

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 830**

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61F 7/02 (2006.01)

A61M 5/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2013 E 13729798 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2858633**

54 Título: **Terapias sinérgicas de cannabidiol con hipotermia para la neuroprotección**

30 Prioridad:

08.06.2012 GB 201210142

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

22.09.2016

73 Titular/es:

**GW PHARMA LIMITED (100.0%)
Sovereign House
Histon, Cambridge CB24 9BZ, GB**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ-ORGADO, JOSÉ y
GUY, GEOFFREY**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 583 830 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

Terapias sinérgicas de cannabidiol con hipotermia para la neuroprotección

5 La presente invención se refiere al uso del fitocannabinoide cannabidiol (CDB) en combinación con la hipotermia terapéutica en el tratamiento de la encefalopatía hipóxico-isquémica en el recién nacido (NHIE). Preferentemente, el CDB está en forma de un extracto de planta, alternativamente el CDB está en una forma pura o aislada.

Antecedentes de la invención

10 La asfisia perinatal que resulta de la encefalopatía hipóxico-isquémica (NHIE) en el recién nacido se produce entre 2 a 9/1000 recién nacidos a término vivos. Un número muy alto de bebés prematuros (60/1000 bebés prematuros vivos) también sufren de esta afección. Además de infligir un daño cerebral directo, lo que lleva a una disfunción cerebral aguda, tal agresión puede interferir además con el desarrollo del cerebro, lo que determina una morbilidad a largo plazo.

15 En todo el mundo aproximadamente 2 millones de niños mueren o quedan con discapacidad de larga duración debido a la NHIE cada año.

20 A pesar de los continuos progresos en Neonatología y Perinatología recientemente, los números antes mencionados no han cambiado sustancialmente. Así, la NHIE sigue siendo la principal causa de deterioro neurológico neonatal adquirido de los bebés en todo el mundo.

25 El manejo de la NHIE es determinado por su fisiopatología compleja. Después de la disminución temprana de energía durante la hipoxia-isquemia, el fallo de las bombas iónicas neuronales conduce a un aumento tóxico del calcio intracelular, activando las enzimas degradantes. También hay un aumento de las sustancias excitotóxicas extracelulares tales como glutamato, lo que aumenta aún más la afluencia de calcio.

30 Durante la reperfusión, la reoxigenación y las respuestas inflamatorias inician una segunda oleada de daños, lo que conducen a un fallo de energía secundario y al daño del ADN, con activación de la apoptosis.

35 Las sustancias dentro del cuerpo, tales como proteínas de choque térmico, proteínas anti apoptóticas, factores de crecimiento neuronal y endocannabinoides son capaces de actuar como neuroprotectores naturales y sustancias neuro regenerativas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la falta de tratamiento da como resultado un severo daño cerebral o la muerte.

El cerebro inmaduro es particularmente susceptible al daño hipóxico-isquémico debido a una mayor sensibilidad al glutamato, las citocinas y el estrés oxidativo, y la preponderancia de mecanismos pro-apoptóticos.

40 El daño hipóxico-isquémico (HI) puede afectar al feto en las diversas etapas del desarrollo fetal, o puede afectar al recién nacido durante el parto y en el periodo postnatal.

45 Los problemas durante el embarazo pueden incluir la preeclampsia, la diabetes materna con la enfermedad vascular, infecciones fetales congénitas, abuso de alcohol/fármacos, anemia fetal grave, enfermedad cardíaca, malformaciones pulmonares, o problemas con el flujo sanguíneo a la placenta.

Los problemas durante el parto pueden incluir la oclusión del cordón umbilical, torsión o prolapso, ruptura de la placenta o del útero, sangrado excesivo de la placenta, posición anormal del feto tal como la posición de nalgas, últimas etapas del parto prolongadas, o presión arterial muy baja en la madre.

50 Los problemas después del parto pueden incluir prematuridad grave, enfermedades graves del corazón o del pulmón, infecciones graves, traumatismo en el cerebro o el cráneo, malformaciones congénitas del cerebro, o presión arterial muy baja en el bebé.

55 Existe una "ventana terapéutica temporal" entre la agresión por HI y el fallo de energía secundario irreversible, lo que determina la posibilidad de una estrategia terapéutica que conduce a la reducción del daño cerebral por HI. Esta estrategia tiene que actuar sobre varios factores, incluyendo la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la inflamación.

60 La hipotermia terapéutica ha demostrado ser un tratamiento útil del NHIE y se ha convertido en la única terapia con un efecto neuroprotector demostrado en los recién nacidos humanos. Desafortunadamente, estos beneficios son parciales y sólo tiene éxito en los casos leves.

Ensayos clínicos recientes en los recién nacidos han demostrado que la hipotermia moderada inducida reduce el resultado combinado de la mortalidad y la discapacidad en el neurodesarrollo a largo plazo a los 12-24 meses de edad. Aparte de la hipotermia, existen terapias no establecidas.

La hipotermia no protege completamente un cerebro lesionado; los recién nacidos con las formas más graves de lesión por HI a menudo no son tratadas con éxito.

5 Se necesita la adición de otras terapias añadidas durante o después de la hipotermia que puedan mejorar la neuroprotección, mediante la ampliación de la ventana terapéutica o la provisión de aditivos de larga duración o la protección sinérgica (Cilio y Ferriero, 2010). Sin embargo, es importante tener en cuenta que los fármacos administrados durante el período neonatal pueden ser tóxicos para el cerebro inmaduro. La excreción de muchos fármacos y sus metabolitos puede modificarse por la hipotermia, y por lo tanto el fallo del hígado y el aclaramiento renal debido a una lesión por HI podrían exacerbar cualquier toxicidad.

10 Los fármacos antiepilépticos (AED) se han usado en combinación con la hipotermia principalmente porque los ataques se asocian comúnmente con la HIE. El AED topiramato ha mostrado cierta sinergia con hipotermia en modelos animales si se usa inmediatamente después del evento HI, sin embargo, la dosis usada fue muy superior a la que se usa para el tratamiento de la epilepsia en niños.

15 De hecho Cilio y Ferriero sugieren que agentes tales como xenon; N-acetilcisteína; eritropoyetina, melatonina y cannabinoides pueden aumentar la protección de la hipotermia.

20 El solicitante propone que, dado que los cannabinoides reducen el flujo de calcio y la liberación de glutamato, son sustancias antioxidantes y antiinflamatorias, modulan las vías de MAP quinasa, inducen la hipotermia y promueven la neuro-regeneración podrían ser usados en el tratamiento de la NHIE. Muchos de estos efectos, sin embargo, se deben a la activación de los receptores CB1. En los cerebros inmaduros, se sabe que la sobre activación de los receptores CB1 aumenta la apoptosis. Por lo tanto, los agonistas de CB1 no son adecuados para la neuroprotección en NHIE.

25 El cannabinoide no psicoactivo cannabidiol (CDB) es de gran interés porque sus efectos son independientes de CB1. De hecho, el CDB ha demostrado reducir el daño cerebral histológico y bioquímico en modelos de NHIE *in vivo* e *in vitro* (Alvarez y otros, 2008). Este cannabinoide ha demostrado además que proporciona efectos beneficiosos durante al menos 3 días después del evento HI (Lafeunte y otros, 2011).

30 Además, la patente del Reino Unido GB 2,434,312 describe las propiedades neuroprotectoras de un extracto de planta de CBD.

35 Actualmente la falta de tratamientos útiles para aumentar la hipotermia terapéutica representa una considerable carga financiera y personal de toda la vida para la sociedad y las familias afectadas con recién nacidos que sufren de NHIE. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de mejorar los resultados para estos bebés.

40 Sorprendentemente, la combinación de la hipotermia terapéutica con el cannabinoide CDB ha demostrado ser sinérgica en la neuroprotección después de la lesión por HI en un modelo animal de NHIE, y como tal ofrece una opción de tratamiento beneficiosa para la NHIE.

Resumen de la descripción

45 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación de la cannabidiol (CDB) fitocannabinoide con hipotermia terapéutica para usar en el tratamiento de la encefalopatía hipóxico-isquémica en el recién nacido (NHIE).

50 Preferentemente, el CDB está en forma de un extracto de planta. Alternativamente el CBD está en una forma pura o aislada.

Breve Descripción de las Figuras

Varias modalidades no limitantes se describen además con referencia a los dibujos acompañantes en los cuales:

55 la Figura 1 muestra la histología de los cerebros de lechones tratados después de la lesión por HI; la Figura 2 muestra una comparación de lesiones cerebrales en ratas después de la lesión por HI; y la Figura 3 muestra el desempeño neuroconductual de ratas después de la lesión por HI.

Descripción Detallada

60 El ejemplo 1 más abajo muestra la técnica anterior y detalla las propiedades neuroprotectoras de la CDB en dos modelos diferentes. Se demuestra que el CDB permite la reparación del tejido cerebral después de una lesión por HI.

65 El ejemplo 2 demuestra el efecto neuroprotector sinérgico de CDB con hipotermia terapéutica.

Ejemplo 1: Propiedades neuroprotectoras del cannabidiol (CBD) después de la hipoxia-isquémica (HI)

Materiales y Métodos

5 Se usó un modelo de lechones de HI como se describe en (Alvarez y *otros*, 2008). En resumen, se indujo una agresión por HI en lechones anestesiados de 1-3 días de edad, mediante la oclusión de ambas arterias carótidas y la disminución de oxígeno inspirado de 21 a 10% durante 30 min.

10 Treinta minutos después de la recuperación de la HI, el compuesto de prueba se administró a través de ruta i.v. Los compuestos de prueba son:

- Vehículo;
- CBD (1 mg/kg);
- CBD (1 mg/kg) más AM630 que es un antagonista de CB2 (1 mg/kg);
- CBD (1 mg/kg) más WAY100635 que es un antagonista de 5HT1A (0.1 mg/kg); o
- 15 CBD (1 mg/kg) más cafeína que es un antagonista del receptor de adenosina no específico (10 mg/kg).

20 Los parámetros hemodinámicos (gasto cardíaco, la presión arterial, la frecuencia cardíaca y el contenido de agua pulmonar extravascular), temperatura, parámetros respiratorios (distensibilidad pulmonar, resistencia de las vías respiratorias, índice de oxigenación) se registraron durante 6 horas a partir del final de HI.

Las muestras de sangre se obtuvieron por hora y se recogió la orina. La actividad cerebral se registró por EEG de amplitud integrada.

25 Al final del experimento, los lechones se sacrificaron y se retiró el cerebro; un hemisferio se congeló inmediatamente y se almacenó a -80 °C mientras que el otro se conservó en 4% de paraformaldehído. Se obtuvo una muestra de cerebro congelado para realizar una espectroscopia de resonancia magnética de protones (H+-MRS). Del mismo modo, los lechones manipulados pero sin HI sirvieron como controles.

30 Se usaron muestras de sangre de los lechones tratados con CDB para determinar la concentración sérica de CDB.

Se usó un modelo de rata de HI como se describe por (Fernández-López y *otros*, 2007). En resumen, se indujo una agresión por HI en ratas Wistar de 7-10 días de edad por electrocoagulación de la arteria carótida izquierda bajo anestesia seguido por la exposición a 10% de oxígeno durante 120 min.

35 Al final de la HI, las crías se trataron con 0.1 ml s.c. de vehículo o CDB (1 mg/kg) en una dosis única.

Crías con operación simulada sin hipoxia sirvieron como controles, y se trataron con vehículo o CDB como se indica. Las crías fueron devueltas después a sus madres.

40 En el día 35, las ratas se sometieron a pruebas de comportamiento neurológico: el cilindro giratorio (para probar la coordinación), cilindro (para poner a prueba los déficits unilaterales) y preferencia por nuevo objeto (para probar alteraciones de la memoria).

45 Las ratas se sacrificaron después y se extrajo el cerebro y se almacenó en 4% de paraformaldehído. Imágenes de resonancia magnética se tomaron del cerebro para evaluar el área dañada. En algunas ratas, la MRI se realizó 7 días después de la HI.

Resultados

50 Modelo de lechones

La Figura 1 a) y b) muestran el tejido cerebral obtenido 6 h después del final de la hipoxia-isquemia (HI). La Figura 1 a) compara la tinción de Nissl de las secciones de cerebro de lechones simulados con los expuestos a HI y tratados con vehículo o CBD 1 mg/kg i.v., solo o con el antagonista de CB2 AM630 (AM), el antagonista de 5HT1A WAY100630 (WAY) o la cafeína antagonista de la adenosina (CAF).

55 Como se puede apreciar, el CDB reduce el porcentaje de tejido necrótico, en la corteza y en el hipocampo. La reducción inducida por CDB de la muerte neuronal es mitigada por AM o WAY, pero no por la cafeína.

60 La Figura 1 b) muestra la concentración de interleucina 1 en el tejido cerebral determinado por micromatrices. Nuevamente, el CBD reduce la producción de IL-1, que se mitiga por AM pero no por WAY o cafeína.

Modelo de rata

La Figura 2 muestra las imágenes de resonancia magnética (MRI) de los cerebros de ratas, estos revelaron que el volumen de la lesión fue similar en HI + VEH e HI + CBD 7 días después de la HI, lo que sugiere que la gravedad del daño cerebral fue igualmente fuerte en ambos grupos.

5 Un mes más tarde (P37), el volumen del cerebro se mantuvo similar en HI+VEH pero se redujo significativamente por CBD.

10 La Figura 3 muestra el efecto protector del CBD incluido no solamente en el volumen de la lesión sino también el rendimiento neuroconductual de la rata. La administración de CBD condujo a la normalización de las pruebas motoras (prueba del cilindro trasero), de coordinación (RotaRod) y de memoria (reconocimiento de un nuevo objeto) mientras que las ratas sin tratar tuvieron un mal desempeño en las pruebas neuroconductuales.

Conclusión

15 El modelo de los lechones mostró que el CBD fue capaz de reducir la cantidad de áreas necróticas en el cerebro causado por HI.

20 El modelo de rata mostró que el CBD es neuroprotector y además de este efecto se observó una reducción de daño cerebral después de un mes. El cannabinoide CBD es un estimulante de la neurorreparación.

Ejemplo 2: Administración sinérgica de cannabidiol (CBD) con hipotermia terapéutica después de la hipoxia-isquemia (HI)

Materiales y Métodos

25 Lechones sedados y ventilados (1-2 día de edad) se sometieron a daño cerebral HI (hipoxia -FiO₂ 10% + compresión de la arteria carótida bilateral durante 30 min).

30 Los lechones normotérmicos (NT) se mantuvieron a 37-38°C con el uso de una manta de aire caliente.

Los lechones hipotérmicos (HT) se enfriaron mediante un colchón de agua fría a 33-34 ° C.

Treinta minutos después de la HI los lechones recibieron a través de la ruta i.v. el vehículo (VEH) o CBD (1 mg/kg).

35 Los cerebros HI se obtuvieron para cuantificar por estudios histológicos el número de neuronas (Nissl), astrocitos (GFAP) y células microgliales (mGC) (IBA-1) en la corteza parietal 6 horas después de la lesión por HI.

40 Al dividir el porcentaje de área de los procesos de GFAP e IBA-1 inmunorreactiva y los cuerpos celulares (ImageJ) por el número de células, se obtuvo un tamaño medio de los astrocitos o mGC.

Del mismo modo los animales estudiados sin agresión por HI sirvieron como controles (Sham, SHM).

Resultados

45 Se encontró que la protección neuronal es mejor en los animales tratados con CBD más hipotermia, ($p < 0.05$).

El CBD previno la reducción del número de astrocitos inducida por la HI, particularmente los animales tratados con hipotermia.

50 El CBD mejoró además la actividad de los astrocitos (el aumento de los procesos equivale a un aumento del tamaño medio), particularmente en el CBD más hipotermia.

El tratamiento de hipotermia redujo el número de células microgliales, sin diferencias entre los animales tratados con vehículo y los tratados con CBD.

55 La Tabla 2.1 demuestra el tamaño medio de las células microgliales después de la agresión por HI

Tabla 2.1 Tamaño de las células microgliales después de la lesión por HI

60

65

		Tamaño medio (píxeles)	
5	Normotérmico	Control	102
		Lesión por HI + Vehículo	134
		Lesión por HI + CBD	127
10	Hipotérmico	Control	164
		Lesión por HI + Vehículo	219
		Lesión por HI + CBD	176

15

Como se puede apreciar a partir de la tabla anterior, las células microgliales se activa después de HI, lo que aumenta su tamaño, esto se demuestra en los animales tratados con el vehículo más normotérmicos donde el tamaño de los píxeles aumentó de 102 a 134 píxeles, un aumento de 32 píxeles. El tratamiento con el CBD e hipotermia produjo el menor incremento 164 a 176 píxeles un aumento de sólo 12 píxeles, en comparación con el CBD solo (102 a 127 píxeles, un aumento de 25 píxeles) e hipotermia sola (164 a 219 píxeles, un aumento de 55 píxeles)

20

La Tabla 2.2 más abajo detalla el porcentaje de neuronas necróticas que se encuentran en la corteza de los animales de prueba.

25

Tabla 2.2 Porcentaje de neuronas necróticas en la corteza de animales de prueba

		MEDIA (%)	
30	Normotérmico	Control	5.64
		Lesión por HI + Vehículo	26.46
		Lesión por HI + CBD	8.41
35	Hipotérmico	Control	1.67
		Lesión por HI + Vehículo	13.19
		Lesión por HI + CBD	4.51

40

Como puede observarse, el tratamiento con una combinación de hipotermia y CBD produjo el menor porcentaje de neuronas necróticas (4.5%) en comparación con la hipotermia sola (13.2%) y el tratamiento con el CBD solo (8.4%).

Conclusión

45

La administración de CBD después de la HI protege las neuronas y astrocitos y modula la activación microglial.

Además, el CBD es ligeramente más eficaz que la hipotermia, pero cuando ambas terapias se usan en combinación estadísticamente significativas se producen efectos neuroprotectores.

50

Esta sinergia ofrece una opción de tratamiento útil en los recién nacidos que sufren de NHIE. Además, estos tratamientos podrían usarse con eficacia en el tratamiento de otros pacientes humanos que sufren de episodios isquémicos hipóxicos o enfermedades tales como el accidente cerebrovascular o un paro cardíaco.

Referencias

CILIO y FERRIERO, Synergistic neuroprotective therapies with hypothermia, *Semin Fetal Neonatal Med.* octubre 2010; 15(5): 293-298.

Reivindicaciones

- 5 1. La combinación del fitocannabinoide cannabidiol (CBD) con hipotermia terapéutica para su uso en el tratamiento de la encefalopatía hipóxico-isquémica en el recién nacido (HIE).
2. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el CBD está en forma de un extracto de la planta.
- 10 3. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el CBD está en una forma pura o aislada.

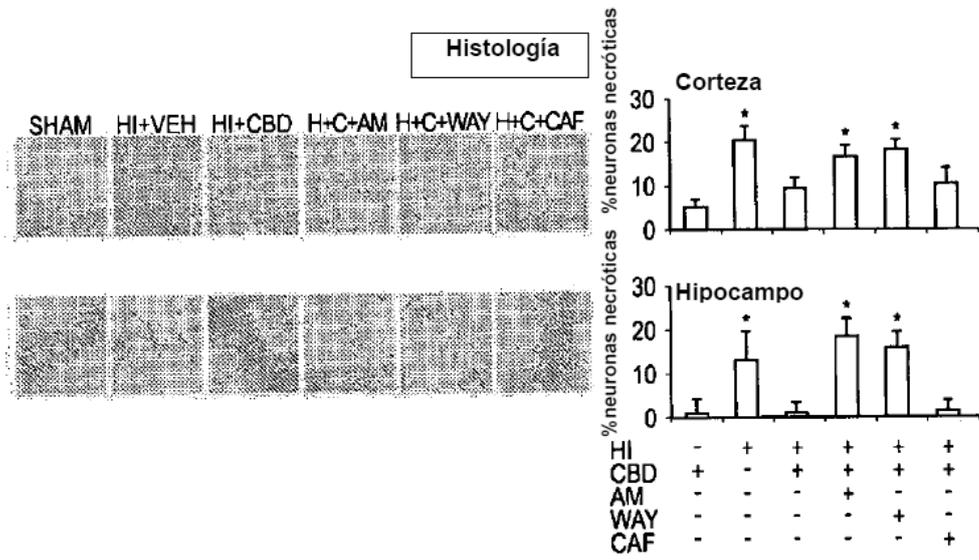


Figura 1a

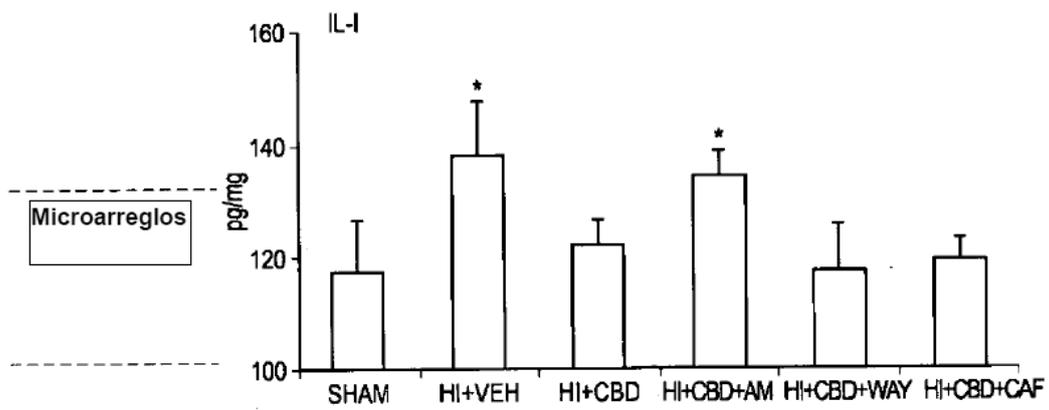


Figura 1b



Figura 2a

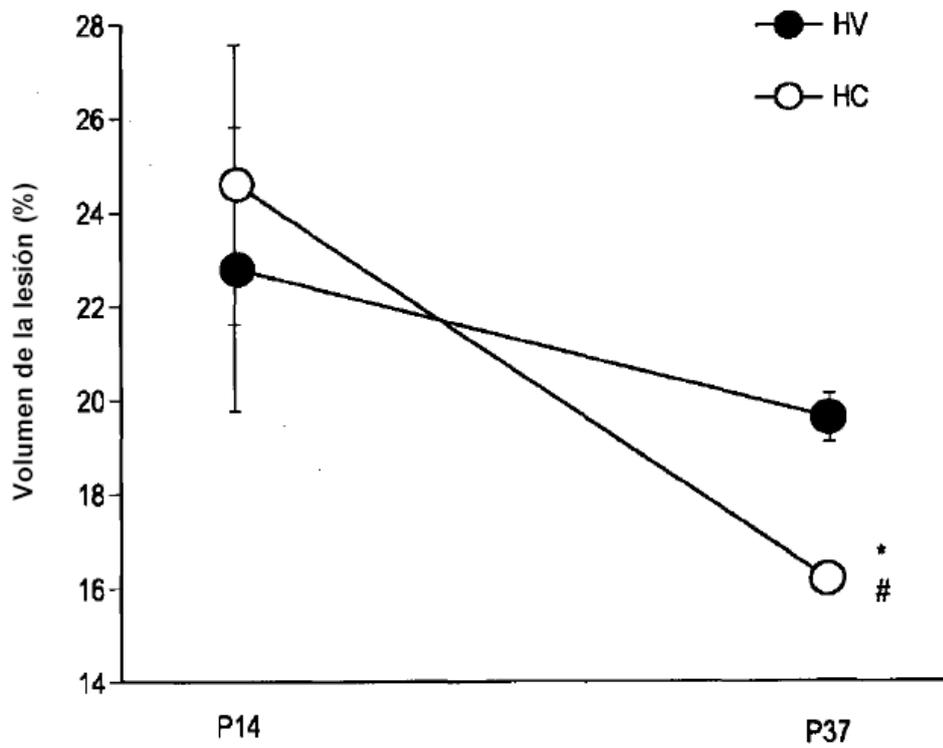


Figura 2b

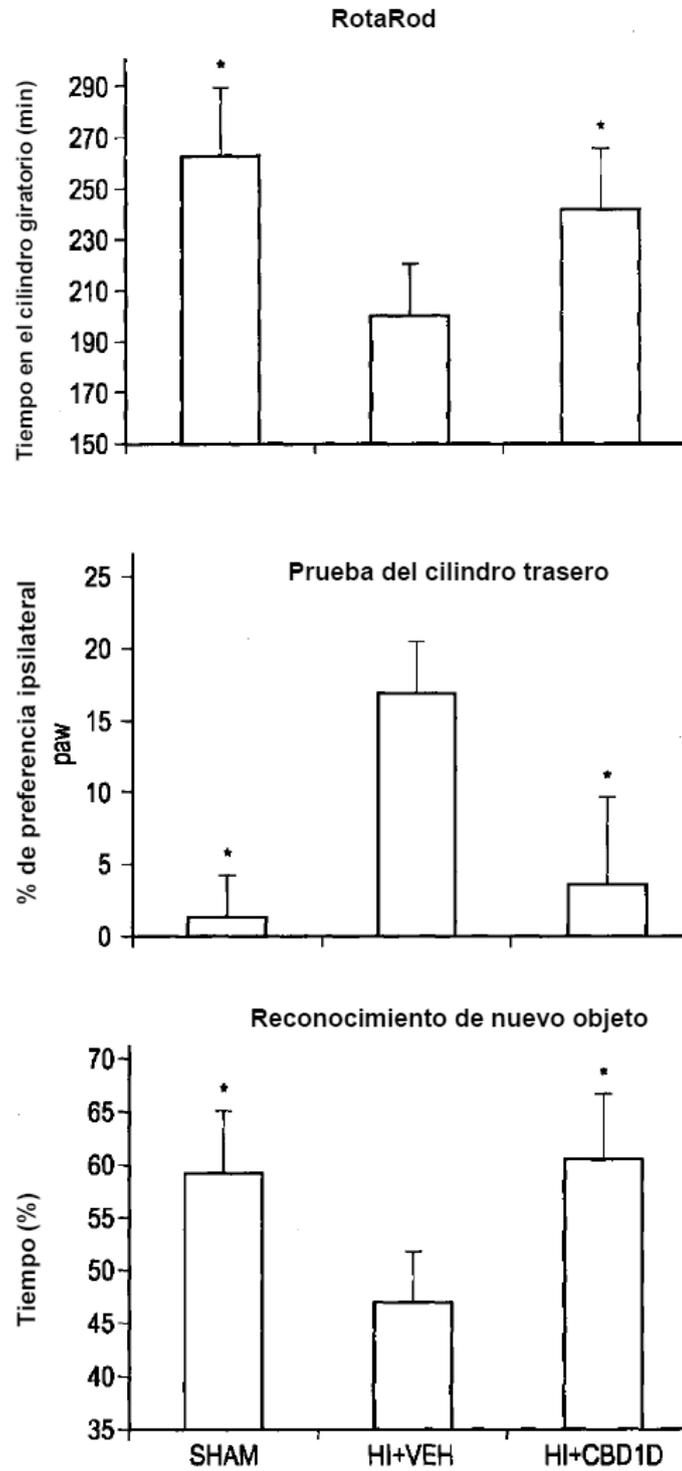


Figura 3