

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 958 818**

21 Número de solicitud: 202330291

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

12.04.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.02.2024

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)
AVENIDA DE SÉNECA, 2
28040 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**VELASCO DÍEZ, Guillermo;
TOVAR AMBEL, Elena;
LORENTE PÉREZ, Mar y
BHO GAL, Pervinder**

54 Título: **COMBINACIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE GLIOMAS**

57 Resumen:

Combinación farmacéutica para el tratamiento de gliomas.

La presente invención se refiere a una combinación de fármacos y cannabinoides para el tratamiento de un glioma que incluye un agente antiangiogénico y un compuesto cannabinoide o bien la mezcla de dos compuestos cannabinoides. La invención también se refiere a una combinación que, además de un agente antiangiogénico y, al menos, un compuesto cannabinoide, incluye también un compuesto alquilante del DNA, para el tratamiento de un glioma.

Asimismo, la invención incluye la utilización de ambas combinaciones para inhibir la autorrenovación de las células iniciadoras de gliomas y/o para inhibir la capacidad angiogénica de los gliomas.

ES 2 958 818 A1

DESCRIPCIÓN

COMBINACIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE GLIOMAS

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de la biomedicina, particularmente en el tratamiento del cáncer. Más concretamente, se refiere al tratamiento de tumores cerebrales y, especialmente, el tratamiento del glioblastoma mediante la combinación
10 de cannabinoides y fármacos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los gliomas se encuentran entre los tumores que afectan al SNC. Incluyen
15 astrocitomas, oligodendrogliomas, glioblastomas y ependimomas. Entre ellos, el tipo más frecuente y agresivo es el glioblastoma (GBM), que puede suponer el 12-15% de los cánceres intracraneales. Se trata de un tipo de tumores altamente malignos que, casi inevitablemente, progresa hacia el empeoramiento o bien recidiva tras los primeros tratamientos, que suelen incluir cirugía, radioterapia y quimioterapia, de
20 manera que la media de supervivencia es de alrededor de 14,6 meses. McBain, C. y colaboradores publicaron en 2021 una revisión de los trabajos publicados entre 2005 y diciembre de 2019 con el que pretendían evaluar la efectividad de los tratamientos adicionales para la primera y subsiguiente progresión o recidiva del glioblastoma (Cochrane Database Syst Rev. 2021 May 4;5(1):CD013579). En total, analizaron 42
25 estudios con 5236 participantes. Se describe un elevado número de opciones de tratamiento frente al glioblastoma entre las que hay fármacos individuales y combinaciones de fármacos. Utilizan como tratamiento de referencia la Lomustina (LOM), en monoterapia o combinada y comprueban que los tratamientos combinados evaluados no mejoran la supervivencia global en comparación con la monoterapia con
30 LOM. En general, indican que se necesitan más ensayos para identificar un tratamiento adecuado. Entre los compuestos analizados están bevacizumab, carboplatin, desatinib, itinotecan, fotemustine, HSPCC-96 vaccine, carotuximab, cediranib, getitinib, regorafenib, además de LOM.

35 En el mismo sentido, existe un elevado número de patentes y solicitudes de patente

que describen tratamientos frente a los gliomas mediante un gran número de compuestos distintos. Incluimos a continuación algunos ejemplos.

5 WO2021113027A1: describe la utilización de un método para tratar el glioma en el que se combinan radioterapia, quimioterapia y farmacoterapia y, opcionalmente, la resección del glioma. La farmacoterapia se basa en composiciones que contienen oleandrina.

10 WO2022142714A1: se refiere al uso de rutaecarpina, que se extrae de la planta *Evodia rutaecarpa* (Juss.), para inhibir la migración de células de glioma como opción para el tratamiento de glioma y, especialmente, de glioblastoma en combinación o no con otros compuestos ya conocidos como temozolomida, bevacizumab, lomustina, carmustina, carboplatina, procarbazona y vincristina.

15 US10391085B2: se refiere a composiciones y métodos para tratar el glioblastoma o el glioblastoma recurrente y sus síntomas asociados mediante la administración de ibudilast (3-isobutiril-2-isopropilpirazolo[1,5-a]piridina) complementada o no con otros agentes terapéuticos como temozolomida, carmustina, bevacizumab, procarbazona, hidroxurea, irinotecán, lomustina, nimotuzumab, sirolimus, mipsagargin, cabozantinib,
20 lomustina, onartuzumab, patupilona (Epothilone B), poliovirus oncolítico recombinante (PVS-RIPO) o cualquier combinación de uno o más de ellos.

WO2015022657A1: describe una combinación farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y lomustina para uso
25 simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un tumor cerebral y, especialmente, del glioblastoma.

WO2010028058A1: se refiere al uso de 2,4-disulfonil fenil terc-butil nitrona (2,4-ds-PBN) para el tratamiento de un glioma mediante la inhibición de la vascularización, del
30 crecimiento o de la diseminación de dicho glioma, la inhibición del desarrollo del glioma y la inhibición de la reaparición del glioma. Puede ir acompañado de radiación, cirugía o quimioterapia, tal como lomustina, vincristina, matulane, PCV (una combinación farmacológica de matulane, lomustina y vincristina), BCNU (carmustina), CCNU (lomustina) y/o DFMO (eflornitina) y está especialmente enfocado en el tratamiento de
35 astrocitomas, oligodendrogliomas o glioblastomas.

Sin embargo, aún no se ha encontrado una terapia realmente eficaz frente al glioma. Ante esta situación, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que puedan actuar frente a este tipo de tumores cerebrales es un campo de gran interés.

5

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Combinación farmacéutica para el tratamiento del glioma.

10 Como se ha indicado en el apartado anterior, se están realizando grandes esfuerzos para encontrar una terapia capaz de tratar con éxito cánceres tan agresivos como son los gliomas, especialmente, los glioblastomas. No solo se ensayan compuestos de índole diversa, también se ha ensayado un gran número de combinaciones de los mismos. Sin embargo, por el momento, no se ha encontrado la solución terapéutica a
15 estos tumores que, además, presentan un alto porcentaje de recidivas y una supervivencia media muy breve.

Actualmente se sabe que todos los gliomas tienen una alta recurrencia, en lo que las GIC juegan un importante papel dado que dicha población celular es resistente a la
20 mayor parte de los tratamientos convencionales y se considera, por tanto, responsable de las recaídas que tienen lugar en estos tipos de tumores. En la presente invención se ha obtenido un fuerte efecto inhibitorio en la capacidad de autorrenovación de las células iniciadoras de gliomas (GIC; del inglés, *Glioma Initiating Cells*) y un fuerte efecto antiangiogénico mediante la combinación de tres elementos entre los que se ha
25 revelado un elevado efecto sinérgico. En concreto estos compuestos son un agente antiangiogénico, un agente alquilante del DNA y cannabinoides.

En el tratamiento de gliomas se han utilizado agentes antiangiogénicos tanto de manera individual como en combinación con otros fármacos; ejemplos de agentes
30 antiangiogénicos son: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab. Se han utilizado especialmente agentes que previenen la interacción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*)
35 con su receptor (VEGFR) y, entre ellos, anticuerpos monoclonales como bevacizumab

(BVZ) La acción de los agentes que previenen la interacción del VEGF con su receptor se centra en la inhibición de las vías de señalización asociadas a VEGF, cuya activación es clave tanto en las células tumorales como en las del estroma para la proliferación vascular. Pese a ello, las terapias antiangiogénicas actuales no han
5 logrado modificar de forma significativa la supervivencia de los pacientes con glioma y, más concretamente, con glioblastoma.

También se ha descrito la utilización de los cannabinoides frente a los tumores cerebrales, en concreto frente a los gliomas y, entre ellos, frente al glioblastoma. Estos
10 compuestos también inhiben la angiogénesis actuando, fundamentalmente, sobre la ruta de señalización del VEGF. Por otro lado, pueden inhibir la migración de las células endoteliales, lo que disminuye la capacidad angiogénica del tumor y con ella la migración celular y las metástasis. De igual modo, se han empleado en combinación con otros compuestos en un intento de tratar el glioma.

15 Un aspecto de la presente invención se refiere a una combinación de fármacos y cannabinoides para el tratamiento del glioma. Dicha combinación incluye un agente antiangiogénico y, al menos, un compuesto cannabinoide y, preferentemente, se utiliza para el tratamiento del glioblastoma

20 El agente antiangiogénico se puede seleccionar del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab. Preferentemente, se selecciona un
25 anticuerpo monoclonal perteneciente al grupo de agentes que previenen la interacción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) con su receptor (VEGFR) y, más preferentemente, se selecciona bevacizumab (BVZ).

En cuanto a los cannabinoides seleccionados, pueden ser delta-9-tetrahidrocannabinol
30 (THC), cannabidiol (CBD) o una mezcla de ambos. Preferentemente, se utilizan THC o THC:CBD en mezclas que van de 1:1 a 1:5. Más preferentemente, se selecciona una mezcla 1:1 de THC:CBD.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una combinación de fármacos y
35 cannabinoides para inhibir la capacidad de autorrenovación de las células iniciadoras

de gliomas (GIC). Dicha combinación incluye un agente antiangiogénico y, al menos, un compuesto cannabinoide.

El agente antiangiogénico se puede seleccionar del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab. Preferentemente, se selecciona un anticuerpo monoclonal perteneciente al grupo de agentes que previenen la interacción del VEGF con su receptor y, más preferentemente, se selecciona BVZ.

10

En cuanto a los cannabinoides seleccionados, pueden ser THC, CBD o una mezcla de ambos. Preferentemente, se utilizan THC o THC:CBD en mezclas que van de 1:1 a 1:5. Más preferentemente, se selecciona una mezcla 1:1 de THC:CBD.

15 Un tercer aspecto de la invención se refiere a una combinación de fármacos y cannabinoides para potenciar la inhibición de la capacidad angiogénica tumoral. Dicha combinación incluye un agente antiangiogénico y, al menos, un compuesto cannabinoide.

20 El agente antiangiogénico se puede seleccionar del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab. Preferentemente, se selecciona un anticuerpo monoclonal perteneciente al grupo de agentes que previenen la interacción del VEGF con VEGFR y, más preferentemente, se selecciona BVZ.

25

En cuanto a los cannabinoides seleccionados, pueden ser THC, CBD o una mezcla de ambos. Preferentemente, se utilizan THC o THC:CBD en mezclas que van de 1:1 a 1:5. Más preferentemente, se selecciona una mezcla 1:1 de THC:CBD.

30

A todas estas combinaciones se les puede añadir un tercer ingrediente, en concreto, un agente alquilante del DNA. Los agentes alquilantes del DNA, como altretamina, bendamustina, busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, oxaliplatino, temozolomida, tiotepa, trabectedin, también se utilizan en el tratamiento

35

del glioma y, especialmente, del GBM. Se han utilizado de manera combinada con otros compuestos, incluidos antiangiogénicos, sin llegar a obtenerse los resultados deseados. Entre estos compuestos, temozolomida (TMZ) es uno de los compuestos que se utilizan habitualmente en la quimioterapia aplicada tras la resección quirúrgica del tumor y combinada con radioterapia.

Un cuarto aspecto de la presente invención, por lo tanto, se refiere a una combinación de fármacos y cannabinoides para el tratamiento del glioma que incluye un agente antiangiogénico, un agente alquilante y, al menos, un compuesto cannabinoide. Esta combinación se utiliza preferentemente en el tratamiento del glioblastoma.

El agente antiangiogénico se puede seleccionar del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab. Preferentemente, se selecciona un anticuerpo monoclonal perteneciente al grupo de agentes que previenen la interacción del VEGF con su receptor VEGFR y, más preferentemente, se selecciona BVZ.

El agente alquilante se selecciona del grupo formado por altretamina, bendamustina, bulsufán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, oxaliplatino, temozolomida, tiotepa y trabectedin, siendo de elección la TMZ.

En cuanto a los cannabinoides seleccionados, pueden ser delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) o una mezcla de ambos. Preferentemente, se utilizan THC o THC:CBD en mezclas que van de 1:1 a 1:5. Más preferentemente, se selecciona una mezcla 1:1 de THC:CBD.

Otro aspecto de la invención se refiere a una combinación de fármacos y cannabinoides para inhibir la capacidad de autorrenovación de las GIC. Dicha combinación incluye un agente antiangiogénico, un agente alquilante y, al menos, un compuesto cannabinoide.

El agente antiangiogénico se puede seleccionar del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor

plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab. Preferentemente, se selecciona un anticuerpo monoclonal perteneciente al grupo de agentes que previenen la interacción del VEGF con su receptor y, más preferentemente, se selecciona BVZ.

5

El agente alquilante se selecciona del grupo formado por altretamina, bendamustina, bulsufán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, oxaliplatino, temozolomida, tiotepa y trabectedin, siendo de elección la TZM.

10

En cuanto a los cannabinoides seleccionados, pueden ser THC, CBD o una mezcla de ambos. Preferentemente, se utilizan THC o THC:CBD en mezclas que van de 1:1 a 1:5. Más preferentemente, se selecciona una mezcla 1:1 de THC:CBD.

15

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una combinación de fármacos y cannabinoides para potenciar la inhibición de la capacidad angiogénica tumoral. Dicha combinación incluye un agente antiangiogénico, un agente alquilante y, al menos, un compuesto cannabinoide.

20

El agente antiangiogénico se puede seleccionar del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab. Preferentemente, se selecciona un anticuerpo monoclonal perteneciente al grupo de agentes que previenen la interacción del VEGF con VEGFR y, más preferentemente, se selecciona BVZ.

25

El agente alquilante se selecciona del grupo formado por altretamina, bendamustina, bulsufán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, oxaliplatino, temozolomida, tiotepa y trabectedin, siendo de elección la TZM.

30

Los cannabinoides seleccionados pueden ser THC, CBD o una combinación de ambos. Preferentemente, se utilizan THC o THC:CBD en combinaciones que van de 1:1 a 1:5. Más preferentemente, se selecciona una combinación 1:1 de THC:CBD.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente.

Figura 1. Ensayos de viabilidad celular en las líneas celulares primarias 12O12 (Figura 1A) y GH2 (Figura 1B), así como de la capacidad de autorrenovación (Figuras 1C y 1D) y de proliferación (Figuras 1E y 1F) de dichas células iniciadoras de gliomas (GICs).

Figura 2. Evaluación y cuantificación (Figuras 2A y 2B, respectivamente) de la capacidad de la línea celular HUVEC de formar estructuras similares a vasos, tras el tratamiento con BVZ, THC:CBD, TMZ y combinaciones de los mismos y control de la viabilidad de dichas células (Figura 2C).

Figura 3. Esquema de la administración de los tratamientos ensayados, BVZ y THC, (Figura 3A), tamaño de los tumores (Figura 3B) y supervivencia de los ratones (Figura 3C) con las distintas combinaciones.

Figura 4. Esquema de la administración de los tratamientos ensayados, BVZ, THC:CBD y TMZ, (Figura 4A), tamaño de los tumores (Figura 4B) y supervivencia de los ratones (Figura 4C) con las distintas combinaciones.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Ensayos *in vitro*

Para estos ensayos se utilizaron dos líneas celulares primarias denominadas 12O12 y GH2, que son GIC derivadas de pacientes con glioblastoma. Los ensayos *in vitro* se realizaron para estudiar la viabilidad de estas células y su capacidad de proliferación ante un tratamiento antitumoral combinado con BVZ y THC, en primera instancia, y

con un tratamiento en el que se utilizaron BVZ, THC y cannabidiol (CBD), en una proporción 1:1, y TMZ.

Ejemplo 1.1. Ensayos de viabilidad celular

5

La viabilidad celular se determinó mediante la utilización del reactivo WST-1 (Sigma-Aldrich, ref. 11644807001), especialmente indicado para valorar la viabilidad de células que crecen en suspensión. El WST-1 es una sal de tetrazolio que puede ser escindida por las deshidrogenasas mitocondriales que participan en la respiración celular, produciendo un compuesto coloreado (formazán) que puede cuantificarse mediante el análisis de la absorbancia a una longitud de onda comprendida entre 420 y 480 nm. De modo que la intensidad del color producido se correlaciona con el número de células viables y, por tanto, con la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. De esta manera, para dicha valoración, las GIC de ambas líneas celulares se sembraron en pocillos de placas p96 (de 96 pocillos) a una densidad de 5.000 células/pocillo y tras los correspondientes días de incubación con los distintos tratamientos se adicionó el reactivo WST-1. Tras 4 horas de incubación, se midió la absorbancia de la placa p96 a 450 nm.

20 Se muestra el efecto del tratamiento con distintas concentraciones de Bevacizumab (0.1mg/ml – 3mg/ml) o la combinación de THC (7 μ M) y las distintas concentraciones de BVZ durante 72h sobre la viabilidad de células 12O12 (Figura 1A) o de distintas combinaciones de Bevacizumab (1 mg/ml – 7,5 mg/ml) o la combinación de las distintas combinaciones de Bevacizumab (1 mg/ml – 7,5 mg/ml) y THC (7 μ M) en células GH2 (Figura 1B) (determinado por ensayos WST, media $\pm$ SEM, n=3). En cuanto al análisis estadístico, se llevó a cabo la comparación de cada grupo de tratamiento con el grupo control (dicho grupo control incluyó la adición de dimetilsulfóxido (DMSO, el vehículo en el que se disolvieron los cannabinoides, como control de cannabinoides) y PBS (el vehículo en el que iba disuelto el BVZ, como control del BVZ), indicando los niveles de significancia con el símbolo ‘*’ así como la comparación del tratamiento con BVZ o del tratamiento con BVZ y THC, indicando los niveles de significancia con el símbolo ‘#’. Dicha representación estadística se usó de forma similar para la representación del resto de análisis. * P <0,05 ** P <0,01 *** P <0,001 respecto a células tratadas con vehículo (Veh: DMSO + PBS). ## P <0.01 ### P <0.001 #### P <0.0001 respecto a células tratadas con THC+BVZ.

Así, estos resultados permitieron comprobar cómo el efecto combinado del tratamiento con THC y BVZ durante 72 horas reducía la viabilidad tanto de las células 12O12 (Figura 1A) como de las células GH2 (Figura 1B) a diferentes concentraciones (0.1mg/ml – 3mg/ml (12O12), 1mg/ml – 7.5mg/ml (GH2)) en mayor medida que los controles o que el tratamiento con BVZ de manera individual.

Ejemplo 1.2. Ensayos de autorrenovación de GIC

A continuación, se analizó el efecto de los distintos tratamientos de las células iniciadoras de gliomas GICs mediante el ensayo de autorrenovación de dilución límite o LDA.

Para la realización de este ensayo LDA *in vitro*, los cultivos de GIC se sembraron e incubaron con los distintos tratamientos (siguiendo el mismo protocolo citado anteriormente, en pocillos de placas p96 a una densidad de 5.000 células/pocillo). Tras 5 días de tratamiento, las esferas se disgregaron y se sembraron en pocillos de placas p96 a diferentes densidades comprendidas entre 100 y 10 células/pocillo. Una semana después se evaluó la formación de neuroesferas, de forma que los pocillos en los que se observó la presencia de al menos una neuroesfera fueron considerados positivos. Estos resultados se procesaron utilizando el software específico ELDA (acrónimo del nombre de este ensayo en inglés *Extreme Limiting Dilution Assay*)(Hu, Y. & Smyth, GK. 2009. J Immunol Methods; 347(1-2):70-8). Específicamente, el software ELDA proporciona un gráfico en el que se representa el logaritmo de la fracción de pocillos en los que no ha crecido ninguna neuroesfera (pocillos negativos) en el eje Y (log), y el número de células sembradas en cada pocillo en el eje X (nº cel.). De esta forma, una menor pendiente, implica que existe una menor proporción de células iniciadoras de tumores dentro del cultivo. Las líneas punteadas representan un intervalo de confianza del 95%.

La Figura 1C muestra el efecto del tratamiento con THC (7 µM) y Bevacizumab (BVZ, 1 mg/ml) sobre la capacidad de autorrenovación de las células 12O12, determinada por el ensayo LDA (n=3). Los símbolos indican la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 o **** P<0,0001 respecto a células tratadas con Veh; y ### P <0,001 con respecto a

células tratadas con BVZ.

La Figura 1D muestra el efecto del tratamiento con THC:CBD (1:1; 3,5 μ M THC + 3,5 μ M CBD); Bevacizumab (1 mg/ml) y Temozolomida (TMZ, 100 μ M) sobre la capacidad de autorrenovación de las células 12O12 (determinada por el ensayo LDA. (n=3). Los símbolos indican la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos: **** P<0,0001 respecto a células tratadas con Veh o ### P<0,001 o ##### P <0.0001 respecto a células tratadas con THC:CBD + BVZ + TMZ.

Los resultados obtenidos permitieron comprobar que el efecto combinado del tratamiento con THC y BVZ inhibía casi completamente la capacidad de autorrenovación de las GIC 12O12 (Figura 1C) y lo hacía en mayor medida que el tratamiento con THC o con BVZ de manera individual. Dichos resultados se reprodujeron cuando se utilizó la mezcla de THC y CBD en proporción 1:1 (Figura 1D). Además, la inhibición de la capacidad de autorrenovación de las células GIC se vio notablemente incrementada cuando se utilizó la triple combinación, THC:CBD (1:1) + BVZ + TMZ (Figura 1D)

Ejemplo 1.3. Ensayos de proliferación

Por otro lado, se desarrollaron ensayos específicos para analizar el impacto de los tratamientos descritos en los ejemplos anteriores en la capacidad proliferativa de las GIC. En este caso se analizó el número de células generadas en el cultivo en dos pases consecutivos (las células se sembraron a una densidad de 50.000 células por flask (25 cm²)) en presencia de cada tratamiento o combinación de tratamientos, de manera que al final de cada pase se disgregaron las neuroesferas y se contabilizó el número de células que volvieron a sembrarse a la misma densidad (50.000 células por condición). Finalmente, al final del segundo pase se volvió a contabilizar el número de células obtenidas con cada tratamiento.

La figura 1E muestra el efecto del tratamiento con THC (7 μ M) y Bevacizumab (BVZ, 1 mg/ml) sobre el número total de células 12O12 durante dos pasajes consecutivos. Los símbolos en la figura indican: ** P <0,01 respecto a células tratadas con Veh, ## P < 0.01 con respecto a células tratadas con THC y & P<0.05 respecto a células tratadas con BVZ.

La figura 1F muestra el efecto del tratamiento con THC:CBD (1:1; 3,5 μ M THC + 3,5 μ M CBD); Bevacizumab (1 mg/ml) y Temozolomida (100 μ M) sobre el número total de células 12O12 durante dos pasajes consecutivos (n=2). Los símbolos en la figura indican: * P<0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 o **** P<0,0001 respecto a células tratadas con Veh; &&&P<0.001 respecto a células tratadas con THC:CBD; %%% P<0.001 respecto a células tratadas con TMZ, ^ P<0.05 respecto a células tratadas con BVZ y ## P < 0.01 respecto a células tratadas con THC:CBD + BVZ.

Al igual que en el caso de la capacidad de autorrenovación, el análisis de la capacidad proliferativa mostró que el efecto combinado del tratamiento con THC y BVZ inhibía casi completamente la capacidad proliferativa de las GIC de las células 12O12 (Figura 1F) en mayor medida que el tratamiento con THC o con BVZ de manera individual. Dichos resultados se reprodujeron cuando se utilizó la mezcla de THC y CBD en proporción 1:1 en combinación con BVZ (Figura 1G). Además, la inhibición de la capacidad de autorrenovación de las células GIC se vio incrementada en mayor medida cuando se utilizó la triple combinación, THC:CBD (1:1), BVZ y TMZ (Figura 1F).

20 **Ejemplo 2. Ensayo mecanístico**

Se evaluó la capacidad antiangiogénica del tratamiento combinado con BVZ, TMZ y THC y CBD.

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en un modelo *in vitro* de formación de vasos utilizamos la línea celular HUVEC (del inglés, "Human umbilical vein endothelial cells"), un tipo celular capaz de formar estructuras que mimetizan a los vasos endoteliales. Inicialmente, se sembraron 50 μ L de BD Matrigel Matrix (BD Biosciences) por pocillo en una placa p96, siendo la concentración final del matrigel de 7,2 mg/mL. Después, se incubó 30 minutos a 37 °C para que polimerizara el matrigel. Posteriormente, se sembraron 5.000 células HUVEC por pocillo, resuspendidas en medio de células endoteliales (Sigma) y medio condicionado (1:1) hasta completar un volumen total de 150 μ L. Este medio condicionado es el medio de cultivo de las GIC tratadas con THC:CBD [1:1, 7,5 μ M (3,5 μ M THC + 3,5 μ M CBD)]; Bevacizumab (1 mg/ml); Temozolamida (100 μ M). Este ensayo permite analizar cómo afectan los tratamientos estudiados en los ejemplos anteriores a la capacidad de las GIC de

producir, o no, factores angiogénicos que faciliten a las HUVEC la formación de estructuras similares a vasos, es decir, se puede analizar cuáles de los tratamientos estudiados impiden o favorecen la presencia en el medio de cultivo de factores angiogénicos. A las 24 horas, se observó cada pocillo para analizar la presencia de estructuras similares a vasos y se tomaron fotografías, con el fin de cuantificar dichas estructuras. Esta cuantificación se llevó a cabo con el programa ImageJ.

En la figura 2A se muestran fotografías de las estructuras tubulares formadas por células HUVEC tras 24h de cultivo en presencia del medio condicionado derivado de células 12O12 tratadas con THC:CBD [1:1, 7,5 μ M (3,5 μ M THC + 3,5 μ M CBD)]; Bevacizumab (1 mg/ml); Temozolamida (100 μ M) y las correspondientes combinaciones de estos compuestos a esas mismas concentraciones.

La figura 2B muestra la cuantificación del número de nodos (puntos de intersección entre los vasos) formados por las células HUVEC en presencia de los diferentes medios condicionados. Estos datos son representativos de la capacidad de las células HUVEC para formar nuevos vasos (media $\pm$ SEM, n=3). Los símbolos en la figura indican: n° n. = número de nodos; *** P<0,001 o **** P<0,0001 respecto a células HUVEC cultivadas en un medio condicionado de células 12O12 (Veh). # P<0,05 respecto a células HUVEC cultivadas en un medio condicionado de células 12O12 (THC:CBD + BVZ); %% P< 0.01 respecto a células HUVEC cultivadas en un medio condicionado de células 12O12 (THC:CBD + TMZ) y && P<0.01 respecto a células HUVEC cultivadas en un medio condicionado de células 12O12 (THC:CBD + BVZ + TMZ).

En la figura 2C se muestra el efecto de los medios condicionados derivados de las células 12O12 sometidas a los distintos tratamientos en la variación en el número de células HUVEC en cultivo (estimada mediante el ensayo MTT, que es un método colorimétrico cuantitativo con el que se mide la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad celular, proliferación y citotoxicidad). Dicha variación podría deberse a un aumento en la proliferación o a la muerte de las células en cultivo. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM (n=3). Los símbolos en el panel indican: * P < 0.05, ** P < 0.01 respecto a células tratadas con Veh (DMSO+PBS).

Observamos cómo la incubación con los medios condicionados inhibe

progresivamente la formación de estructuras similares a vasos por parte de las células HUVEC, hasta que dicha capacidad queda anulada por completo en el caso de la incubación con medios condicionados derivados de células 12O12 que habían sido tratadas con la triple combinación de BVZ, THC:CBD y TMZ (Figuras 2A y 2B).

- 5 Además, demostramos que ese efecto no se debía a un efecto del medio condicionado en la viabilidad de las células HUVEC (V.C en Figura 2C).

Ejemplo 3. Ensayos *in vivo*

- 10 Para evaluar la relevancia preclínica de los tratamientos ensayados en los ejemplos anteriores en un ensayo *in vivo*, se procedió a la inyección intracraneal de GIC procedentes de glioblastoma, que son capaces de generar tumores, en ratones inmunodeficientes, dando lugar a un tumor fenotípicamente idéntico al original en el que se reproduce la heterogenicidad celular presente en la lesión inicial. Estos ensayos se han realizado a partir de células procedentes de glioblastoma por ser los gliomas
- 15 más agresivos y frecuentes.

- Específicamente, los trasplantes de células de glioblastoma se realizaron en ratones inmunodeprimidos Nude Foxn1nu (Harlan Ibérica) de entre 2 y 3 meses de edad. Los trasplantes consistieron en la inyección intracraneal de 100.000 células 12O12,
- 20 resuspendidas en 4 µl del medio de crecimiento de GIC, en el cuerpo estriado del hemisferio cerebral derecho (coordenadas A-P: +1 mm; M-L: -2 mm; D-V: -3 mm respecto al Bregma). Esto se llevó a cabo con la ayuda de un aparato de estereotaxia y una jeringa Hamilton de 10 µl (modelo 701RN), con una aguja 26s ga 2" (Hamilton, #7635-01). Para ello, los animales se anestesiaron con isoflurano (Isoflo #5683,
- 25 Esteve) y se les inyectó subcutáneamente una mezcla de buprenorfina (0,1 mg/kg) y meloxicam (1 mg/kg) para inducir la analgesia en las horas posteriores a la intervención quirúrgica. Los animales se mantuvieron en una manta termorreguladora (Cibertec) a 37°C hasta que recuperaron la consciencia. Cuatro días después de la cirugía (semana -1), se comenzó con los tratamientos basados en las diferentes
- 30 combinaciones del experimento, previa asignación aleatoria de los animales a cada grupo experimental. El día que comienzan los tratamientos es el día 0 de la semana 1.

- Para simular un retraso o prevención en el desarrollo tumoral tras la resección quirúrgica que ocurriría en pacientes, en este experimento tan pronto como los ratones
- 35 se recuperaron de la cirugía (aproximadamente 4 días después de la inyección de las

células tumorales) (semana -1) se comenzaron a ensayar los diferentes tratamientos (día 0, semana 1).

Ejemplo 3.1. Ensayos control *in vivo*

- 5 En cuanto a los tratamientos, el BVZ y la TMZ se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana (W), mientras que los cannabinoides, el THC o la mezcla de THC y CBD en una proporción 1:1, fueron administrados por vía oral de forma diaria durante las 2 primeras semanas para ir, posteriormente, reduciendo la frecuencia de la administración a 5 días por semana en la semana 3 y a 3 días por semana en la
- 10 semana 5. En estos experimentos se empleó IgG humanizada como control del BVZ y aceite de sésamo como control de los cannabinoides (Figura 3A). En la Figura 3A, con "IC Inj." se indica el momento de la inyección intracraneal y con "Srvl.A" los animales supervivientes.
- 15 El ensayo *in vivo* muestra el efecto del tratamiento con THC, BVZ o la combinación de THC y BVZ en los tumores generados. La Figura 3B muestra el efecto de la administración oral de THC (15 mg/kg) e intraperitoneal (I.P.) de BVZ (10mg/kg) en el volumen de los tumores ortotópicos mediante una gráfica que representa el volumen tumoral de cada animal (mm^3) 4-6 semanas después de la inyección intracraneal de
- 20 células 12O12. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; (n = 7-10). Los símbolos en el gráfico corresponden a: ** $P < 0,01$ respecto a los tumores tratados con Veh y # $P < 0.05$ con respecto a los tumores tratados con BVZ. Así, el análisis de los resultados demostró que el volumen tumoral era menor al tratar con la combinación de BVZ y THC que cuando se trataron los tumores con BVZ o THC de manera individual.
- 25 En el mismo experimento, se analizó también la supervivencia de los ratones sometidos a esos tratamientos. Dicho efecto se muestra en la Figura 3C en una gráfica de Kaplan-Meier (n=10 por condición experimental). Los símbolos en la gráfica corresponden a ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$ con respecto al tratamiento con Veh y # $P <$
- 30 0.05 con respecto a los tumores tratados con BVZ. El tratamiento con BVZ, así como el tratamiento combinado de BVZ + THC, incrementó significativamente la supervivencia de los ratones en comparación con la supervivencia de los ratones que portaban tumores que fueron tratados con Veh. Además, la doble combinación de BVZ y THC consiguió una supervivencia significativamente mayor que el tratamiento con
- 35 BVZ o con THC. Estos resultados mostraron que el grupo de ratones tratados con la

combinación BVZ y THC presentaban una supervivencia significativamente mayor que el grupo control (Figura 3C).

Ejemplo 3.2. Ensayos *in vivo* con la combinación BVZ, THC:CBD, TMZ

- 5 A continuación, se desarrolló otro experimento en el que se analizó el efecto del tratamiento combinado de BVZ, THC:CBD (en una proporción 1:1) y TMZ. Para ello se utilizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 3.1. para generar los tumores ortotópicos. La Figura 4 muestra el efecto de la administración oral de THC:CBD (1:1) [THC (7.5 mg/kg) + CBD (7.5 mg/kg)]; e intraperitoneal de BVZ (10mg/kg) y TMZ (5
- 10 mg/kg) en el tamaño de tumores generados mediante la inyección intracraneal de 10×10^4 células 12O12. Como se resume en la Figura 4A, la administración de los fármacos y cannabinoides fue similar a la pauta del ejemplo 3.1, añadiendo la TMZ al administrar BVZ: la mezcla THC:CBD se administró por vía oral desde el día cero todos los días de la semana, a partir de la tercera semana se administró 5 días por semana
- 15 y, a partir de la sexta semana, 3 veces por semana; TMZ y BVZ se administraron 2 veces por semana. La Figura 4B representa la gráfica del volumen tumoral de cada animal (mm^3) 4-6 semanas después de la inyección intracraneal. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM; ($n = 5-10$). Los símbolos en la gráfica corresponden a: * $P < 0,05$ respecto a los tumores tratados con Veh. Así, el análisis de los resultados
- 20 demostró que el volumen tumoral disminuía muy significativamente al tratar los ratones con la combinación de BVZ y THC:CBD (1:1), volumen que era aún menor cuando se utilizó la triple combinación BVZ, THC:CBD (1:1) y TMZ. (* $P < 0.05$ con respecto al tratamiento con Veh).
- 25 Como en el caso del Ejemplo 3.1., se analizó el efecto de los distintos tratamientos sobre la supervivencia de los ratones. Los símbolos en la gráfica que se muestra en la Figura 4C corresponden a: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ o **** $P < 0,0001$ respecto a los tumores tratados con Veh; ## $P < 0.01$ respecto a los tumores tratados con BVZ+TMZ, %% $P < 0.01$ respecto a los tumores tratados con BVZ+THC:CBD,
- 30 ^^^ $P < 0.0001$ respecto a los tumores tratados con BVZ.

Así el tratamiento con la triple combinación BVZ, THC:CBD (1:1) y TMZ produjo un aumento significativo de la supervivencia de los ratones y mayor que el que producen los tratamientos individuales o los tratamientos dobles.

REIVINDICACIONES

1. Combinación de fármacos y cannabinoides para el tratamiento de un glioma que incluye un agente antiangiogénico y, al menos, un compuesto cannabinoide.
5
2. Combinación según la reivindicación 1 en la que el agente antiangiogénico se selecciona del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab,
10 ranibizumab.
3. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el agente antiangiogénico es un anticuerpo monoclonal que previenen la interacción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) con su receptor (VEGFR).
15
4. Combinación según la reivindicación 3 en la que el agente antiangiogénico es bevacizumab (BVZ).
5. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el
20 compuesto cannabinoide es delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) o una mezcla de ambos.
6. Combinación según la reivindicación 5 en la que el compuesto cannabinoide es THC.
25
7. Combinación según la reivindicación 5 en la que el compuesto cannabinoide es una mezcla THC:CBD.
8. Combinación según la reivindicación 7 en la que la mezcla de cannabinoides
30 THC:CBD va de 1:1 a 1:5.
9. Combinación según la reivindicación 7 en la que la mezcla de cannabinoides THC:CBD es 1:1.
- 35 10. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el

glioma es un glioblastoma.

11. Combinación de fármacos y cannabinoides para inhibir la capacidad de autorrenovación de las células iniciadoras de gliomas (GIC) que incluye un agente
5 antiangiogénico y, al menos, un compuesto cannabinoide.

12. Combinación según la reivindicación 11 en la que el agente antiangiogénico se selecciona del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina,
10 SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab.

13. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 11-12 en la que el agente antiangiogénico es un anticuerpo monoclonal que previene la interacción del VEGF
15 con su receptor.

14. Combinación según la reivindicación 13 en la que el anticuerpo monoclonal es BVZ.

20 15. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 11-14 en la que los cannabinoides seleccionados son THC, CBD o una mezcla de ambos.

16. Combinación según la reivindicación 15 en la que el compuesto cannabinoide es THC.
25

17. Combinación según la reivindicación 15 en la que el compuesto cannabinoide es una mezcla THC:CBD.

18. Combinación según la reivindicación 17 en la que la mezcla de cannabinoides
30 THC:CBD va de 1:1 a 1:5.

19. Combinación según la reivindicación 17 en la que la mezcla de cannabinoides THC:CBD es 1:1.

35 20. Combinación de fármacos y cannabinoides para potenciar la inhibición de la

capacidad angiogénica tumoral que incluye un agente antiangiogénico y, al menos, un compuesto cannabinoide.

21. Combinación según la reivindicación 20 en la que el agente antiangiogénico se
5 selecciona del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab.
- 10 22. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 20-21 en la que el agente antiangiogénico es un anticuerpo monoclonal que previene la interacción del VEGF con VEGFR.
23. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 20-22 en la que el agente
15 antiangiogénico es BVZ.
24. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 20-23 en la que el cannabinoide es THC, CBD o una mezcla de ambos.
- 20 25. Combinación según la reivindicación 24 en la que el compuesto cannabinoide es THC.
26. Combinación según la reivindicación 24 en la que el compuesto cannabinoide es una mezcla THC:CBD.
25
27. Combinación según la reivindicación 26 en la que la mezcla de cannabinoides THC:CBD va de 1:1 a 1:5.
28. Combinación según la reivindicación 27 en la que la mezcla de cannabinoides
30 THC:CBD es 1:1.
29. Combinación de fármacos y cannabinoides para el tratamiento de un glioma que incluye un agente antiangiogénico, un compuesto alquilante del DNA y, al menos, un compuesto cannabinoide.
35

30. Combinación según la reivindicación 29 en la que el agente antiangiogénico se selecciona del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab,
5 ranibizumab.

31. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 29-30 en la que el agente antiangiogénico es un anticuerpo monoclonal que previenen la interacción del VEGF con su receptor, VEGFR.
10

32. Combinación según la reivindicación 31 en la que el agente antiangiogénico es bevacizumab (BVZ).

33. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 29-32 en la que el compuesto cannabinoide es THC, CBD o una mezcla de ambos.
15

34. Combinación según la reivindicación 33 en la que el compuesto cannabinoide es THC.

20 35. Combinación según la reivindicación 33 en la que el compuesto cannabinoide es una mezcla THC:CBD.

36. Combinación según la reivindicación 35 en la que la mezcla de cannabinoides THC:CBD va de 1:1 a 1:5.
25

37. Combinación según la reivindicación 35 en la que la mezcla de cannabinoides THC:CBD es 1:1.

38. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 29-37 en la que el agente alquilante del DNA se selecciona del grupo: altretamina, bendamustina, bulsufán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, oxaliplatino, temozolomida, tiotepa, trabectedin.
30

35 39. Combinación según la reivindicación 38 en la que el agente alquilante del DNA es

TMZ.

40. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 29-39 en la que el glioma es un glioblastoma.

5

41. Combinación de fármacos y cannabinoides para inhibir la capacidad de autorrenovación de las células iniciadoras de gliomas (GIC) que incluye un agente antiangiogénico, un agente alquilante del DNA y, al menos, un compuesto cannabinoide.

10

42. Combinación según la reivindicación 41 en la que el agente antiangiogénico se selecciona del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina, SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab.

15

43. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 41-42 en la que el agente antiangiogénico es un anticuerpo monoclonal que previene la interacción del VEGF con su receptor.

20

44. Combinación según la reivindicación 43 en la que el anticuerpo monoclonal es BVZ.

45. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 41-44 en la que los cannabinoides seleccionados son THC, CBD o una mezcla de ambos.

25

46. Combinación según la reivindicación 45 en la que el compuesto cannabinoide es THC.

47. Combinación según la reivindicación 45 en la que el compuesto cannabinoide es una mezcla THC:CBD.

30

48. Combinación según la reivindicación 47 en la que la mezcla de cannabinoides THC:CBD va de 1:1 a 1:5.

35

49. Combinación según la reivindicación 47 en la que la mezcla de cannabinoides THC:CBD es 1:1.

50. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 41-49 en la que el agente
5 alquilante de DNA se selecciona del grupo: altretamina, bendamustina, bulsufán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, oxaliplatino, temozolomida, tiotepa, trabectedin.

10 51. Combinación según la reivindicación 50 en la que el agente alquilante del DNA es TMZ.

52. Combinación de fármacos y cannabinoides para potenciar la inhibición de la capacidad angiogénica tumoral que incluye un agente antiangiogénico, un agente
15 alquilante del DNA y, al menos, un compuesto cannabinoide.

53. Combinación según la reivindicación 52 en la que el agente antiangiogénico se selecciona del grupo formado por: angiostatina, endostatina, itraconazol, carboxyamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor plaquetario 4, suramina,
20 SU5416, tasquinimod, trombospondina, talidomida, bevacizumab, ramucirumab, ranibizumab.

54. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 52-53 en la que el agente antiangiogénico es un anticuerpo monoclonal que previene la interacción del VEGF
25 con VEGFR.

55. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 52-54 en la que el agente antiangiogénico es BVZ.

30 56. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 52-55 en la que el cannabinoide es THC, CBD o una mezcla de ambos.

57. Combinación según la reivindicación 56 en la que el compuesto cannabinoide es THC.
35

Fig. 1A

12O12

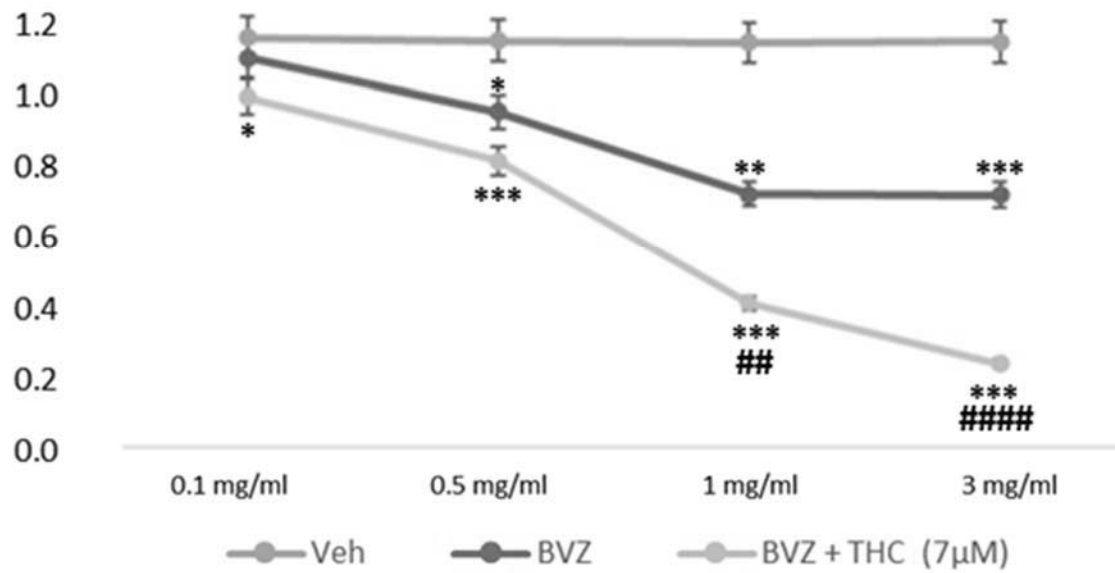


Fig. 1B

GH2

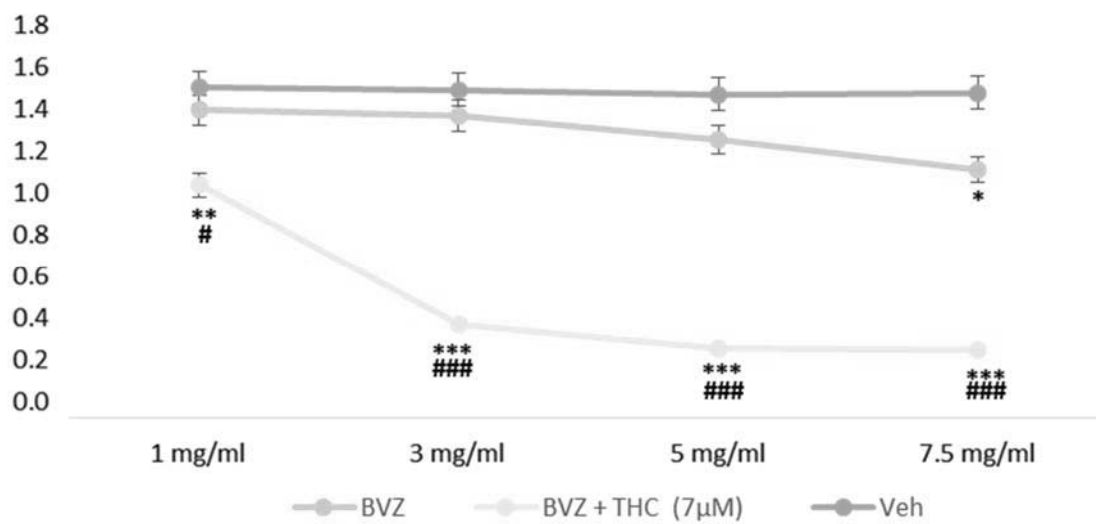


Fig. 1C

12O12

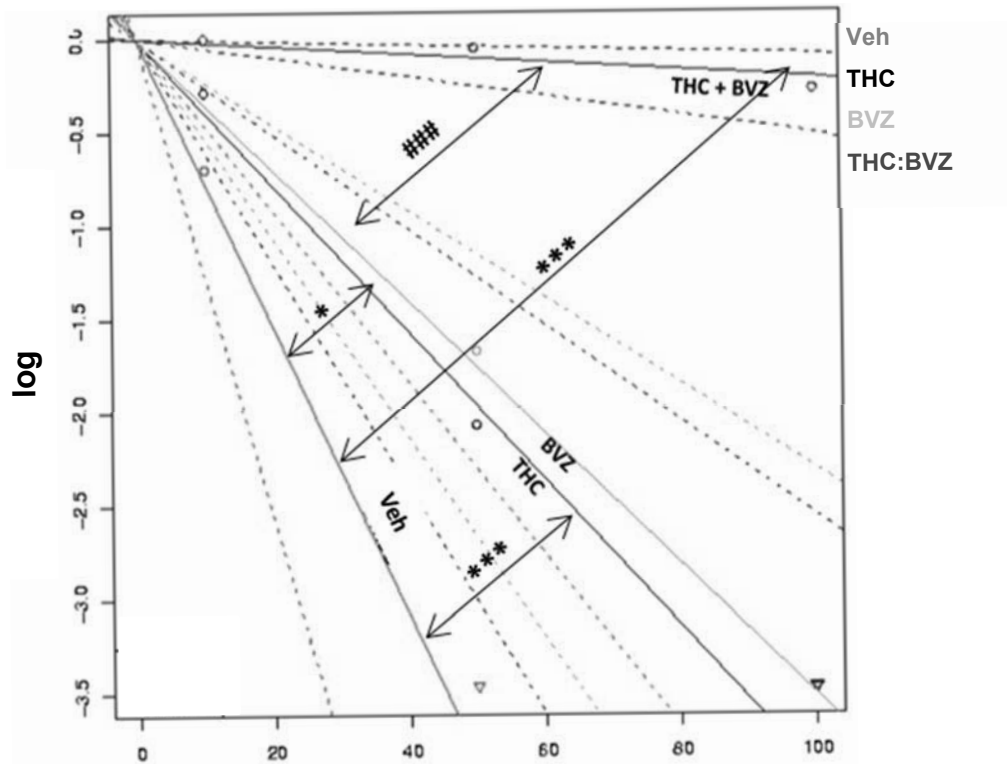


Fig. 1D

12O12

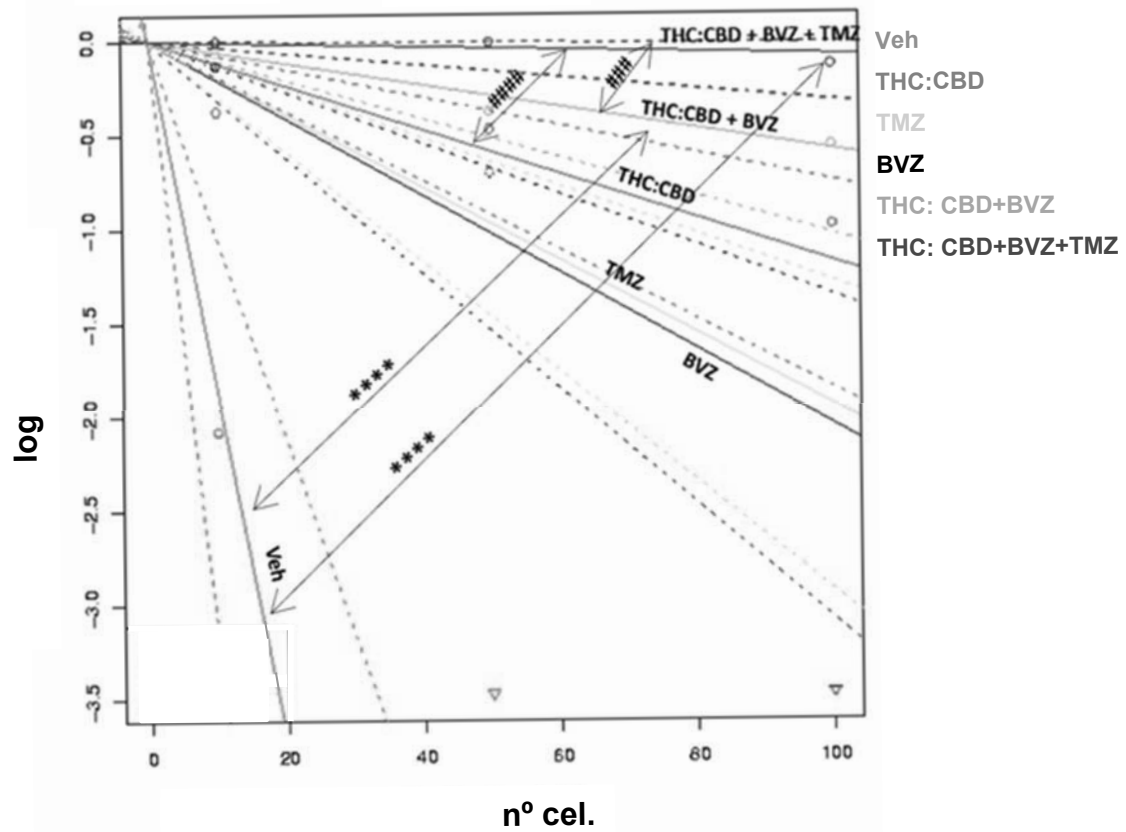


Fig. 1E

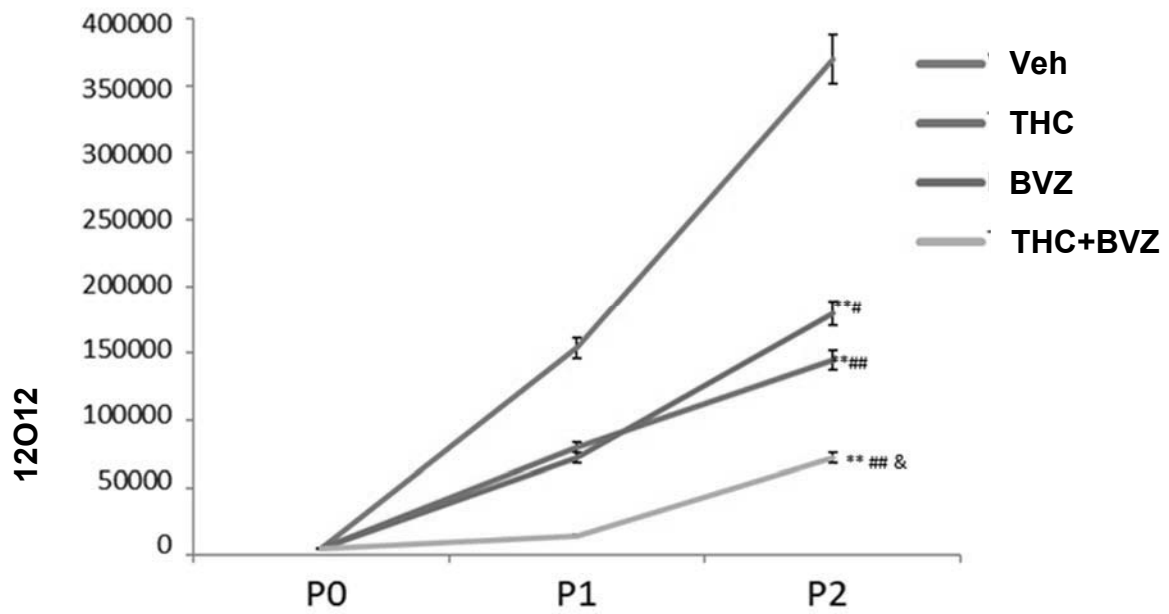


Fig. 1F

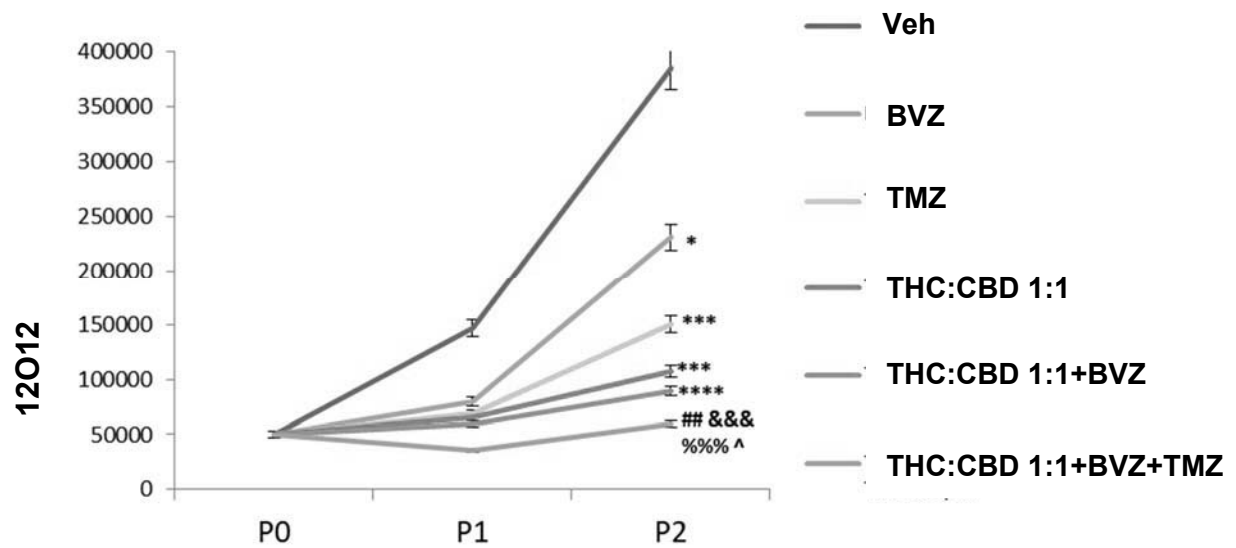
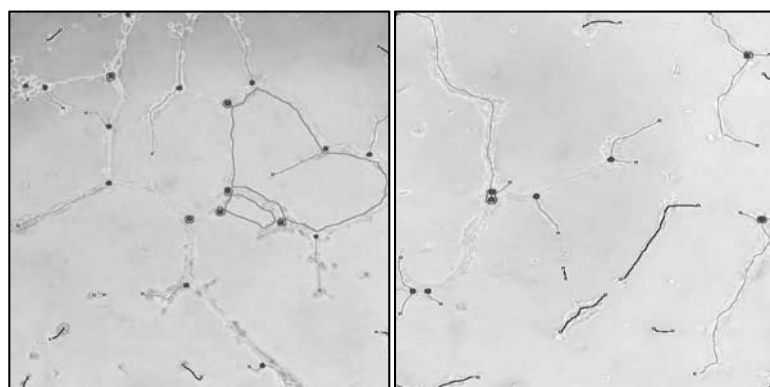
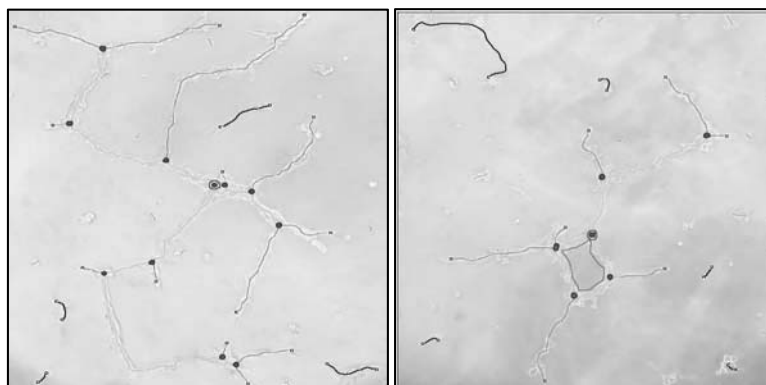


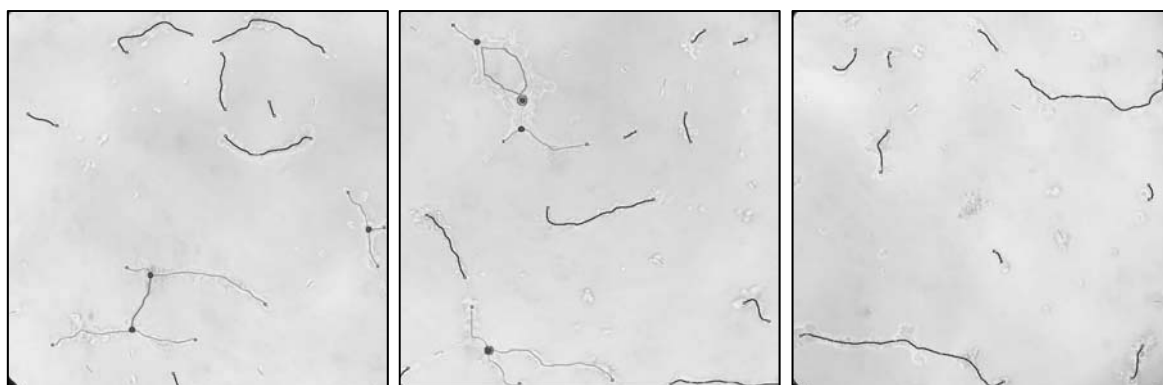
Fig. 2A



BVZ	-	-
THC:CBD	-	+
TMZ	-	-



BVZ	+	-
THC:CBD	-	+
TMZ	-	+



BVZ	+	+	+
THC:CBD	+	-	+
TMZ	-	+	+

Fig. 2B

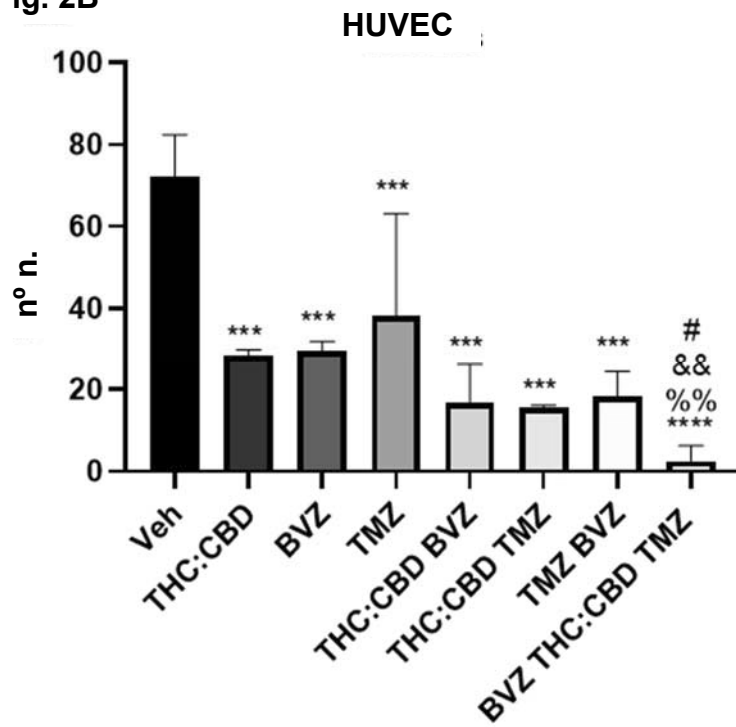


Fig. 2C

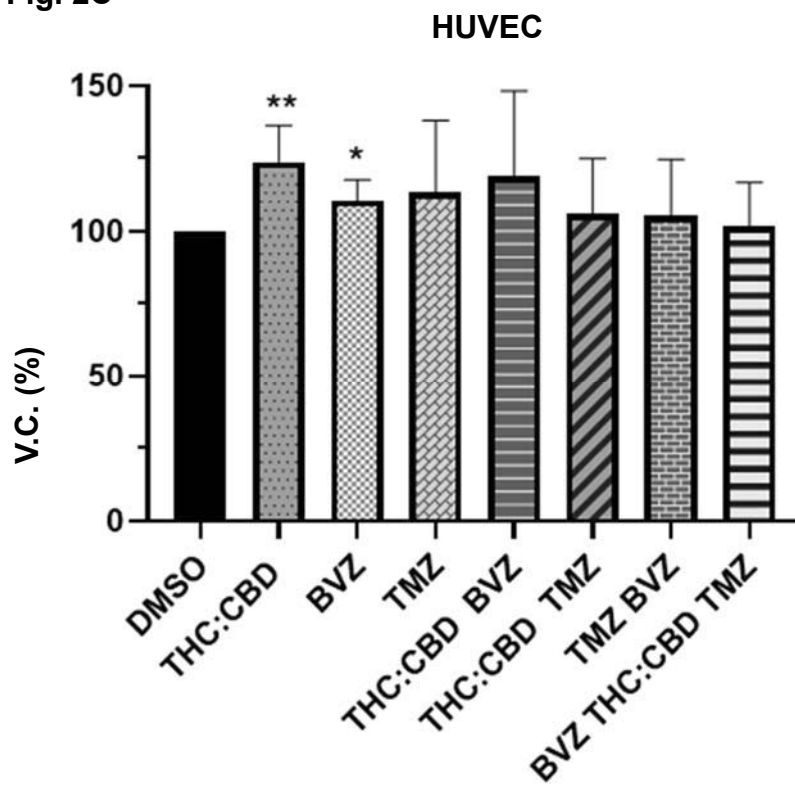


Fig. 3A

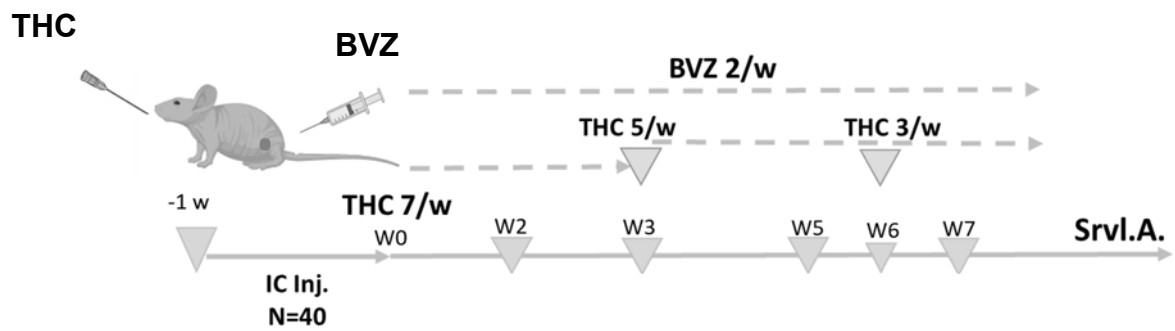


Fig. 3B

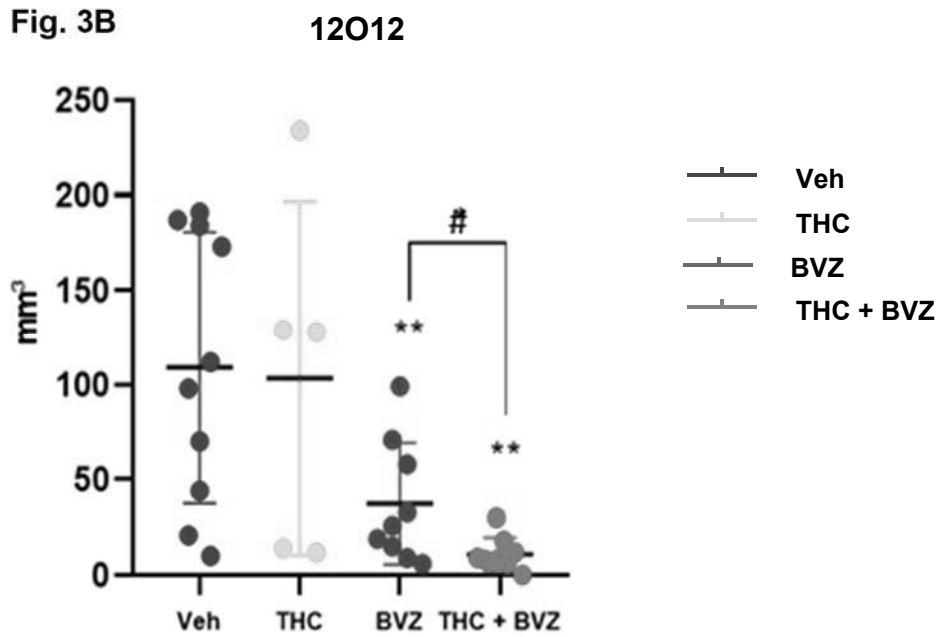


Fig. 3C

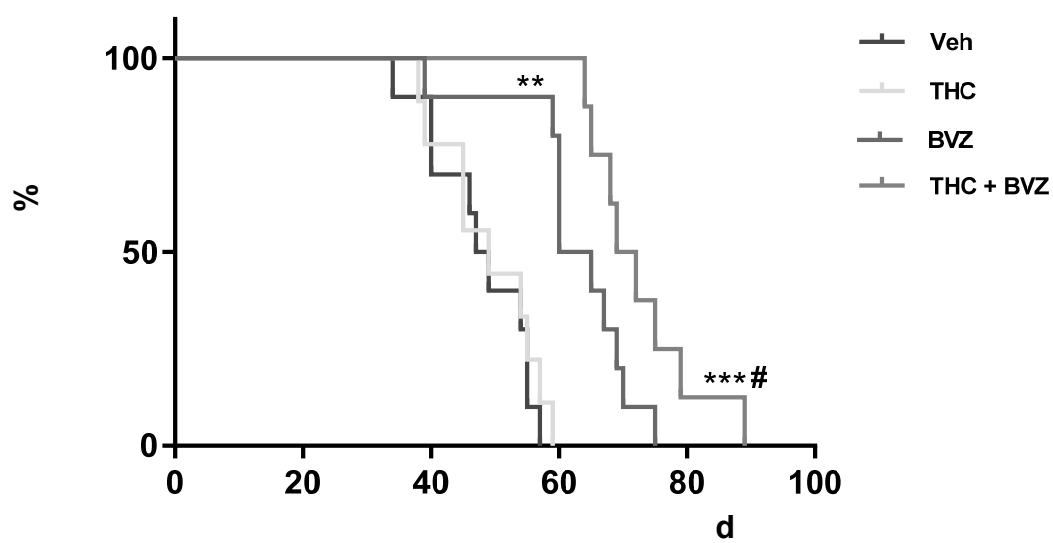


Fig. 4A

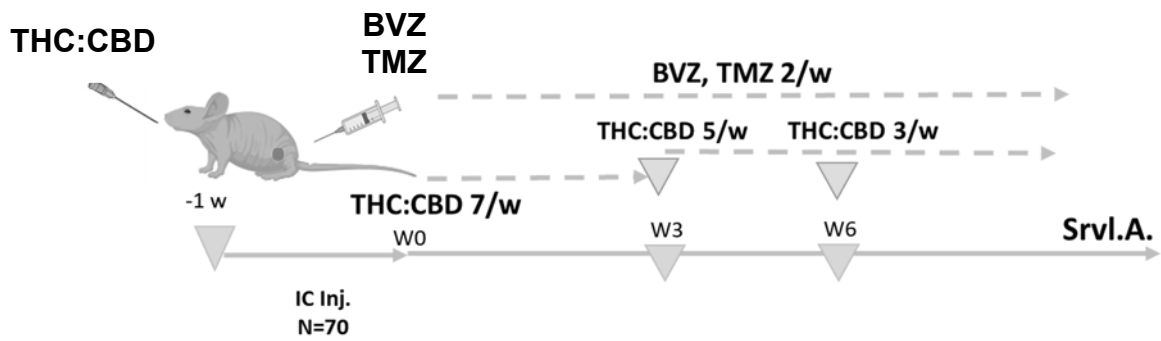


Fig. 4B

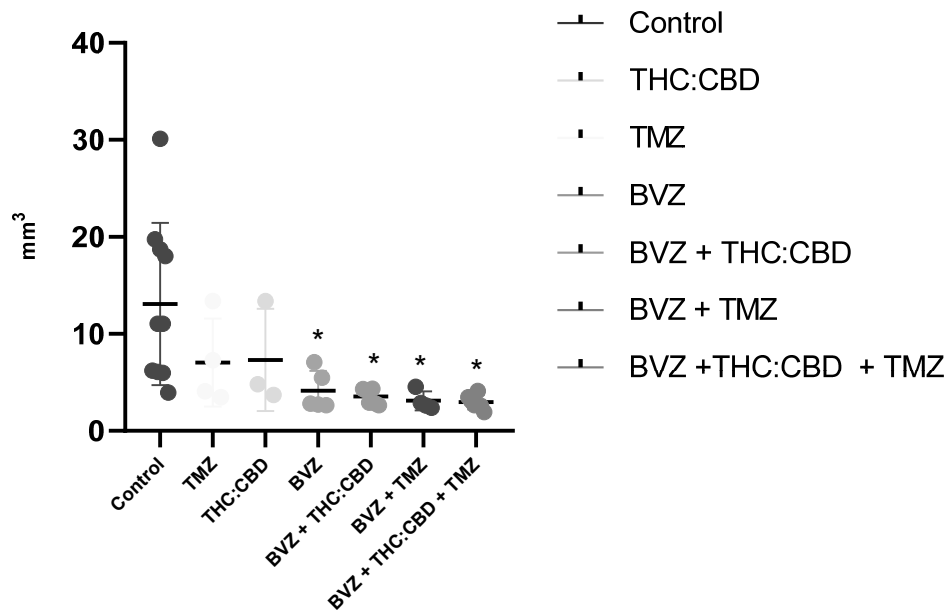
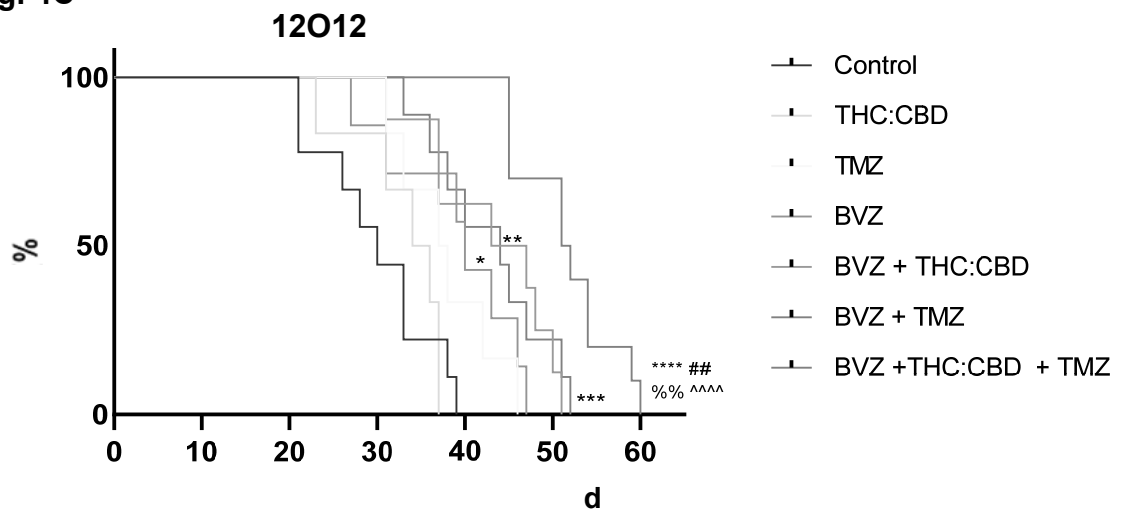


Fig. 4C





- ②① N.º solicitud: 202330291
②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.04.2023
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	OBAD N. et al. IMPROVING EFFICACY OF BEVACIZUMAB TREATMENT IN GLIOBLASTOMABY TARGETING HIF1 ALPHA. Neuro-Oncology, 11/2015, Vol. 17, N° suppl 5, Páginas v31, abstract ATPS-59, <DOI: 10.1093/neuonc/nov204.59>, todo el documento	1-10
Y	BLÁZQUEZ C. et al. Cannabinoids Inhibit the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Gliomas. CANCER RESEARCH, 15/08/2004, Vol. 64, Páginas 56175623, todo el documento	1-10
A	SCHLOSS J. et al. A Phase 2 Randomised Clinical Trial Assessing the Tolerability of Two Different Ratios of Medicinal Cannabis in Patients With High Grade Gliomas. Front. Oncol, 21/05/2021, Vol. 11, N° 649555, todo el documento	1-10
A	ANJUM K. et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, Vol. 92, Páginas 681-689. Página 681 páginas 684 - 686;	1-10
A	Glioblastoma. Wikipedia, 11/04/2023 [en línea][recuperado el 10/11/2023]. Recuperado de Internet <URL: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Glioblastoma&oldid=1149240319 >, todo el documento	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 1-10, 29-40

Fecha de realización del informe
17.11.2023

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/3



- ②① N.º solicitud: 202330291
②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.04.2023
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SCHRITZ A. et al. Systematic review and network meta-analysis of the efficacy of existing treatments for patients with recurrent glioblastoma. Neuro-Oncology Advances, 09/04/2021, Vol. 3, Nº 1, Páginas 1-12, todo el documento	29-40
Y	LIU Y. et al. Health-related quality of life in patients with recurrent glioma treated with bevacizumab plus daily temozolomide as the salvage therapy. Journal of Clinical Oncology, 30/05/2017, Vol. 35, Nº 15 suppl, todo el documento	29-40
Y	LÓPEZ-VALERO I. et al. Optimization of a preclinical therapy of cannabinoids in combination with temozolomide against glioma. Biochemical Pharmacology, 18/08/2018, Vol. 157, Páginas 275-284, todo el documento	29-40
A	SCHLOSS J. et al. A Phase 2 Randomised Clinical Trial Assessing the Tolerability of Two Different Ratios of Medicinal Cannabis in Patients With High Grade Gliomas. Front. Oncol, 21/05/2021, Vol. 11, Nº 649555, todo el documento	29-40

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 1-10, 29-40

Fecha de realización del informe
17.11.2023

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K39/395 (2006.01)

A61K31/53 (2006.01)

A61K31/352 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS