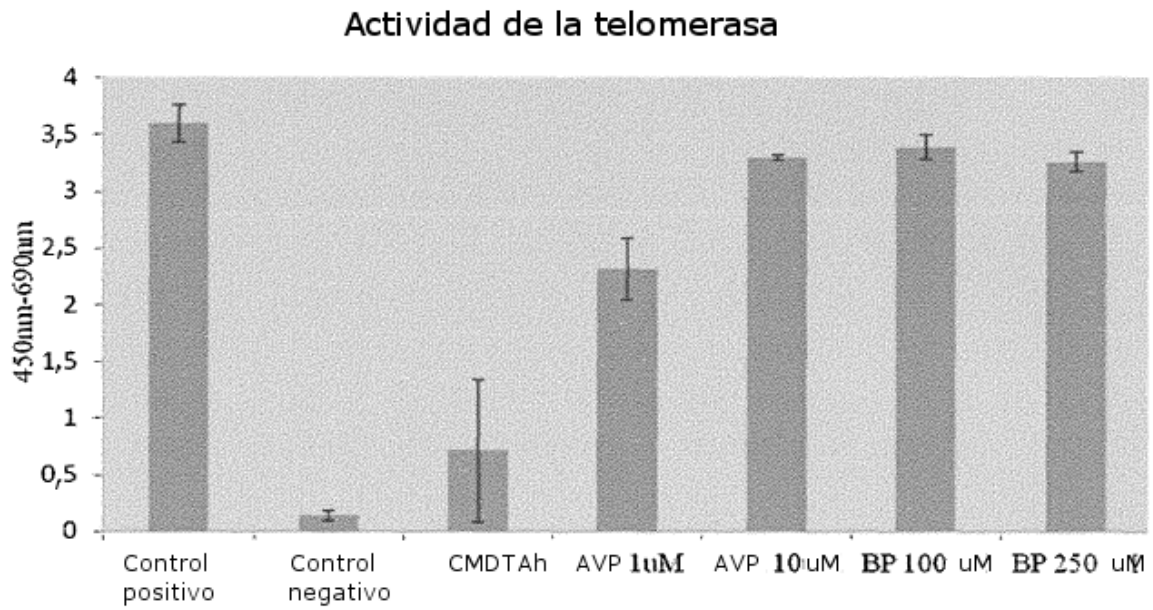


FIG. 4

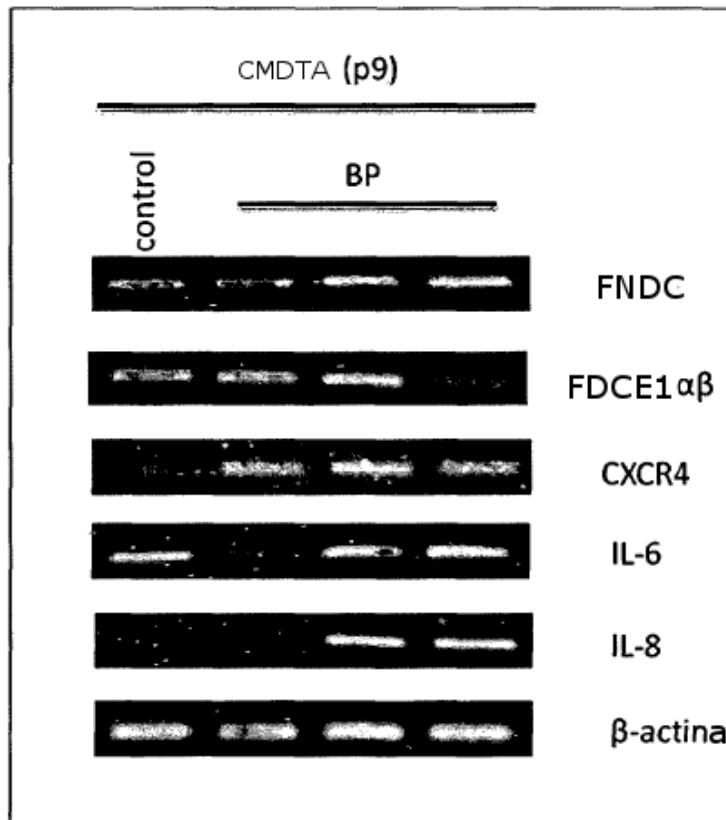


FIG. 5

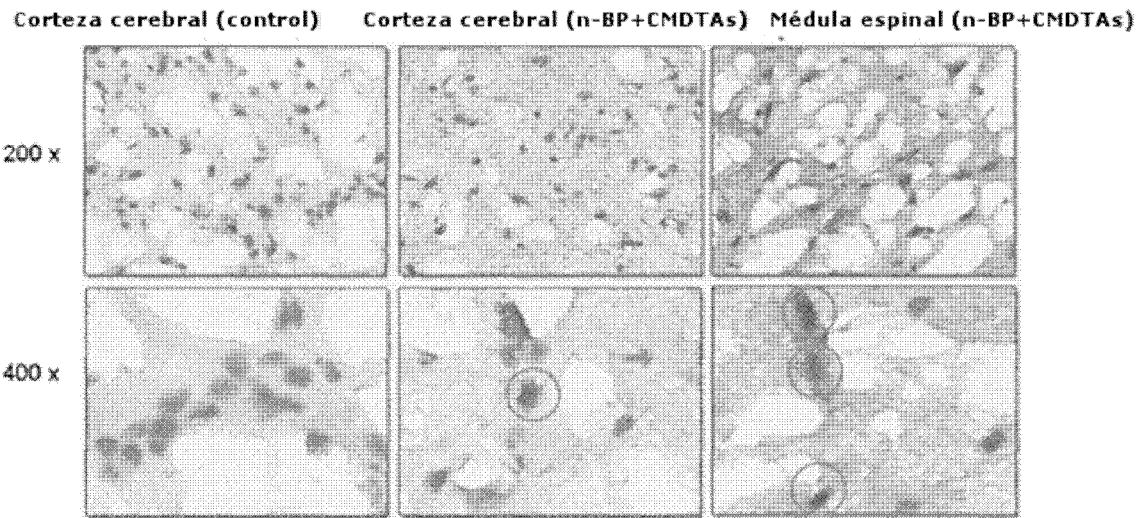


FIG. 6A

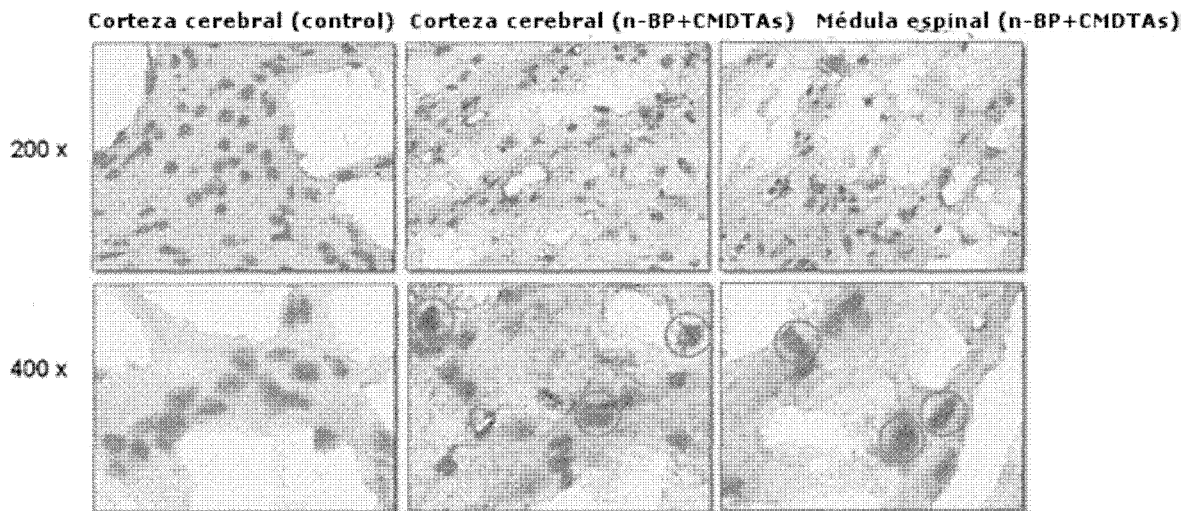


FIG. 6B

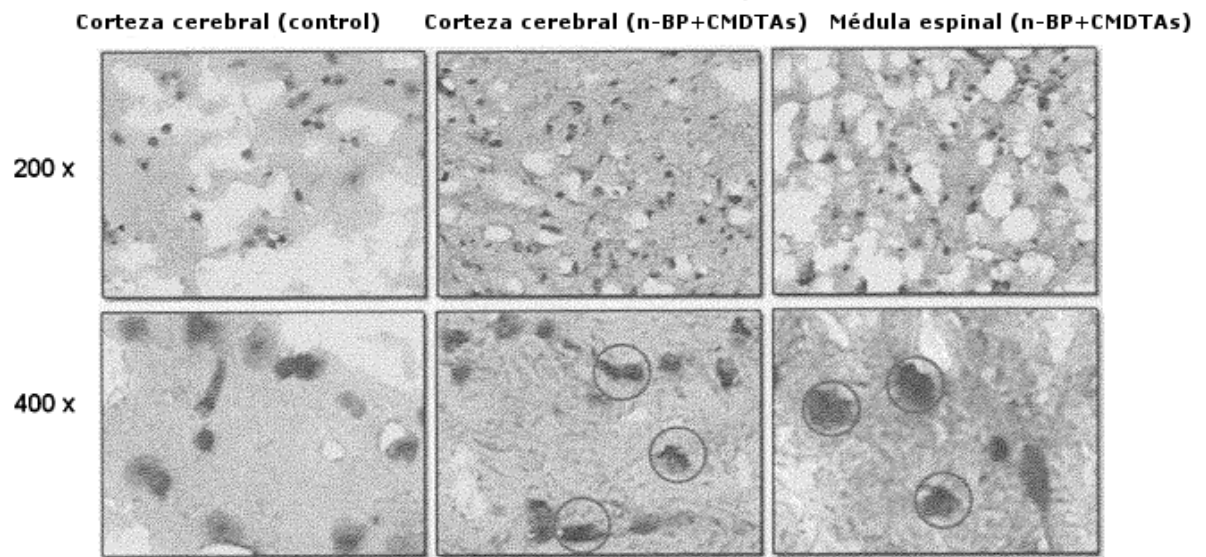


FIG. 6C