

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 025 157**

51 Int. Cl.:

A61K 31/164 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2022** **E 22194900 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024** **EP 4154875**

54 Título: **N-palmitoiletanolamida y ácido docosahexanoico para su uso en el tratamiento del trastorno del espectro autista y otros síndromes depresivos**

30 Prioridad:

23.09.2021 IT 202100024464

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2025

73 Titular/es:

EPITECH GROUP S.P.A. (100.00%)
Via Egadi 7
20144 Milano (MI), IT

72 Inventor/es:

DELLA VALLE, FRANCESCO;
DELLA VALLE, MARIA FEDERICA;
GOMIERO, CHIARA;
MARCOLONGO, GABRIELE;
CALIGNANO, ANTONIO y
CRISTIANO, CLAUDIA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 3 025 157 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

N-palmitoiletanolamida y ácido docosahexanoico para su uso en el tratamiento del trastorno del espectro autista y otros síndromes depresivos

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere al uso de N-palmitoiletanolamida (PEA) en combinación con ácido docosahexanoico (DHA) en el tratamiento del trastorno del espectro autista y otros síndromes depresivos.

Antecedentes de la técnica

El trastorno del espectro autista (ASD) es un trastorno del desarrollo neurológico de etiología multifactorial que se manifiesta a través del deterioro de la interacción social, la comunicación verbal y no verbal, las actividades y el interés (definición de la *American Psychiatric Association*). La sintomatología comienza en el plazo de los primeros tres años de vida después de un acontecimiento específico y el diagnóstico temprano es muy importante para poder intervenir adecuadamente en las diversas áreas comprometidas.

Las estereotipias son una de las principales características de diagnóstico del ASD y pueden comprender comportamientos autoestimulantes y autolesivos, excitación, estimulación, estrés, ansiedad, aburrimiento, fatiga y aislamiento social.

Aunque se desconoce la causa, la aparición de ASD también se debe a un desequilibrio entre las sinapsis inhibitorias y excitatorias, así como a una neuroinflamación responsable de la activación y proliferación patológica de células no neuronales que, al liberar citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α) y quimiocinas proinflamatorias (MCP-1 y RANTES) en el cerebro y el líquido cefalorraquídeo de los pacientes autistas, exacerbaban el proceso neuroinflamatorio.

Se sabe además que una clase de hormonas endógenas, conocidas como neuroesteroides, están implicadas en el ASD: la más importante es la alopregnanolona (ALLO), un potente metabolito de la progesterona y moduladora de los receptores de GABA $_A$ sintetizada por las enzimas 5 α -reductasa de tipo 1 y la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. La ALLO posee propiedades antidepresivas, ansiolíticas, antiestrés, sedantes, antiagresivos y analgésicas y previene la formación y liberación de citoquinas proinflamatorias, tales como NF κ B, HMGB1, MCP-1 y TNF- α implicadas en múltiples estados neuroinflamatorios.

La reducción en los niveles de ALLO en plasma y cerebro encontrada en pacientes con ASD está fuertemente correlacionada con la gravedad de la sintomatología autista.

Los fármacos autorizados y administrados a pacientes con ASD son *risperidona* y *metilfenidato*, que, aunque son útiles para tratar síntomas autistas, no actúan sobre la modulación de la neuroinflamación ni sobre el aumento de los niveles endógenos de ALLO.

También se ha encontrado una reducción drástica en los niveles endógenos de ALLO en estados psiquiátricos tales como trastorno depresivo mayor (MDD), trastorno de estrés postraumático (PTSD) y especialmente en la depresión posparto.

Sólo en 2019, se comercializó ALLO, conocida como brexanolona, en los Estados Unidos con el nombre de Zulresso[™] como una infusión intravenosa para su administración durante 2,5 días. Zulresso[™] es el primer fármaco aprobado por la FDA (Federal Drug Administration) para su uso exclusivo en el tratamiento de la depresión posparto. En 2016, el EMA incluyó brexanolona en un programa de estudio antes de su comercialización en Europa.

Aunque se declara un fármaco eficaz y seguro, Zulresso[™] debe administrarse únicamente en centros sanitarios certificados debido al riesgo de sedación excesiva, pérdida repentina de conciencia o mareo durante las 60 horas de administración.

Hasta la fecha, no existen estudios clínicos en los que se administre ALLO como terapia para pacientes autistas: por tanto, es de considerable importancia identificar un tratamiento anti-neuroinflamatorio que sea fácil de administrar por vía oral, seguro y libre de efectos secundarios significativos a largo plazo y capaz de normalizar también los niveles endógenos de ALLO.

Un mecanismo natural para modular la neuroinflamación es la molécula endógena palmitoiletanolamida (PEA). En entornos preclínicos y clínicos, la administración de PEA, especialmente si está en forma ultramicronizada (PEA-um), puede determinar la actividad de normalización neuroinflamatoria; en particular, se ha demostrado que PEA-um puede submodular significativamente el estado neuroinflamatorio general de los ratones con un fenotipo similar al autismo, reduciendo la expresión de las citoquinas proinflamatorias del hipocampo y del suero IL-6, IL-1 β y TNF-

α y modulando el estado conductual alterado. Clínicamente, el tratamiento de 3 meses de niños autistas con PEA-um 600 mg/día mejora la agresividad, las habilidades cognitivas y conductuales, y la comunicación sin efectos adversos.

5 El DHA (C22:6 n-3) es uno de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA) más abundantes en el organismo. Es un componente fundamental de todas las membranas celulares, incluyendo las células del sistema nervioso. La disminución del mismo puede desencadenar un mal funcionamiento del tejido nervioso, afectando negativamente a los procesos de aprendizaje y conductuales, así como agravando la enfermedad autista.

10 Se han realizado ensayos clínicos en pacientes con ASD mediante la administración de PUFA, normalmente una mezcla de EPA y DHA, a dosis elevadas (generalmente mayores de 1 g por día), pero los resultados han sido insuficientes e insignificantes.

15 Peritore AF *et al.* (Nutrients, 2019, 11(9): 2175) se refiere a PEA, opcionalmente en forma micronizada, para su uso en el tratamiento de patologías inflamatorias agudas y crónicas. Russo R *et al.* (Current Medicinal Chemistry, 2018, 25(32): 3930-52) enseña que se ha encontrado que el eje intestino-cerebro desempeña un papel en trastornos relacionados con el estrés, trastornos del desarrollo neurológico y enfermedades neurodegenerativas. La PEA es un tipo de lípido bioactivo que reduce los marcadores de inflamación en un modelo murino de enfermedad inflamatoria intestinal. Se menciona que el DHA está reducido en el plasma de niños con trastornos del espectro autista (ASD) y que la suplementación con PUFA mejora los síntomas del ASD. El documento US 2011/237669 menciona que se usa DHA en el tratamiento del autismo. Zou M *et al.* (International Journal of Developmental Neuroscience, 2019, 76:95-102) da a conocer que se usa suplementación oral de PEA en el tratamiento del ASD. También menciona que el DHA y otros PUFA están disminuidos en el ASD y que la complementación con PUFA n-3 mejora el ASD.

25 Por tanto, existe la necesidad de proporcionar una terapia para el ASD que sea eficaz, no invasiva y segura y que, si es posible, no requiera la administración de altas dosis de sustancias activas. De hecho, teniendo en cuenta que tal terapia estaría dedicada principalmente a una población infantil, la administración repetida y/o en formas de dosificación grandes (por ejemplo, comprimidos grandes para la administración oral de dosis altas de principios activos) sería difícil de aceptar por el paciente.

Sumario de la invención

35 La presente invención se deriva del sorprendente descubrimiento de que la palmitoiletanolamida (PEA), preferiblemente cuando se usa en forma ultramicronizada, cuando se administra en combinación con ácido docosahexanoico (DHA), muestra un efecto relevante sinérgicamente en la mejora de los parámetros conductuales de sujetos autistas y en la elevación de los niveles endógenos de alopregnanolona (ALLO).

40 Por tanto, la presente invención se refiere a palmitoiletanolamida para su uso en el tratamiento de trastornos del espectro autista (ASD), donde la palmitoiletanolamida se administra en asociación con ácido docosahexanoico, donde dicha administración es por separado, combinada o simultánea.

La invención se refiere además a una composición que contiene palmitoiletanolamida y ácido docosahexanoico, en particular, cuando puede usarse en el tratamiento de trastornos del espectro autista (ASD).

45 La invención también se refiere a palmitoiletanolamida para su uso en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por niveles endógenos de alopregnanolona disminuidos, donde la palmitoiletanolamida se administra en combinación con ácido docosahexanoico, donde dicha administración es por separado, combinada o simultánea.

50 Estos y otros objetos, tal como se explican resumidamente en las reivindicaciones adjuntas, se describirán en la siguiente descripción. El texto de las reivindicaciones debe considerarse incluido en la descripción con el fin de evaluar la suficiencia de la descripción.

55 Características y ventajas adicionales de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de realizaciones preferidas, facilitadas a modo de ejemplos no limitativos.

Breve descripción de los dibujos

60 La figura 1 muestra un gráfico de la distribución de tamaño de partícula de palmitoiletanolamida en una forma ultramicronizada (PEA-um);

la figura 2 muestra el efecto de la sinergia de PEA-um asociada con DHA sobre el comportamiento repetitivo/obsesivo de los ratones BTBR. (A) Número de canicas enterradas en 15 min; (B) tiempo que pasan los ratones C57 y BTBR con autolimpieza. Todos los valores se notificaron como la media $\pm$ EEM de 8 animales por cada grupo. ****p < 0,0001 frente a CTR de C57; #p < 0,05 frente a CTR de BTBR; ##p < 0,01 frente a CTR de BTBR;

la figura 3 muestra el efecto de todos los tratamientos sobre la sociabilidad de los ratones. (A) Tiempo que pasan los ratones C57 en la sala vacía o en la sala ocupada por un ratón; (B) misma evaluación para los ratones BTBR: solo el tratamiento con PEA+DHA puede mejorar la sociabilidad de los ratones. Todos los valores se notificaron como la media $\pm$ EEM de 8 animales por cada grupo. *p <0,05 frente a CTR de C57; **p <0,01 frente a CTR de C57; ***p <0,001 frente a CTR de C57; ****p <0,0001 frente a CTR de C57;

la figura 4 muestra el efecto neuroesteroideogénico de la sinergia entre PEA-um y DHA. La PEA-um asociada con DHA aumenta los niveles plasmáticos de ALLO de los ratones BTBR. PEA+DHA no aumento los niveles plasmáticos de ALLO en ratones C57. Todos los valores se notificaron como la media $\pm$ EEM de 8 animales por cada grupo. **p <0,01 frente a CTR de C57; (#p <0,05 frente a CTR de BTBR.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en un primer aspecto a palmitoiletanolamida (PEA) para su uso en el tratamiento de trastornos del espectro autista (ASD), donde la palmitoiletanolamida se administra en asociación con ácido docosahexanoico (DHA), donde dicha administración es por separado, combinada o simultánea.

El término "en asociación" significa tanto una terapia de combinación como una terapia en la que PEA y DHA están contenidos en una forma de dosificación única.

Administración "por separado" significa una administración de PEA y DHA en formas de dosificación por separado, administradas en diferentes momentos que varían desde 1 minuto hasta varias horas, por ejemplo, con una separación de 8, 12 o 14 horas.

Administración "combinada" significa una administración de PEA y DHA contenidos en una forma de dosificación única, es decir, una composición o formulación farmacéutica o veterinaria, suplemento, composición dietética o alimento para fines médicos especiales.

Administración "simultánea" significa una administración de PEA y DHA en formas de dosificación por separado, pero administradas simultáneamente, es decir, dentro de un tiempo de separación entre la administración de PEA y DHA, o viceversa, que no supere 1 minuto.

La palmitoiletanolamida puede administrarse en cualquier forma, por ejemplo, en una forma no micronizada, en una forma micronizada o en una forma ultramicronizada.

El término "palmitoiletanolamida (o PEA) en una forma no micronizada" significa PEA que tiene una distribución de tamaño de partícula, definida como un porcentaje en volumen y medida con el método de dispersión de luz láser, representada por una curva de distribución que tiene la moda por encima de 10 micrómetros, preferiblemente por encima de 20 micrómetros.

El término "palmitoiletanolamida (o PEA) en una forma micronizada" significa PEA que tiene una distribución de tamaño de partícula, definida como un porcentaje en volumen y medida con el método de dispersión de luz láser, representada por una curva de distribución que tiene la moda entre 6 micrómetros y 10 micrómetros.

El término "palmitoiletanolamida (o PEA) en una forma ultramicronizada" significa PEA que tiene una distribución de tamaño de partícula, definida como un porcentaje en volumen y medida con el método de dispersión de luz láser, representada por una curva de distribución que tiene la moda por debajo de 6 micrómetros y por encima de 0,5 micrómetros.

Preferiblemente, la PEA está en una forma ultramicronizada.

En una realización, la PEA en una forma ultramicronizada tiene una distribución de tamaño de partícula tal como se definió anteriormente, medida con un instrumento Mastersizer 3000 de Malvern con algoritmo de cálculo de Fraunhofer, donde al menos el 95 % en volumen, más preferiblemente al menos el 99 % en volumen, de las partículas tiene un tamaño de partícula de menos de 6 micrómetros.

En una realización particularmente preferida, la PEA en una forma ultramicronizada tiene una distribución de tamaño de partícula tal como se definió anteriormente, medida con un instrumento Mastersizer 3000 de Malvern con algoritmo de cálculo de Fraunhofer, que tiene una moda de entre 2 y 4 micrómetros y que tiene un 100 % en volumen de partículas más pequeñas de 10 micrómetros y al menos el 60 % en volumen de partículas más pequeñas de 3 micrómetros.

La micronización puede llevarse a cabo en un sistema de chorro de fluido (por ejemplo, sistema modelo Jetmill®) que funciona con tecnología en espiral con un chorro de aire comprimido o nitrógeno capaz de aprovechar la energía cinética (en lugar de la energía mecánica) para triturar las partículas. Tales aparatos son convencionales

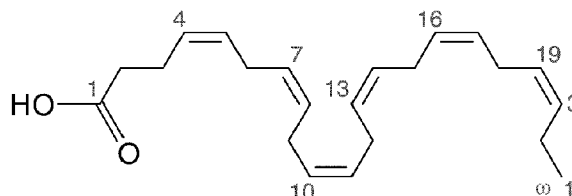
y, por tanto, no se describirán adicionalmente, excepto en relación con las siguientes características:

Diámetro interno de la cámara de micronización aproximadamente 300 mm;

5 Presión del chorro de fluido 10-12 bar;

Suministro de producto 9-12 kg/h.

10 El ácido docosahexanoico (DHA) pertenece a los denominados PUFA o ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y tiene la siguiente fórmula estructural:



15 El ácido docosahexanoico (DHA), también denominado ácido cervónico, es un ácido graso omega-3 o PUFA n-3. Los peces oceánicos de agua fría son ricos en DHA. La mayor parte del DHA presente en los peces y organismos complejos que viven en las aguas oceánicas frías procede de algas fotosintéticas. El DHA también se produce comercialmente mediante las microalgas *Cryptocodinium cohnii* que es un microorganismo del género *Schizochytrium*. El DHA producido a partir de microalgas es de origen vegetal.

20 La presente invención se refiere además a una composición que comprende palmitoiletanolamida y ácido docosahexanoico. Preferiblemente, la composición de la invención consiste en una mezcla de palmitoiletanolamida y ácido docosahexanoico y excipientes farmacéuticamente aceptables. Más preferiblemente, la palmitoiletanolamida está en una forma ultramicronizada (PEA-um).

25 Tanto si se administran por separado como combinadas en una única formulación, la PEA y el DHA se administran en una razón en peso de entre 1:7 y 7:1.

Más en particular, cuando la PEA está en una forma ultramicronizada, la razón en peso de PEA/DHA será preferiblemente de entre 1:7 y 1:1, más preferiblemente entre 1:5 y 1:2.

30 Cuando la PEA está en una forma micronizada o no micronizada, la razón en peso de PEA/DHA será preferiblemente de entre 1:1 y 7:1, más preferiblemente entre 2:1 y 5:1.

35 Para los fines de la invención, la PEA sola, el DHA solo o la composición que contiene PEA y DHA pueden incluirse en formulaciones farmacéuticas o veterinarias y pueden formularse en formas de dosificación para administración oral, bucal, parenteral, rectal o transdérmica.

40 Para la administración oral, los compuestos de la invención pueden encontrarse, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, duros o blandos, preparados de forma convencional con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes inhibidores (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden presentarse, por ejemplo, en forma de disoluciones, jarabes o suspensiones o pueden ser productos liofilizados o granulados para reconstituirse, antes de su uso, con agua u otros vehículos adecuados. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse a través de métodos convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil- o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). La preparación también puede contener convenientemente aromatizantes, colorantes y edulcorantes.

55 Las preparaciones para administración oral pueden formularse de manera apropiada para permitir la liberación controlada del constituyente activo.

Para administración bucal, los compuestos de la invención pueden presentarse en forma de comprimidos o píldoras formulados de manera convencional, que son adecuados para una absorción a nivel de la mucosa bucal. Las formulaciones bucales típicas son comprimidos para administración sublingual.

Los compuestos de la invención pueden formularse para administración parenteral mediante inyección. Las formulaciones en inyección pueden presentarse como una dosis única, por ejemplo, en viales, con un conservante añadido. Las composiciones pueden presentarse en tal forma como suspensiones, disoluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de la formulación tales como de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo o la mezcla de principios activo puede encontrarse en forma de un polvo para reconstituirse, antes de su uso, con un vehículo adecuado, por ejemplo, con agua estéril.

Los compuestos de la invención también pueden formularse según formulaciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, que contienen por ejemplo los componentes básicos de los supositorios comunes, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos de la invención también pueden formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea, transcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, la composición puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos apropiados (por ejemplo, en forma de una emulsión en un aceite adecuado) o resinas de intercambio iónico o como derivados mínimamente solubles.

Según la presente invención, la dosis diaria de PEA propuesta para administración a un hombre (con un peso corporal de aproximadamente 70 kg) oscila entre 10 mg y 1500 mg o, si se usa PEA en una forma ultramicronizada, entre 10 mg y 500 mg de PEA. Tal dosis diaria puede dividirse en unidades de dosis para una administración, por ejemplo, desde 1 hasta 4 veces al día. La dosis dependerá de la forma en que se administre la PEA, es decir, si se administra PEA no micronizada, PEA micronizada o PEA ultramicronizada. La dosis también dependerá de la vía elegida para la administración. Debe considerarse que puede ser necesario variar continuamente la dosificación dependiendo de la edad y el peso del paciente y también de la gravedad del estado clínico que va a tratarse. La dosis exacta y la vía de administración quedarán en última instancia a criterio del médico o veterinario que trate.

La invención se refiere además a composiciones dietéticas, suplementos alimenticios y alimentos para fines médicos especiales (FSMP) que comprende PEA, preferiblemente PEA ultramicronizada, y DHA para su uso en el tratamiento de ASD.

El término "alimento para fines médicos especiales" significa productos autorizados según el reglamento (UE) 2016/128. Tal término se refiere a un producto que debe administrarse bajo supervisión médica, asimilando así tal FSMP a un fármaco.

Las formulaciones según la invención pueden prepararse según métodos convencionales, tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., N.Y., EE. UU., 17ª edición, 1985 o en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, editado por Allen, Loyd V., Jr, 22ª edición, 2012.

Sección experimental

Procedimiento de micronización

La PEA se micronizó tal como se describió anteriormente.

La ultramicronización se llevó a cabo en un sistema de chorro de fluido (en particular, el sistema modelo Jetmill®) que funciona con "tecnología en espiral" de chorro de aire comprimido.

Condiciones óptimas de micronización:

diámetro interno de la cámara de micronización 300 mm;

presión del chorro de fluido 8 bar;

suministro de producto 9-12 kg/h.

Determinación de la distribución de tamaño de partícula

La determinación de la distribución de tamaño de partícula se llevó a cabo en una muestra húmeda, después de una sonicación de 1 minuto.

Se usó un instrumento Mastersizer 3000 de Malvern que funciona con la técnica LALLS (dispersión de luz láser de ángulo bajo) y un algoritmo de cálculo de Fraunhofer.

El gráfico de la distribución de tamaño de partícula se muestra en la figura 1.

Experimentación biológica

En el ensayo *in vivo* se usaron ratones C57BL/6J (C57) macho sanos y ratones BTBR T+tf/J (BTBR) de 90 días (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EE. UU.) alimentados a voluntad y alojados en jaulas con un ciclo de sueño/vigilia controlado. Antes del inicio de la experimentación, los animales se sometieron a un período de aclimatación de 1 semana considerando todos los procedimientos y protocolos experimentales, de conformidad con los principios del cuidado y bienestar de los animales de laboratorio aprobados por el Ministerio de Salud italiano (Decreto Legislativo Italiano 2014/26) y las directivas europeas (Directiva UE 2010/63)

Los ratones BTBR tienen un fenotipo similar al autismo capaz de reproducir los síntomas principales del ASD con la aparición de déficits conductuales en un período comparable a la infancia temprana. En virtud de los numerosos polimorfismos debidos a las mutaciones de nucleótidos individuales implicados en el desarrollo del sistema nervioso y las sinapsis, los ratones BTBR están completamente libres del cuerpo calloso y están sometidos a una reducción severa de la comisura del hipocampo (Wahlsten D. *et al.*, Survey of 21 inbred mouse strains in two laboratories reveals that BTBR T+tf/J has severely reduced hippocampal commissure and absent corpus callosum, Brain Res. 2003, 971: 47-54). Esta raza tiene varios síntomas de autismo, incluyendo interacciones sociales reducidas, expresiones alteradas de juego, comportamiento exploratorio reducido, vocalizaciones inusuales y ansiedad (McFarlane HG *et al.*, Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice, Genes Brain Behav. 2008, 7: 152-63; Scattoni ML *et al.*, Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism, PLoS One 2008, 3: e3067); además, tiene niveles de ALLO particularmente reducidos (Ebihara K. *et al.*, Decrease in endogenous brain allopregnanolone induces autism spectrum disorder (ASD)-like behavior in mice: A novel animal model of ASD, Behav Brain Res. 2017, 334: 6-15; Chew L. *et al.*, Association of serum allopregnanolone with restricted and repetitive behaviors in adult males with autism Psychoneuroendocrinology, 2021, 123: 105039).

Métodos experimentales y resultados

Se aleatorizaron animales C57 y animales BTBR sanos en 8 grupos de 8 ratones cada uno y se trataron v.o., a partir del cuarto mes de vida, con carboximetilcelulosa (CMC) al 1,5 % (vehículo usado para suspender moléculas), con PEA ultramicronizada (PEA-um) 1 mg/kg sola, con DHA 5 mg/kg solo (DHA 30 mg/kg con título del 17 %) y con PEA-um 1 mg/kg asociada con DHA 5 mg/kg (DHA 30 mg/kg con título del 17 %), diariamente durante 10 días:

- Grupo 1: ratones C57 tratados con CMC al 1,5 % como control (CTR);
- Grupo 2: ratones C57 tratados con PEA-um 1 mg/kg suspendida en CMC al 1,5 % (PEA);
- Grupo 3: ratones C57 tratados con DHA 5 mg/kg (DHA 30 mg/kg con título del 17 %) suspendido en CMC al 1,5 % (DHA);
- Grupo 4: ratones C57 tratados con PEA-um 1 mg/kg y DHA 5 mg/kg (DHA 30 mg/kg con título del 17 %) suspendidos en CMC al 1,5 % (composición de PEA+DHA);
- Grupo 5: ratones BTBR tratados con CMC al 1,5 % (CTR);
- Grupo 6: ratones BTBR tratados con PEA-um 1 mg/kg suspendida en CMC al 1,5 % (PEA);
- Grupo 7: ratones BTBR tratados con DHA 5 mg/kg (DHA 30 mg/kg con título del 17 %) suspendido en CMC al 1,5 % (DHA);
- Grupo 8: ratones BTBR tratados con PEA-um 1 mg/kg y DHA 5 mg/kg (DHA 30 mg/kg con título del 17 %) suspendidos en CMC al 1,5 % (composición de PEA+DHA).

Los animales se sacrificaron 10 días después de comenzar la administración de los tratamientos. Se recogió plasma para la dosificación con el método de HPLC (Agilent) del neuroesteroide ALLO. Antes de sacrificarlos, los animales se sometieron a pruebas conductuales para estudiar el fenotipo repetitivo/obsesivo (prueba de enterramiento de canicas y prueba de autoaseo) y la sociabilidad.

Todas las pruebas conductuales se realizaron por los mismos ratones con un intervalo de tiempo suficiente entre una prueba y otra y comenzando desde la menos estresante (Paylor R. *et al.*, The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval, Physiol. Behav. 2006, 87: 95-102).

Análisis estadístico

Todos los valores notificados en los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (EEM) de N observaciones (N = número de animales). Las diferencias estadísticas en la dosificación de ALLO y la puntuación

conductual se analizaron con ANOVA unidireccional, seguido de comparaciones múltiples de Sidak. Un valor $P < 0,05$ se considera significativo.

Detección de comportamiento obsesivo y repetitivo

5

En la prueba de enterramiento de canicas, se colocaron 20 canicas en una rejilla dentro de una jaula de plexiglás llena con 5 cm de arena limpia. Cada ratón se colocó en la jaula y, después de 15 minutos de sesión, se sacó suavemente para contar el número de canicas enterradas. Los ratones BTBR tratados con solo vehículo (CTR), solo PEA-um 1 mg/kg (PEA) y solo DHA 30 mg/kg (DHA), enterraron obsesivamente las canicas. Por el contrario,

10

el tratamiento con PEA-um 1 mg/kg administrado en combinación con DHA 30 mg/kg redujo significativamente la actitud obsesiva de los ratones en ocultar las canicas. Como prueba de lo anterior, todos los animales C57 (animales sanos) sometidos a los tratamientos no mostraron cambios significativos en el número de canicas enterradas (figura 2A).

15

En la prueba de autoaseo, los ratones se colocaron en una jaula de plexiglás vacía (30 x 40 cm) y se les dejó explorar libremente la arena. Después de 10 minutos de aclimatación, se monitorizó la actividad de autoaseo durante 20 minutos. Se tuvo en cuenta la actitud repetitiva en el lavado de la cabeza, el cuerpo, la zona genital y la cola y en lamerse las patas delanteras y traseras.

20

Sólo el tratamiento con PEA+DHA administrados en combinación puede reducir los segundos dedicados al autoaseo por los ratones BTBR. Los animales con ASD de los grupos CTR, PEA y DHA no demostraron ninguna reducción en el tiempo (s) dedicado al autoaseo (figura 2B). De nuevo, en los ratones C57 (animales sanos), no se observan diferencias entre los controles y los animales tratados.

Sociabilidad de los animales

25

Se examinó la interacción social usando un instrumento de tres cámaras. Esta prueba consiste en 3 fases: en la primera fase el animal se aclimata durante 5 minutos en la arena vacía (centro). En la siguiente sesión de 10 minutos, el animal se expone a una cámara vacía en el lado izquierdo del instrumento o a un ratón desconocido

30

en la cámara derecha.

En la última fase de 10 minutos, se evaluó la preferencia del ratón en permanecer en la cámara vacía o en presencia del ratón (Crawley JN, Designing mouse behaviour tasks referent to autististical-like behaviors, Ment. Retardate Dev. Disabil. 2004, 10: 248-258).). El tiempo que pasó en cada cámara se detectó mediante una cámara acoplada a un software de seguimiento de vídeo.

35

Los ratones C57 sanos muestran una mayor sociabilidad con otro ratón también después de tratamientos con sólo PEA-um o solo DHA a las concentraciones inactivas de 1 mg/kg y 30 mg/kg (figura 3A). Por el contrario, en los ratones BTBR cuya sociabilidad está reducida, sólo la sinergia entre PEA-um asociada al DHA mejora la sociabilidad de los animales autistas, lo que conduce a que los ratones pasen más tiempo en compañía de un compañero. En los animales BTBR tratados con vehículo, sólo PEA-um 1 mg/kg y sólo DHA 30 mg/kg no demostraron mejoras sociales, por lo que continuaron pasando su tiempo en el lado vacío del instrumento (figura 3B).

40

La sinergia entre PEA-um asociada con DHA aumenta los niveles endógenos del neuroesteroide ALLO en ratones con ASD

45

Los ratones BTBR tienen una reducción significativa en los niveles plasmáticos de ALLO; esta tendencia también se encuentra en animales BTBR tratados con PEA-um 1 mg/kg y DHA 30 mg/kg. Sólo el grupo de animales BTBR tratados con la combinación de PEA-um 1 mg/kg + DHA 30 mg/kg tiene un aumento significativo en los niveles plasmáticos del neuroesteroide ALLO. Todos los tratamientos realizados en ratones C57 sanos no indujeron ningún aumento de ALLO en plasma (figura 4).

50

A partir de la demostración anterior, el efecto sinérgico resultante de la asociación entre PEA y DHA permite usar dosificaciones menores de ambos principios activos que las usadas normalmente cuando tales principios activos se administran solos o, en el caso de DHA, con otros PUFA, tales como EPA.

55

La presente invención proporciona, por tanto, un agente para su uso en un método para tratar trastornos del espectro autista (ASD) que comprende o que consiste en administrar, a un sujeto que padece ASD, dicho agente que comprende PEA, preferiblemente PEA en una forma ultramicronizada, y DHA, donde dicha administración es por separado, combinada (es decir, en una forma de dosificación única) o simultánea y donde la PEA y el DHA se administran a una dosificación a la que, cuando se administran solos, la PEA y el DHA son inactivos.

60

Preferiblemente, las dosis de PEA-um y DHA administradas a un paciente niño o adolescente son de 500 mg/día o menos y de 700 mg/día, o más preferiblemente 300 mg/día o menos y 500 mg/día o menos, respectivamente.

65

Además, la presente invención proporciona un método para aumentar los niveles endógenos de alopregnanolona en un sujeto en el que dichos niveles endógenos están por debajo de los niveles normales (es decir, preferiblemente por debajo de 0,7 nmol/l), que comprende o que consiste en administrar a dicho sujeto PEA, preferiblemente en una forma ultramicronizada, y DHA, donde dicha administración es por separado, combinada (es decir, en una forma de dosificación única) o simultánea y donde la PEA y el DHA se administran a una dosificación a la que, cuando se administran solos, la PEA y el DHA son inactivos.

Por tanto, un método de este tipo permite el tratamiento no sólo de sujetos con ASD, sino también de sujetos con síndromes depresivos, en particular, depresión posparto.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos de formulación.

Ejemplos de formulación

PEA-um = Palmitoiletanolamida ultramicronizada

Ejemplo 1 – Cápsulas de gelatina blanda

Contenido de 12 cápsulas de apertura por torsión:

PEA-um	150,00 mg
DHA (título del 55 %)	435,00 mg
Aceite de cacahuete	40,00 mg
Lecitina de sola	20,00 mg
Alfa-tocoferol	10,00 mg
Monoestearato de glicerilo	10,00 mg
Composición de la cápsula:	
Gelatina bovina	237,00 mg
glicerol	130,00 mg
Agua	19,00 mg
Pigmentos	0,07 mg

Ejemplo 2 - Jarabe

Composición por 100 ml:

Sacarosa	25,0 g
Palmitoiletanolamida-m	g 12,0
DHA con título del 55 %	5,0 g
Celulosa microcristalina	1,35 g
Tocoferol natural (1000 UI/g)	1,0 g
Carboximetilcelulosa sódica	0,65 g
Monooleato de sorbitano	0,40 g
Polisorbato 80	0,10 g
Aromatizante natural	0,10 g
Sorbato de potasio	0,09 g
Ácido benzoico	0,07 g
Ácido cítrico	0,05 g
Agua	c.s.p. 100 ml

Ejemplo 3 – Gránulos dispersables

Contenido de la bolsita de dosis única:

Palmitoiletanolamida	250 mg
----------------------	--------

ES 3 025 157 T3

Polvo de DHA con título del 17 %	1400 mg
Maltodextrina	500 mg
Fructosa	300 mg
Dextrosa	200 mg
Acetato de tocoferol al 50 % (polvo sobre sílice)	200 mg
Ácido cítrico	50 mg
Pluronic F-68	50 mg
Aromatizante natural	50 mg
Estearato de magnesio	10 mg
Polisorbato 80	10 mg

REIVINDICACIONES

1. Palmitoiletanolamida para su uso en el tratamiento de trastornos del espectro autista (ASD), en la que la palmitoiletanolamida se administra en asociación con ácido docosahexanoico (DHA), en la que dicha administración es por separado, combinada o simultánea.
2. Palmitoiletanolamida para su uso según la reivindicación 1, en la que la palmitoiletanolamida está en una forma no micronizada, que tiene una distribución de tamaño de partícula, definida como porcentaje en volumen y medida mediante el método de dispersión de luz láser, representada por una curva de distribución que tiene la moda por encima de 10 micrómetros, preferiblemente por encima de 20 micrómetros.
3. Palmitoiletanolamida para su uso según la reivindicación 1, en la que la palmitoiletanolamida está en una forma micronizada, que tiene una distribución de tamaño de partícula, definida como porcentaje en volumen y medida mediante el método de dispersión de luz láser, representada por una curva de distribución que tiene la moda entre 6 micrómetros y 10 micrómetros.
4. Palmitoiletanolamida para su uso según la reivindicación 1, en la que la palmitoiletanolamida está en una forma ultramicronizada que tiene una distribución de tamaño de partícula, definida como porcentaje en volumen y medida mediante el método de dispersión de luz láser, representada por una curva de distribución que tiene la moda por debajo de 6 micrómetros y por encima de 0,5 micrómetros.
5. Palmitoiletanolamida para su uso según la reivindicación 4, que tiene una distribución de tamaño de partícula, definida como porcentaje en volumen y medida mediante el método de dispersión de luz láser, medida con un instrumento Mastersizer 3000 de Malvern con algoritmo de cálculo de Fraunhofer, en la que al menos el 95 % en volumen, preferiblemente al menos el 99 % en volumen, de las partículas tiene un tamaño de partícula menor de 6 micrómetros.
6. Palmitoiletanolamida para su uso según la reivindicación 4, en la que la palmitoiletanolamida tiene una distribución de tamaño de partícula, definida como porcentaje en volumen y medida mediante el método de dispersión de luz láser, medida con un instrumento Mastersizer 3000 de Malvern con algoritmo de cálculo de Fraunhofer, que tiene una moda de entre 2 y 4 micrómetros y que tiene un 100 % en volumen de partículas menores de 10 micrómetros y al menos el 60 % en volumen de partículas menores de 3 micrómetros.
7. Palmitoiletanolamida para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la PEA y el DHA se administran en una razón en peso de entre 1:7 y 7:1.
8. Palmitoiletanolamida para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la razón en peso de PEA/DHA es de entre 1:7 y 1:1, preferiblemente entre 1:5 y 1:2.
9. Palmitoiletanolamida para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la dosis diaria de PEA para la administración a un sujeto oscila entre 10 mg y 1500 mg o, si se usa PEA en una forma ultramicronizada, entre 10 mg y 500 mg de PEA, o las dosificaciones de PEA y DHA para un sujeto niño o adolescente son iguales a o menores de 500 mg/día y 700 mg/día o preferiblemente iguales a o menores de 300 mg/día y 500 mg/día, respectivamente.
10. Palmitoiletanolamida para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la palmitoiletanolamida y el DHA están contenidos en formulaciones farmacéuticas o veterinarias y se formulan en formas de dosificación para administración oral, bucal, parenteral, rectal o transdérmica.
11. Palmitoiletanolamida para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la palmitoiletanolamida y el DHA están contenidos en composiciones dietéticas, suplementos alimenticios, o alimentos para fines médicos especiales (FSMP).
12. Palmitoiletanolamida para su uso en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por niveles plasmáticos endógenos de alopregnanolona que son inferiores a 0,7 nmol/l, que comprende o que consiste en administrar PEA, preferiblemente en una forma ultramicronizada, y DHA a dichos sujetos, en la que dicha administración es por separado, combinada o simultánea.
13. Palmitoiletanolamida según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de síndromes depresivos, preferiblemente de depresión posparto.
14. Composición que comprende o que consiste en una mezcla de palmitoiletanolamida, preferiblemente palmitoiletanolamida ultramicronizada, y ácido docosahexanoico y excipientes farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de trastornos del espectro autista (ASD) o de síndromes

depresivos, preferiblemente de depresión posparto, en la que la palmitoiletanolamida y el ácido docosahexanoico están contenidos en una razón en peso de entre 1:7 y 7:1 o, cuando la palmitoiletanolamida está en una forma ultramicronizada, en una razón en peso de entre 1:7 y 1:1, preferiblemente entre 1:5 y 1:2.

5

15. Formulación farmacéutica o veterinaria, composiciones dietéticas, suplementos alimenticios o alimentos para fines médicos especiales, para su uso en el tratamiento de trastornos del espectro autista (ASD) o de síndromes depresivos, preferiblemente de depresión posparto, que comprende la composición según la reivindicación 14.

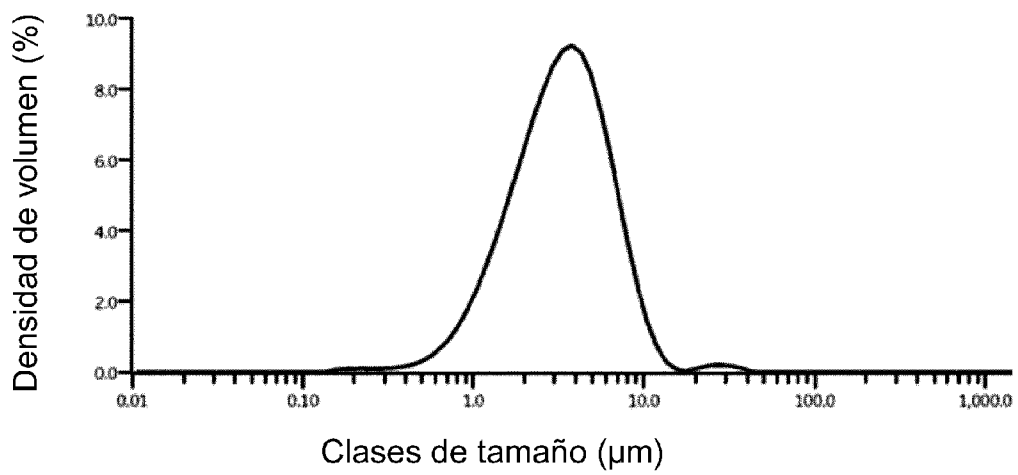


FIG. 1

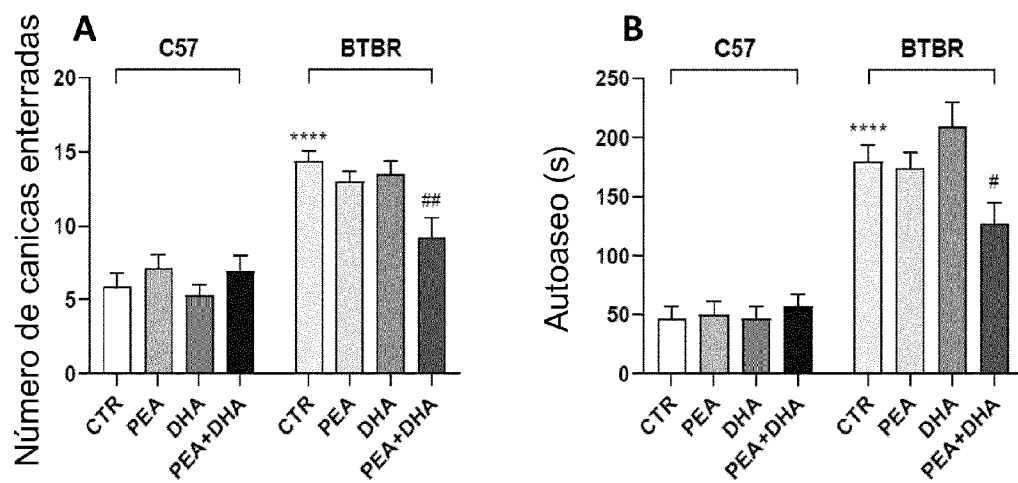


FIG. 2

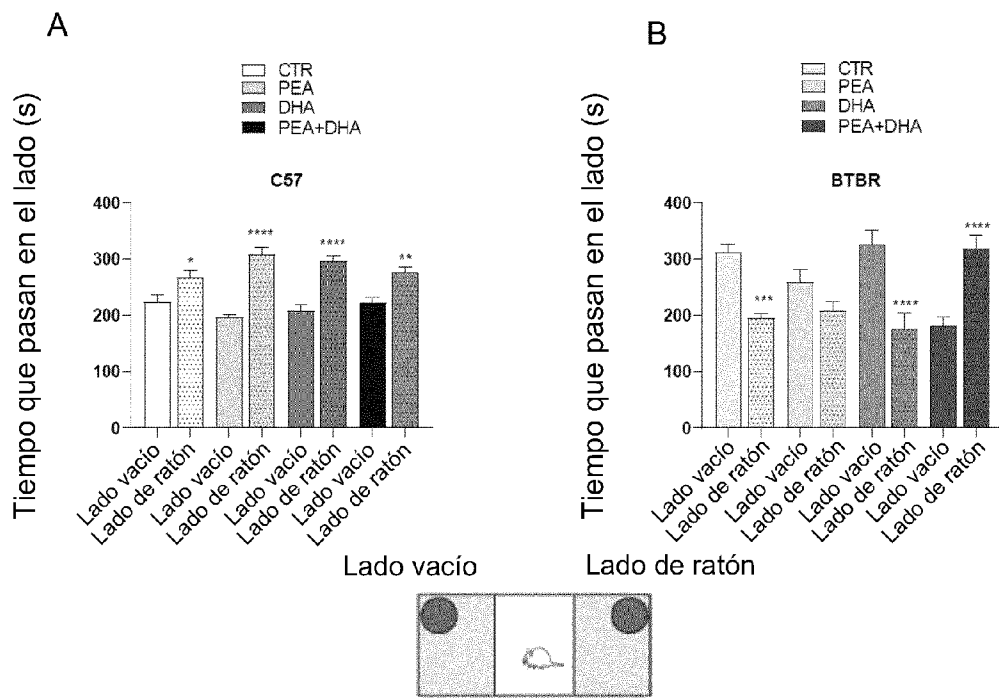


FIG. 3

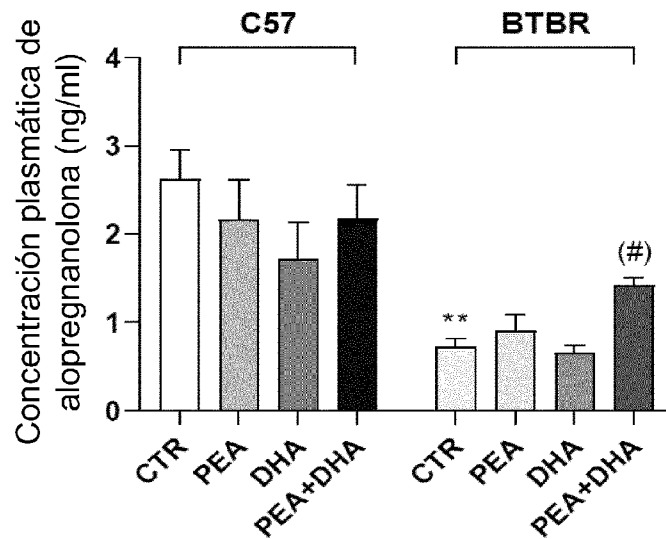


FIG. 4