



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 168**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61K 31/352** (2006.01)

**A61K 36/185** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07117778 .6**

96 Fecha de presentación : **02.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2044935**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2009**

54

Título: **Composición que comprende cannabinoides no psicotrópicos para el tratamiento de enfermedades antiinflamatorias.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.05.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.05.2011**

73

Titular/es:

**VIVACELL BIOTECHNOLOGY ESPAÑA, S.L.**  
**Avda. Conde de Vellellano, 13 - 1-1**  
**14004 Córdoba, ES**

72

Inventor/es: **Muñoz Blanco, Eduardo;**  
**Appendino, Giovanni;**  
**Fiebich, Bernd L. y**  
**Grassi, Giampaolo**

74

Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

ES 2 359 168 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición que comprende cannabinoides no psicotrópicos para el tratamiento de enfermedades antiinflamatorias.

- 5 La invención se refiere a una composición que comprende al menos, un cannabinoide no-psicotrópico y/o, al menos, un compuesto fenólico o flavonoide y/o Denbinobin y su uso para la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias gastrointestinales y para la prevención y tratamiento de cánceres gastrointestinales. También se refiere a un fitoextracto obtenido de la planta *Cannabis sativa*, más concretamente, de la variedad seleccionada CARMA.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las propiedades terapéuticas de la planta del cáñamo, *Cannabis sativa*, se conocen desde la antigüedad, pero el uso recreativo de sus efectos eufóricos y otros efectos psicoactivos debidos al metabolito delta-9-tetrahidrocannabinoide (THC) ha restringido durante largo tiempo su posible aplicación farmacéutica. El THC es un potente agonista de los receptores CB<sub>1</sub> (receptor cannabinoide tipo I) que está altamente expresado en células neuronales y la activación de este receptor es responsable de los efectos psicotrópicos de la planta. THC también ha sido investigado frente a varios tipos de cáncer (Guzmán M. Cannabinoids: potential anticancer agents. Nat Rev Cancer. 2003 Oct; 3(10): 745-55; Blázquez C, Casanova ML, Planas A, Del Pulgar TG, Villanueva C, Fernández-Acenero MJ, Aragonés J, Huffman JW, Jorcano JL, Guzmán M. Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoides. FASEB J. 2003 Mar; 17(3): 529-31) y existe una creciente evidencia de que el THC podría ejercer efectos anti-tumorales a través de dos vías, dependiente e independiente de CB<sub>1</sub> (Kogan NM. Cannabinoids and cancer. Mini Rev Med Chem. 2005 Oct; 5(10): 941-52) indicando que otros análogos del THC (sintéticos o naturales) sin actividad psicotrópica podrían presentar actividad antitumoral (Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Sep; 318(3): 1375-87). *C. sativa* contiene al menos 400 componentes químicos, de los cuales más de 60 se ha identificado que pertenecen al grupo cannabinoides (Stem E, Lambert DM. Medicinal chemistry endeavors around the phytocannabinoids. Chem Biodivers. 2007 Aug;4(8):1707-28).

Por otro lado, *Cannabis sativa* se ha usado históricamente para el tratamiento de la diarrea y otros desórdenes gastrointestinales. Una explicación para dicho histórico uso histórico es el hecho de que el sistema endocannabinoide se distribuye ampliamente en el sistema digestivo (Kulkarni-Narla A, Brown DR. Localization of CB1-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system. Cell Tissue Res. 2000 Oct; 302(1):73-80). Además, estudios farmacológicos recientes han demostrado que el THC inhibe la movilidad gastrointestinal mediante la activación de los receptores CB<sub>1</sub> en las neuronas de la submucosa intestinal (Mathison R, Ho W, Pittman QJ, Davison JS, Sharkey KA. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. Br J Pharmacol. 2004 Aug;142(8):1247-54). Otros experimentos han mostrado que el THC reduce la inflamación intestinal en ratones a los que se había inducido enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) (Massa F, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Monory K, Cravatt BF, Ferri GL, Sibaev A, Storr M, Lutz B. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. J Clin Invest. 2004 Apr;113(8):1202-9). No obstante, es probable que muchas de las actividades antiinflamatorias atribuidas a *Cannabis sativa* sean mediadas por otros compuestos distintos del THC (Klein TW, Newton CA. Therapeutic potential of cannabinoid-based drugs. Adv Exp Med Biol. 2007;601:395-413). A pesar de todo ello, las actividades biológicas de un fitoextracto derivado del Cannabis que contiene cannabinoides no-psicotrópicos tales como el Cannabidiol (CBD) y el Cannabigerol (CBG) y que está carente de THC, nunca han sido investigadas.

Además de los cannabinoides, otros compuestos fenólicos tales como las Canflavinas A y B se han aislado a partir de la planta *Cannabis sativa* (Barret ML, Scutt AM, Evans FJ. Cannflavin A and B, prenylated flavones from Cannabis sativa L. Experientia. 1986 Apr 15;42(4):452-3). La canflavina A tiene actividad antiinflamatoria ya que puede inhibir la liberación de la prostaglandina E2 (Barret ML, Gordon D, Evans FJ. Isolation from Cannabis sativa L. of cannflavin- a novel inhibitor of prostaglandin production. Biochem Pharmacol. 1985 Jun 1;34(11):2019-24). La prostaglandina proinflamatoria E2 es producida por la actividad enzimática de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), que convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas y otros mediadores lipídicos. La asociación temporal entre la pérdida de función del gen supresor tumoral APC (Adenomatous Poliposis Coli) y la sobre-expresión de COX-2 ha sido demostrada *in vivo* y ha permitido llegar a la hipótesis de que APC regula la expresión de COX-2. Además existen evidencias de que los inhibidores de COX-2 son agentes quimiopreventivos frente al cáncer de colon (Eisinger AL, Prescott SM, Jones DA, Stafforini DM. The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2007 Jan;82(1-4):147-54; Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Cancer chemoprevention by cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of case control studies. Subcell Biochem. 2007;42:193-212).

Otros documentos divulgan la actividad farmacéutica de diferentes compuestos aislados de *Canavis sativa*, como el efecto anti-inflamatorio del cannipreno (EISOHLY H, Little Tjr y EISOHLY M. Canniprene: a prototype anti-inflammatory natural product. Planta Medica, Thieme, Stuttgart. DE 56(6):662-663), el efecto anti-inflamatorio de las canflavinas A y B (Barrett ML, Scutt AM and Evans FJ. Cannflavin A and B, prenylated flavones from Cannabis sativa L. Experientia. 1986 Apr 15;42(4):452-3), el efecto anti-inflamatorio de la canflavina A, del cannabigerol y del cannabidiol (Evans

A.T. et al., Constituents of Cannabis-sativa inhibit lipooxygenase activity. Journal of Pharmacy and Pharmacology 37, página 43), o los efectos anti-inflamatorios de la cannflavona-2 (cannflavina A) y los cannabinoides, incluyendo el cannabigerol y el cannabidiol y el uso de dichos compuestos para el tratamiento de enfermedades anti-inflamatorias (WO 99/52524 A).

5 Las fenantrenoquinonas de origen no terpenoide son relativamente escasas en el reino vegetal, donde los fenantrenos oxigenados están ampliamente distribuidos. Los principales grupos de 1,4-fenantrenoquinonas pueden distinguirse atendiendo a su estructura y biosíntesis. Los compuestos hidroxilados y metoxisustituidos, tales como la annoquinona-A, cypripedin, denbinobin y combrestatin, son representativos del primer grupo. (Krohn, K., Looocka, U., Paavilainena, K., Hausenb, B.M., Schmallec HW and Kesseled H. Synthesis and electrochemistry of annoquinone-A, cypripedin methyl ether, denbinobin and related 1,4-phenanthrenequinones. ARKIVOC 2001 (i) 88-130). Curiosamente, se ha demostrado que el denbinobin tiene actividad antitumoral frente a líneas celulares de leucemia y cáncer de colon (Yang KC, Uen YH, Suk FM, Liang YC, Wang YJ, Ho YS, Li IH, Lin SY. Molecular mechanisms of denbinobin-induced anti-tumorigenesis effect in colon cancer cells. World J Gastroenterol. 2005;12(1):113-21). El denbinobin se aisló por primera vez a partir de la orquídea *Dendrobium nobile* (Lee YH, Park JD, Baek NI, Kim SI, Ahn BZ. In vitro and in vivo antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. Planta Med 1995;61: 178-180). Sin embargo, las 1,4-fenantrenoquinonas no han podido aislarse del *Dendrobium nobile* cuando esta planta es cultivada en varios lugares de Europa (Krohn, K., Looocka, U., Paavilainena, K., Hausenb, B.M., Schmallec HW, and Kieseled H. Synthesis and electrochemistry of annoquinone-A, cypripedin methyl ether, denbinobin and related 1,4-phenanthrenequinones ARKIVOC 2001 (i) 88-130). Más recientemente se ha demostrado que algunos cultivos de Cannabis contienen denbinobin, que puede inhibir la replicación de VIH-1 en células T (Sánchez-Duffhues, G., Caballero, F.J., Calzado, M.A., Maxia, L., Appendino, G., Schmitz, L., and Muñoz E. El denbinobin aislado del *Cannabis sativa* es un potente inhibidor de la replicación del VIH-1 por actuar sobre la ruta del NF-κB. 2006. 7ª Reunión Anual. Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides).

25 La relación entre inflamación y cáncer fue sugerida por primera vez por Virchow en el siglo XIX. No obstante, hasta hace pocos años, no se ha empezado a conocer la relación entre ambos. Actualmente, se sabe que las infecciones crónicas y las inflamaciones constituyen un elevado factor de riesgo para el desarrollo de tumores, como ocurre de hecho para el 15-20% de todos los cánceres. Una de las moléculas más importantes que median en la inflamación es el factor de transcripción NF-κB (factor nuclear  $\kappa$ B) que está también involucrado en los procesos promotores de tumores (Karin M, Greten FR. NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nat Rev Immunol. 2005 Oct;5(10):749-59). La activación del NF-κB en la inflamación crónica es especialmente relevante cuando se trata de carcinogénesis gastrointestinal, y especialmente en colitis asociada a cáncer (CAC), que representa más del 5% de todos los cánceres de colon (Chung DC. 2000. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. Gastroenterology 119: 854-865). La incidencia acumulada de CAC en pacientes con colitis ulcerosa varía entre el 8 y el 43% (Ekbom A. 1998. Risk of cancer in ulcerative colitis, J. Gastroenterol. Surg. 2:312-313). El factor NF-κB se ha observado en el núcleo de macrófagos de la lámina propia y en células epiteliales de biopsias de pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) y cáncer colorrectal (Boone DL, Lee EG, Libby S, Gibson PJ, Chien M, Chan F, Madonia M, Burkett PR, Ma A. Recent advances in understanding NF- $\kappa$ B regulation. Inflamm Bowel Dis. 2002 May;8(3):201-12). También se ha demostrado una activación del NF-κB y un incremento de la expresión de COX-2 en macrófagos que infiltran adenomas polipomatosos (Hardwick JC, van der Brink GR, Offerhaus GJ, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. NF- $\kappa$ B, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps. Oncogene.2001 Feb 15;20(7):819-27). La expresión de COX-2 en macrófagos infiltrados se considera un proceso esencial en la evolución de la carcinogénesis de colon (Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. N Engl J Med 2000 Jun 29; 342(26):1960-8).

Desde la identificación de NF-κB, se ha sugerido que muchas de las proteínas involucradas en su ruta de activación, y, de hecho, responsables de la inflamación y cáncer, pueden ser dianas moleculares de numerosos drogas. Algunas de estas drogas se descubrieron hace tiempo, y algunas están siendo estudiadas en ensayos clínicos (Karin M., Yamamoto Y., Wang QM. The IKK NF- $\kappa$ B system: a treasure trove for drug development. Nat Rev Drug Discov. 2004 Jan;3(1):17-26). En diferentes modelos experimentales se ha visto que los inhibidores de NF-κB pueden ser potencialmente terapéuticos en enfermedades inflamatorias intestinales agudas (Taylor C, Jobin c. Ubiquitin protein modification and signal transduction: implications for inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis. 2005 Dec; 11 (12):1097-107). Recientemente y mediante el uso de modelos animales muy específicos se ha confirmado el papel del NF-κB en el desarrollo del cáncer colorrectal de origen inflamatorio (Greten FR, Eckmann L, Greten RF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. Cell. 2004 Aug 6;118(3):285-96).

En este sentido, Kuo-Ching Yang et al., 2005 (Kuo-Ching Yang, Yih-Huei Uen, Fat-Moon Suk, Yu-Chih Liang, Ying-Jan Wang, Yuan-Soon Ho, I-Hsuan Li, Shyr-Yi Lin. Molecular mechanisms of denbinobin-induced anti-tumorigenesis effect in colon cancer cells. World J Gastroenterol. 2005;11(20):3040-5) demuestran la capacidad del denbinobin para inhibir el crecimiento del cáncer de colon, divulgando además los conocidos efectos anti-inflamatorios del mismo. Seung-Hwa Baek y Chang-Joon Lee (Boron trifluoride etherate on alumina-modified lewis acid reagent (III): Synthesis of 5-alkyl-3-(1-thioxolanyl-cyclohex-enyl)-resorcinol derivatives. Archives of Pharmacal Research 15(1))

divulgan la capacidad del cannabigerol y del cannabidiol para inhibir el crecimiento de células de carcinoma epiteloides. US 6403126 B1 describe un método de extracción de cannabinoides, canflavinas y/o aceites esenciales del cáñamo y/o un método de producir un extracto de cáñamo que carece de  $\Delta^9$ -THC ( $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol), una composición farmacéutica que comprende el extracto preparado mediante dicho método y además divulga el uso beneficioso de los cannabinoides y las canflavinas como agentes anti-inflamatorios y antineoplásicos. Sánchez-Duffhues et al., 2006 (7ª REUNIÓN ANUAL. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN SOBRE CANNABINOIDES, TOLEDO, página 34, <http://www.ucm.es/info/seic-web/documentos/libro2006.pdf>) describe la actividad anti-inflamatoria del extracto LMX-252 de Cannabis sativa, poniendo de manifiesto que dicho extracto contiene cannabigerol, cannabidiol, cannabinocromeno, cannipreno, cannabispiranol, canflavina A denbinobin y algo de THC. Además divulga la capacidad de dicho extracto para inhibir la ruta del NF-kB, indicando que el denbinobin podría ser el agente responsable de dicho efecto.

### RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición que comprende cannabidiol y denbinobin y que presenta un contenido de delta-9-tetrahidrocannabinol inferior a 0,7 % del peso total de la composición, donde

a. denbinobin está presente a concentraciones de entre 0,25  $\mu$ M y 0,5  $\mu$ M cuando el cannabidiol está presente a concentraciones de entre 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M y

b. denbinobin está presente a concentraciones entre 0,25  $\mu$ M y 1  $\mu$ M cuando el cannabidiol está presente a concentraciones de 10  $\mu$ M.

La presente invención además se refiere al uso de dicha composición para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias.

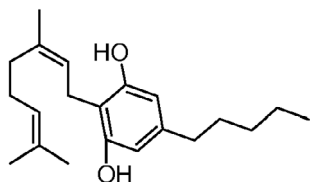
Lo que aquí se describe es una composición es una composición de, al menos, un compuesto cannabinoide no-psicotrópico y/o, al menos, un compuesto fenólico o flavonoide y/o denbinobin (1,4-fenantrenoquinona) y su uso para la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias gastrointestinales y/o cáncer.

Así, dicha composición comprende combinaciones específicas de al menos un compuesto cannabinoide no-psicotrópico seleccionado, pero no limitado, de una lista que comprende cannipreno, cannabispiranol, canflavina-A o canflavina-B; y Denbinobin. Esta composición puede también contener otros compuestos; no obstante, si el tetrahidrocannabinol (delta-9-tetrahidrocannabinol o THC) está presente en la composición, su contenido es menor del 0,7% del peso total de la composición.

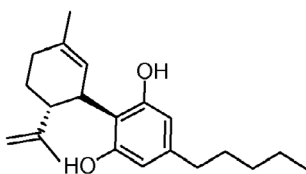
La composición comprende cannabigerol y cannabidiol y preferiblemente en un ratio entre 5:1 y 1:1 respectivamente, o en un ratio entre 4:1 o 3:1. La composición comprende además canflavina-A y denbinobin, que están dentro del rango, del 20-45% de cannabigerol, 2-15% de cannabidiol, 1-5% de canflavina y 0,1-1% de denbinobin con respecto al peso total de la composición. Las composiciones pueden también estar dentro del rango, 30-35% de cannabigerol, 6-10% de cannabidiol, 2-4% de canflavina-A y 0,4-0,7% de denbinobin, respectivamente.

Otros cannabinoides como el Cannabicromeno (CBC) y el Carmagerol (dihidroxi-CBG) y otros estilbenoides tales como el Cannipreno, el Cannabispiranol o el Cannabispireno podrían también estar presentes en la composición.

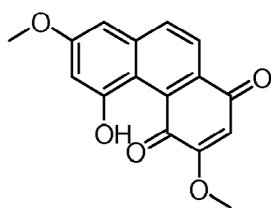
Algunos de los compuesto citados arriba, en particular el cannabigerol, el cannabidiol, el cannipreno, el cannabispiranol, la canflavina-A, el denbinobin y el cannabispiranol presentan las siguientes estructuras:



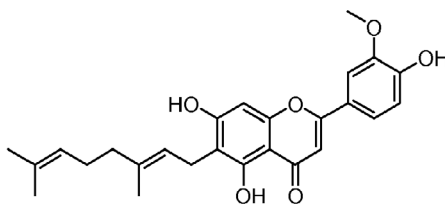
**Cannabigerol**



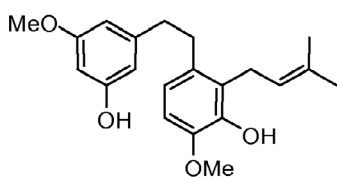
**Cannabidiol**



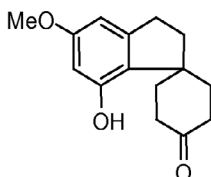
**Denbinobin**



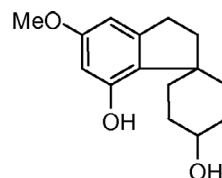
**Canflavina-A**



**Cannipreno**



**Cannabispirano**



**Cannabispiranol**

5 El cannabigerol, el cannabidiol, la canflavina-A y el denbinobin de estas composiciones podrían ser extraídos de al menos un extracto de al menos una planta de cannabis. Así, la presente invención se refiere además a una composición basada en el cannabis que incluye combinaciones específicas de al menos un compuesto cannabinoide no-psicotrópico y/o al menos un compuesto fenólico y/o flavonoide y/o Denbinobin 1,4-fenantrenoquinona.

10 El término “composición basada en cannabis” usado aquí se refiere a un extracto vegetal acetónico o particionado que contiene compuestos bioactivos referidos a la presente invención.

La planta de cannabis seleccionada es *Cannabis sativa* y más preferiblemente la variedad CARMA de *Cannabis sativa*.

15 Además, la presente invención proporciona una terapia herbal para la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales inflamatorias y cáncer, que emplea combinaciones específicas de los cannabinoides no-psicotrópicos Cannabigerol, y Cannabidiol, el flavonoide Canflavina-A y el Denbinobin 1,4-fenantrenoquinona que son proporcionados por, o bien un extracto de acetona, o bien por una extracto particionado aislado de la variedad seleccionada de *Cannabis sativa* denominada CARMA.

20 Utilizando modelos específicos y apropiados para estudiar inflamación, la presente invención proporciona evidencias que demuestran que estas composiciones tienen una potente actividad antiinflamatoria “in vivo” e “in vitro” debido a los efectos sinérgicos o aditivos de los compuestos contenidos en el extracto estandarizado.

25 La presente invención además muestra que el extracto derivado de CARMA es citotóxico para líneas celulares gastrointestinales y muestra efectos protectores contra el cáncer de colon inducido por Azoximetano y es anti-angiogénico en mamíferos. Se muestran protocolos de dosis típicas, pero no se restringe a ellas. Otros aspectos y ventajas de la invención serán evidentes para un experto medio en la materia a partir de los dibujos y la descripción de la invención.

El extracto derivado de CARMA y los compuestos Cannabigerol, Cannabidiol, Canflavina-A y Denbinobin (solos o en combinación) inhiben los procesos proinflamatorios que están involucrados en la fisiopatología de la inflamación intestinal. Este descubrimiento es esencial para la formulación de la preparación farmacéutica de una terapia herbal no-psicotrópica basada en *Cannabis sativa* con las mínimas propiedades toxicológicas adversas.

30 Además, la presente invención se refiere al uso como medicamento de una composición que comprende combinaciones específicas de al menos un compuesto cannabinoide no-psicotrópico y/o al menos un compuesto fenólico o flavonoide y/o denbinobin 1,4-fenantrenoquinona, como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, los usos de estas composiciones son para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias o para la prevención y/o tratamiento de cáncer.

35 A lo largo de la descripción y reivindicaciones la expresión “comprende” y sus variaciones no tratan de excluir otras características técnicas, componentes o pasos. Aspectos adicionales, ventajas y características de la invención serán evidentes para un experto medio en la materia a partir del análisis de la descripción o pueden ser conocidos mediante la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitantes para la presente invención.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

FIG. 1 muestra el perfil en HPLC del contenido de cannabinoides (CBG+CBD), Canflavina-A, Cannipreno, Cannabispiranol y denbinobin en un extracto de acetona de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG).

FIG. 2 muestra el efecto inhibitorio del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) sobre la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B inducido por TNF $\alpha$ .

5 FIG. 3 muestra el efecto inhibitorio del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) sobre la actividad de unión a ADN del NF- $\kappa$ B.

FIG. 4 muestra el efecto del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) sobre las rutas de señalización bioquímica del NF- $\kappa$ B.

10 FIG. 5 muestra el efecto del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) en la liberación de IL-1 $\beta$  en monocitos humanos activados con LPS.

FIG. 6 muestra el efecto del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) en la liberación de TNF $\alpha$  en monocitos humanos activados con LPS.

FIG. 7 muestra los efectos citotóxicos del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) sobre líneas celulares gastrointestinales tumorales.

15 FIG. 8 muestra los efectos protectores del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) suministrado oralmente sobre la inflamación de colon inducida con sulfato de dextrano en ratones (resultados macroscópicos).

FIG. 9 muestra los efectos protectores del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) suministrado oralmente sobre la inflamación de colon inducida con sulfato de dextrano en ratones (evaluación histológica).

20 FIG. 10 muestra los efectos del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) suministrado oralmente sobre la pérdida de peso en la enfermedad de cáncer de colon inducida con azoximetano/DSS en ratones.

FIG. 11 muestra los efectos protectores del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) suministrado oralmente sobre la enfermedad de cáncer de colon inducida con azoximetano/DSS en ratones (A: tasa de mortalidad; B: número de tumores de colon en animales individuales).

25 FIG. 12 muestra los efectos anti-angiogénicos del extracto de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG) suministrado oralmente en ratones inyectados con matrigel.

FIG. 13 muestra los efectos del Cannabigerol, Cannabidiol, Denbinobin o Canflavina-A sobre la activación de NF- $\kappa$ B inducida con TNF $\alpha$ .

FIG. 14 muestra los efectos del Cannabigerol, Cannabidiol, Denbinobin o Canflavina-A sobre la liberación de IL-1 $\beta$  inducida con LPS.

30 FIG. 15 muestra el efecto del Cannabigerol, Cannabidiol, Denbinobin o Canflavina-A sobre la liberación de TNF $\alpha$  inducida con LPS.

FIG. 16 muestra los efectos citotóxicos del Cannabigerol y Cannabidiol sobre líneas celulares derivadas de cánceres gastrointestinales.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.**

35 La variedad CARMA de *Cannabis sativa* ha sido obtenida utilizando material monoico italiano (Sur de Italia) combinado con la variedad dioica (Carmagnola). Las principales características distintivas de esta nueva variedad son el quimiotipo estable y único y el carácter monoico combinado con la calidad de la fibra y la forma tradicionales de la variedad dioica italiana. La composición en cannabinoides de esta variedad es la misma para todas las plantas. Éstas producen Cannabigerol (CBG) y Cannabidiol (CBD). De media, el 95% del contenido total en cannabinoides  
40 corresponde a CBG y CBD, y está presente en una cantidad muy limitada el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC). Fecha óptima de siembra: 10 de abril, en Italia. El tiempo de cosecha para la producción de la planta es a comienzos de agosto y la recogida de semillas puede hacerse a mitad de septiembre.

Esquema de reproducción (indica el componente femenino en primer lugar): En 1998-Carmagnola (planta única CAR-Y) cruzada con un genotipo monoico de planta del sur de Italia (F1). Todas las plantas son del quimiotipo que contiene Cannabigerol y Cannabidiol. En 1998 Carmagnola (CAR-Y) se polinizó con plantas monoicas F1 (primer cruce de reproducción, BC1). En 1999 Carmagnola (CAR-Y) se polinizó con las plantas BC1 monoicas (segundo cruce de reproducción, BC2). En 1999- Carmagnola (CAR-Y) se polinizó con las plantas BC2 monoicas (tercer cruce de reproducción, BC3). En 2000 Carmagnola (planta madre única) se polinizó con 20 plantas monoicas BC3. En 2001 se realizó una producción en masa de la R1 de la variedad en condiciones de campo aisladas con selección  
45

morfológica y química. En 2002 se realizó una producción en masa de la R2 de la variedad en condiciones de campo aisladas con selección morfológica y química (variedad CARMA-CBG).

#### Producción de extractos de CARMA-CBG.

5 El material vegetal en forma de polvo seco (inflorescencias, 850g) se calentó en un horno a 120°C durante 2h. Tras enfriarse, se extrajo el material vegetal decarboxilado con acetona (3 x 5L., 1h cada vez). Los diferentes extractos de acetona se evaporaron dando lugar a una oleorresina de color marrón oscuro (82g). El extracto crudo tiene un ratio de aproximadamente 8:1 entre cannabinoides y compuestos fenólicos. Para la partición del primer extracto de acetona se separó entre hexano y metanol acuoso y se obtuvo un ratio de aproximadamente 1:1 entre cannabinoides y compuestos fenólicos. El rendimiento de producción de extractos fue del 4 al 8% del material vegetal seco.

10 El contenido de cannabinoides en el extracto de acetona de CARMA-CBG fue: 1) Cannabigerol (CBG): 35-45%; 2) Cannabidiol (CBD): 3-10%; 3)  $\Delta$ -9-Tetrahydrocannabinol (THC): 0.0-0.7%; y 4) Cannabigerol (dihidroxi-CBG): 0.2-2%.

15 El contenido de compuestos fenólicos en el extracto de acetona de CARMA-CBG fue: 1) Canflavina A: 2-4%; 2) Canflavina B: 1-2%; Cannipreno: 4-5%; 4) Cannabispiranol: 0.5-2%; 5) Cannabispiranona: 1-4%.

El contenido de 1,4-fenantrenoquinonas en el extracto de acetona de CARMA-CBG fue: Denbinobin 0.2-1%.

#### **EJEMPLOS**

20 Los siguientes ejemplos se presentan sólo a modo de ilustración y no como limitación. Los expertos en la técnica reconocerán una variedad de parámetros no críticos que pudieran cambiarse o modificarse para obtener básicamente los mismos resultados.

#### **EJEMPLO 1: Caracterización por HPLC del perfil fitoquímico de un extracto acetónico de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG), en relación con el contenido en cannabinoides (CBG+CBD), Canflavina A, Cannipreno, Cannabispiranol y Denbinobin**

25 1g de material vegetal en polvo se extrajo exhaustivamente con acetona. El extracto se particionó entre agua-metanol (9:1, 1mL) y hexano (4mL). La fase metanólica fue evaporada y disuelta en metanol (0.2mL) y analizada por RP-HPLC en una columna de Simetría C-18 (5 micrones, 4.6 x 150mm, Waters), utilizando las siguientes condiciones:

Detección: UV (210 y 272nm)

Flujo: 1ml/min

30 Solvente A: 0.5%v/v ácido Ortofosfórico en agua

Solvente B: Acetonitrilo

Gradiente:	Tiempo	0	8	14	24	30
	%B	40	40	50	90	99

35 Ver Figura 1 (FIG. 1) y Tabla 1

Tabla1

	RT (min)	Área (V*seg)	% Área	Peso (V)	% Peso
1	7.604	6103673	11.27	395711	6.88
2	13.211	4581869	8.46	279994	4.87
3	19.134	7916718	14.61	1011006	17.58
4	23.210	10823021	19.98	1738142	30.23
5	23.630	24746110	45.68	2324432	40.43

40 **EJEMPLO 2. Aislamiento y determinación de las estructuras de los compuestos biológicamente activos aislados de *Cannabis sativa* (variedad CARMA-CBG).**

45 El material vegetal (200g) fue calentado en un horno a 120°C durante 2 horas. Tras enfriarse, se extrajo exhaustivamente con acetona hasta conseguir un residuo negro (16.4g) que se disolvió en metanol (70mL.) y se filtró sobre 40g de gel de sílice RP18. La cámara de filtrado se lavó después con 50mL de metanol, y el material filtrado se evaporó, hasta conseguir 11.8g de residuo. Éste fue fraccionado por cromatografía en columna por

gravedad en gel de sílice hasta conseguir 4 subfracciones (A-D). La subfracción A se cristalizó con hexano hasta conseguir 4.70g de CBG en forma de polvo blanco. Los licuados madre se cristalizaron dos veces con hexano-metanol hasta conseguir 230mg de CBD. La subfracción B se cristalizó a partir de éter hasta conseguir 10mg de Denbinobin. Los licuados madre se purificaron por HPLC prep. (hexano-etilacetato 7:3) hasta conseguir 85mg de Cannipreno, más 12mg de Debinobin y 21mg de Canflavina A. La subfracción C se cristalizó a partir de éter hasta conseguir 18mg de Cannabispiranol y una mezcla de Canflavina A y B, separadas por HPLC hasta conseguir 12mg de Canflavina A y 8mg de Canflavina B. La subfracción D se purificó por HPLC prep. (hexano-etilacetato 5:5) hasta conseguir 12mg de dihidroxi-cannabigerol (carmagerol) y 16mg de cannabispiranona.

### 10 **EJEMPLO 3. El extracto de CARMA-CBG inhibe la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$ .**

Este ejemplo demuestra el efecto "in vitro" de la presente invención mediante la ilustración de la inhibición de la actividad transcripcional del gen dependiente de NF- $\kappa$ B por el extracto de CARMA-CBG

15 La potencia del extracto de CARMA-CBG para inhibir la actividad transcripcional NF- $\kappa$ B dependiente se ensayó en una línea celular Jurkat-LTR-Luc. La línea celular Jurkat-5.1 es una línea de células T transfectadas establemente con un plásmido que contiene el gen de la luciferasa dirigido por el promotor HIV-1-LTR. Esta línea celular responde al TNF- $\alpha$ , el cual activa la ruta clásica de NF- $\kappa$ B. Además la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  induce la actividad transcripcional NF- $\kappa$ B dependiente del promotor HIV-LTR (Sancho R, Calzado MA, Di Marzo V, Appendino G, Muñoz E. Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. Mol Pharmacol. 2003 Feb;63(2):429-38). Este modelo celular ha sido ampliamente utilizado para el escrutinio de inhibidores de NF- $\kappa$ B naturales y sintéticos (Appendino G, Ottino M, Márquez N, Bianchi F, Giana A, Ballero M, Sterner O, Fiebich BL, Muñoz E. Arzanol an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-Pyrone from Helichrysum italicum ssp. microphyllum. J Nat Prod. 2007 Apr;70(4):608-12; Appendino G, Maxia L, Bascope M, Houghton PJ, Sánchez-Duffhues G, Muñoz E, Sterner O. A meroterpenoid NP-kappaB inhibitor and drimane sesquiterpenoids from Asafetida. J Nat Prod. 2006 Jul;69(7):1101-4; Márquez N, Sancho R, Bedoya LM, Alcamí J, López-Pérez JL, Feliciano AS, Fiebich BL, Muñoz E. Mesuol, a natural occurring 4-phenyl-coumarin, inhibits HIV-1 replication by targeting the NF-kappaB pathway. Antiviral Res. 2005 Jun;66(2):137-45). Las células Jurkat-5.1 se preincubaron durante 30 min con concentraciones crecientes del extracto de CARMA-CBG disueltos en DMSO, seguido por estimulación con TNF- $\alpha$  (2ng/ml) durante 6h. Las células se lavaron 2 veces en PBS y se lisaron en 25mM Tris-fosfato pH7.8, 8mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1% Triton X-100 y 7% glicerol durante 15 min a temperatura ambiente. Después los lisados se centrifugaron y los sobrenadantes se usaron para medir la actividad luciferasa utilizando un luminómetro Autolumat LB 9510 (Berthold Technologies). La concentración de proteína se determinó mediante el método Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA). Los resultados se representan como porcentaje de activación (considerando el 100% de activación los valores de R.L.U. obtenidos con las células tratadas con TNF- $\alpha$  en ausencia de extracto de CARMA-CBG). Los resultados representan la media $\pm$ SD de 3 experimentos diferentes y se demuestra que el extracto de CARMA-CBG, de manera dependiente de concentración, inhibió la transactivación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  (Figura 2).

### 40 **EJEMPLO 4. El extracto de CARMA-CBG inhibe la unión de NF- $\kappa$ B al ADN inducida por TNF- $\alpha$ .**

Este ejemplo demuestra el efecto "in vitro" del presente método inventivo ya que ilustra el efecto inhibitor del extracto de CARMA-CBG sobre la unión del NF- $\kappa$ B al ADN.

45 La inhibición de la unión a ADN del factor de transcripción NF- $\kappa$ B se estudió mediante ensayos EMSA (Sancho R, Calzado MA, Di Marzo V, Appendino G, Muñoz E. Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. Mol Pharmacol. 2003 Feb;63(2):429-38). Las células Jurkat-5.1 se estimularon con TNF- $\alpha$  en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de extracto de CARMA-CBG disuelto en DMSO. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se aislaron las proteínas nucleares. La concentración de proteína se determinó por el método Bradford. Para el ensayo EMSA, se utilizó como sonda un oligonucleótido consenso de NF- $\kappa$ B marcado con [<sup>32</sup>P]ATP. La mezcla de la reacción de unión contenía 3 $\mu$ g de proteínas nucleares, 0.5 $\mu$ g de poli(dI-dC), 20mM Hepes pH7.70mM NaCl, 2mM DTT, 0.01% NP-40, 100 $\mu$ g/ml BSA, 4% Ficoll y 10<sup>5</sup> cpm de fragmentos marcados de ADN en un volumen total de 20 $\mu$ l. Después de una incubación de 30 min a 4°C, la mezcla se separó electroforéticamente a través de un gel de poli(acrilamida) al 6% que contenía 89mM Tris-borato, 89mM ácido bórico y 1mM EDTA. Los geles se corrieron electroforéticamente durante 30 min a 225V, se cargaron las muestras y después se continuó con la electroforesis durante 2 h más. Finalmente, los geles se secaron y expusieron a película de Rayos X a -80°C. Se ha demostrado que en las células T Jurkat (5.1), los extractos de CARMA-CBG inducen una disminución dosis-dependiente de la actividad de unión de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  (Figura 3).

### 60 **EJEMPLO 5. El extracto de CARMA-CBG inhibe la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ y la fosforilación de p65 inducida por TNF- $\alpha$ .**

Este ejemplo demuestra el efecto "in vitro" del presente método inventivo mediante la ilustración de la inhibición de las vías de señalización bioquímicas que activan la ruta clásica de NF- $\kappa$ B por el extracto de CARMA-CBG.

65 Los efectos inhibitorios de CARMA-CBG sobre la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  inducida por TNF- $\alpha$  y sobre la fosforilación de p65 (serina 536) se estudió por inmunoblots. Las células Jurkat-5.1 se estimularon con TNF- $\alpha$



(2ng/ml) durante 5, 15 o 30 min en ausencia o presencia de extracto de CARMA-CBG (25µg/ml). Tras esto, las células se lavaron con PBS y se extrajeron las proteínas celulares en 50µl de buffer de lisis (20mM Hepes pH8.0, 10mM KCl, 0.15mM EGTA, 0.15 mM EDTA, 0.5mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5mM NaFl, 1mM DTT, leupeptina 1µg/ml, pepstatina 0.5µg/ml, aprotinina 0.5 µg/ml y 1mM PMSF) que contenía 0.5% NP-40. La concentración de proteína se determinó mediante el método Bradford y 30µg de proteínas se hirvieron en solución Laemmli y se separaron electroforéticamente en geles al 10% de SDS/poliacrilamida. Las proteínas se separaron y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0.5A a 100V; 4°C) durante 1h. Las membranas se bloquearon en solución TBS que contenía 0.1% Tween 20 y 5% de leche en polvo desnatada a 4°C durante toda la noche y se llevó a cabo la inmunodetección de IκBα, fosfo-IκBα, p65 total, fosfo-p65 y tubulina con anticuerpos secundarios específicos marcados con mAbs y HRP utilizando un sistema ECL (Figura 4).

**EJEMPLO 6. El extracto CARMA-CBG inhibe la liberación de IL-1β en monocitos humanos estimulados con LPS.**

Este ejemplo demuestra el efecto “in vitro” del presente método inventivo mediante la ilustración de los efectos inhibitorios del extracto de CARMA-CBG sobre la liberación de la citoquina pro-inflamatoria IL-1β en monocitos estimulados con LPS.

El efecto inhibitorio del extracto de CARMA-CBG sobre la liberación de IL-1β se estudió en células fagocíticas mononucleares humanas (monocitos). Los monocitos de donantes humanos sanos se prepararon siguiendo el protocolo estandarizado (preparación en gradiente de Ficoll) utilizando un cultivo completamente libre de endotoxinas. Utilizando tubos de 50ml, 25ml de Ficoll con 25ml de sangre se cargaron en buffy coats procedente de sangre de donadores sanos. El gradiente se estableció por centrifugación a 1800 r.p.m. y 20°C durante 40 min mediante el uso de aceleración y frenado lentos. Las células mononucleares de la sangre periférica situadas en la interfase se recogieron muy cuidadosamente y se resuspendieron en 50ml de una solución salina de fosfato precalentada seguida de centrifugación durante 10 min, a 1600 r.p.m. y 20°C. El sobrenadante se retiró y las células se lavaron en 50ml de PBS y se centrifugaron como se ha descrito anteriormente. Las células se resuspendieron en 50ml de medio RPM1-1640 bajo en endotoxinas, suplementado con suero humano al 10% (PAA). Tras el recuento celular en un contador de partículas, las células se sembraron en placas de 14 pocillos para ELISA y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio y las células no adherentes (linfocitos) se retiraron y se añadió medio RPM1-1640 fresco con suero humano al 1%. Los monocitos se trataron con LPS (10ng/µl), en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de extracto de CARMA-CBG disuelto en DMSO, durante 24 h. La producción de IL-1β se determinó por ELISA. El extracto inhibió significativamente la liberación de IL-1β en las células estimuladas con LPS de manera dosis-dependiente. La activación mediada por LPS en ausencia de CARMA-CBG se eligió arbitrariamente como el 100% de liberación de IL-1β (Figura 5).

**EJEMPLO 7. El extracto CARMA-CBG inhibe la liberación de TNF-α en monocitos humanos estimulados con LPS.**

Este ejemplo demuestra el efecto “in vitro” del presente método inventivo mediante la ilustración de los efectos inhibitorios del extracto de CARMA-CBG sobre la liberación de la citoquina pro-inflamatoria TNF-α en monocitos estimulados con LPS.

El efecto inhibitorio del extracto de CARMA-CBG sobre la liberación de TNF-α se estudió en células fagocíticas mononucleares periféricas humanas. Los monocitos se aislaron como se describe en el Ejemplo 6 y se trataron con LPS (10ng/µl), en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del extracto de CARMA-CBG disuelto en DMSO durante 24 h. La producción de TNF-α se determinó por ELISA. Los extractos inhibieron significativamente y de manera dosis-dependiente la liberación de TNF-α en las células estimuladas con LPS. La activación mediada por LPS en ausencia de CARMA-CBG se estableció arbitrariamente como el 100% de la liberación de TNF-α (Figura 6).

**EJEMPLO 8. El extracto de CARMA-CBG induce citotoxicidad en las líneas celulares de cáncer gastrointestinal AGS y HCT-116.**

Este ejemplo demuestra los efectos antitumorales in vitro del presente método inventivo mediante la ilustración de los efectos citotóxicos del extracto de CARMA-CBG sobre las líneas celulares tumorales AGS (cáncer gástrico) y HCT-116 (cáncer de colon).

El efecto citotóxico del extracto de CARMA-CBG se investigó mediante ensayo de MTT. Brevemente, las células AGS y HCT-116 se cultivaron a una densidad de  $1.0 \times 10^4$  células/ml en placas de 96 pocillos, en 100µl de suspensión celular por pocillo y en medio DMEM que contenía suero fetal de ternera al 10%, durante 12 h. Las células se trataron con o sin concentraciones crecientes del extracto de CARMA-CBG durante 24 h. Tras esto, se añadieron 50µl de MTT (5mg/ml) de una solución mezcla de MTT:DMEM (1:2) a cada pocillo, y las células se incubaron durante 4 h a 37°C en oscuridad, y después se paró la reacción, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100µl de DMSO a cada pocillo durante 10 min, en agitación suave. Finalmente, se midió la absorbancia a 570nm utilizando un multilector de microplacas (TECAN Genius Pro). El extracto disminuyó significativamente el porcentaje de viabilidad que fue asignado del 100% en células no tratadas (Figura 7).

**EJEMPLO 9. Efectos protectores del extracto de CARMA-CBG sobre la enfermedad inflamatoria intestinal inducida por DSS (evaluación macroscópica).**

Este ejemplo demuestra los efectos anti-inflamatorios in vivo del presente método inventivo mediante la ilustración de que el tratamiento oral con extracto de CARMA-CBG previene el inicio de la enfermedad inflamatoria de colon inducida químicamente en ratones Swiss. La enfermedad inflamatoria intestinal (Inflammatory Bowel Disease, IBD) inducida por sulfato de sodio dextrano (DSS) es un modelo murino que se ha demostrado que mimetiza algunas de las patologías observadas en enfermedades ulcerosas (Neurath MF, Fuss I, Schumann G, Pettersson S, Arnold K, Muller-Lobeck H, Strober W, Herfath C, Buschenfelde KH. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. Ann N Y Acad Sci. 1998 Nov 17; 859:149-59).

A los ratones Swiss (Grupo control, n=7) y a los ratones tratados con CARMA-CBG (2 Grupos CBG, n=6) se les dio en el agua de bebida un 3% (v/v) de DSS (P.mol.: 36000-50000, ICN Pharmaceuticals Inc., Calif., USA) durante 7 días. Desde el día 1 al 7 se les dio a los grupos CARMA-CBG 50mg/Kg o 100mg/Kg (una vez al día) del extracto por vía oral mediante sonda. El extracto de CARMA-CBG se disolvió en una solución salina que contenía Chremophor al 10%. Tras finalizar la administración de DSS, los ratones se sacrificaron mediante inhalación de éter, y se les retiraron los colon para examinar la colitis. Los resultados finales de enfermedad fueron una combinación de 3 resultados diferentes: 1) Resultado de deposición: 0= normal; 1= heces blandas; 2= heces amorfas; 3= diarrea (presencia de sangre añadido al resultado 1); 2) Resultados de longitud del colon: 0= acortamiento <5%; 1= 5-14% de acortamiento; 2= 15-24% de acortamiento; 3= 25-35% de acortamiento; 4= >35% de acortamiento; 3) Resultados de daño en el colon: 0= normal; 1= inflamación leve; 2= inflamación distribuida más ampliamente; 3= inflamación distribuida muy ampliamente (Figura 8).

**EJEMPLO 10. Efectos protectores del extracto de CARMA-CBG sobre la enfermedad inflamatoria intestinal (evaluación histológica).**

Este ejemplo demuestra los efectos anti-inflamatorios in vivo del presente método inventivo mediante la ilustración de que el tratamiento oral con extracto de CARMA-CBG previene el inicio de la enfermedad inflamatoria de colon inducida químicamente en ratones Swiss. Los tejidos de colon procedentes de los animales control (no tratados), animales inducidos con DSS, y animales inducidos con DSS y tratados por vía oral con el extracto de CARMA-CBG se fijaron con paraformaldehído (4%). Se realizaron secciones sagitales de 6µM con un microtomo y se tiñeron las preparaciones con hematoxilina-eosina. Los colon de ratones inducidos con DSS mostraron un daño epitelial extenso acompañado por infiltración transmural de las células inflamatorias. Por el contrario, en ratones tratados oralmente con CARMA-CBG durante el tiempo de inducción de la IBD con DSS, el epitelio glandular permaneció altamente conservado y se identificaron pocas células inflamatorias en la lámina propia (Figura 9).

**EJEMPLO 11. Efectos antitumorales del extracto de CARMA-CBG sobre la enfermedad de cáncer de colon inducida con azoximetano en ratones.**

Este ejemplo demuestra los efectos antitumorales in vivo del presente método inventivo mediante la ilustración de que el tratamiento oral con extracto de CARMA-CBG previene claramente del cáncer asociado a colitis (CAC) en ratones. Los animales tratados con una sola inyección del mutágeno químico azoximetano seguido de tratamiento oral con sulfato de sodio dextrano es un modelo murino que se ha demostrado que mimetiza la carcinogénesis de colon en humanos (Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. Carcinogenesis, 2006 Jan; 27(1):162-9).

En este estudio, se utilizaron ratones C57BL/6J de 6-8 semanas de edad. Todos los animales se albergaron en cajas de plástico (5 o 6 ratones por caja), con acceso libre a agua para beber y dieta basal de pienso, bajo condiciones controladas de humedad, luz (ciclos de 12/12 h de luz/oscuridad) y temperatura (23-26°C). Fueron distribuidos por peso corporal en grupos experimentales y de control. El Azoximetano (AOM) fue comprado a Sigma Chemical Co. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con 12.5mg/kg AOM. Tras 5 días, se les añadió DSS al 2.5% (P.mol. 36-50kDa) durante 5 días, seguido de 16 días de agua normal. El ciclo se repitió 2 veces (5 días de DSS al 2.5% y 4 días de DSS al 2%) y se sacrificaron los ratones diez días después del último ciclo.

El extracto de CARMA-CBG disuelto en una solución salina que contenía Cremophor al 10% se les dio oralmente a los grupos indicados tres veces por semana, con excepción de los días de inducción con DSS en los cuales el extracto se administró diariamente. Los ratones se sacrificaron diez días después del último ciclo. El tracto intestinal completo de cada ratón se extrajo, se irrigó suavemente con PBS utilizando una jeringa y se abrió longitudinalmente. El recuento de tumores se realizó en experimentos de doble ciego y nuestros datos muestran que los animales tratados con el extracto de CARMA-CBG desarrollaron un promedio de 6 tumores por animal comparado con el grupo control, donde el promedio fue de 16 tumores por animal (Figura 11B).

También se realizaron controles de peso semanales a cada grupo. Se observó incremento del peso corporal en el grupo control durante todo el proceso. Se observó pérdida de peso durante el primer período de DSS en los grupos que lo recibieron. Después de seis semanas de tratamiento se observó una recuperación significativa del grupo tratado con CARMA-CBG, comparado con el grupo no tratado que también recibió AOM/DSS (Figura 10).

Finalmente, la tasa de mortalidad se redujo del 50% en el grupo control (AOM+DSS en ausencia de CARMA-CBG) al 0% en el grupo tratado con CARMA-CBG (Figura 11A).

#### **EJEMPLO 12. Efecto anti-angiogénico “in vivo” del extracto de CARMA-CBG.**

Este ejemplo demuestra los efectos anti-angiogénicos in vivo del presente método inventivo mediante la ilustración de que el tratamiento oral con CARMA-CBG previene claramente la angiogénesis en ratones.

**Métodos.** Ratones hembra Balb/c de ocho semanas de edad se dividieron en cuatro grupos con diez ratones por grupo. El día previo al experimento se descongeló a 4°C un lote congelado de Matrigel de 10ml previamente congelado. El día del experimento, se mezclaron 30µl de Heparina 16000U/ml y 30µl de aFGF 0,25µg/ml con 7,5ml de Matrigel a 4°C. Otros 2,5ml de Matrigel a 4°C se mezclaron con 10µl de Heparina 16000U/ml y 10µl de PBS estéril, para inyectar a los animales control (sin aFGF). Cada ratón se inyectó subcutáneamente con 250µl de la mezcla utilizando una jeringa con una aguja 25 3/8-G. La inyección se realizó en la caja torácica, cerca del esternón, pero muy por debajo de los nódulos linfáticos axilares. Los tres grupos se inyectaron con una mezcla de Matrigel/aFGF/Heparina y un grupo (usado como control interno) se inyectó con la preparación de Matrigel/Heparina/PBS. Al día siguiente se empezó tratamiento oral con placebo o extractos de Cannabis. Durante cinco días, los animales de experimentación se trataron con Placebo-Cremophor al 10%- (grupo I y II) y extracto de Cannabis CBG (grupo III, 100mg/kg). Tras 5 días de tratamiento diario, los animales fueron sacrificados con CO<sub>2</sub> y el gel se extrajo utilizando tijeras y fórceps. El extracto de matrigel se homogeneizó en 9 volúmenes de PBS utilizando un homogeneizador. Se disolvieron 15µl de cada muestra en 100µl de ácido acético glacial al 90% y se incubaron al menos 20 min. A una placa de 96 pocillos que contenía 140µl de TMB 5mg/ml, se añadieron 10µl de cada muestra y estándares de hemoglobina (0.6, 0.3, 0.15, 0.075, 0.0375, 0.0188 y 0.009mg/ml). Finalmente, se añadieron 150µl de peróxido de hidrógeno al 0.3% a la placa y se mezcló. Utilizando un lector de placas, se midieron los cambios en la absorbancia a 600nm (550nm) y se calculó la concentración de hemoglobina en la muestras por comparación con los estándares (Figura 12).

#### **EJEMPLO 13: Inhibición de la activación del factor de transcripción κB (NF-κB) inducida por TNF-α por Cannabigerol (CBG), Cannabidiol (CBD), Canflavina A o Denbinobin, en células linfoides.**

Para determinar la transcripción del HIV-1-LTR-luc dependiente de NF-κB, las células 5.1 se preincubaron durante 30 min separadamente con CBG, CBD, Canflavina A o Denbinobin, como se indica, seguido por estimulación con TNF-α durante 6 h, y se midió la actividad luciferasa, como se describe anteriormente. La concentración de proteína se determinó mediante el método Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA). Los resultados se muestran como porcentaje de activación (considerando las células tratadas sólo con TNF-α como el 100% de activación). Los resultados se representan como la media±SD de tres experimentos diferentes. Utilizando la línea celular estable transfectada 5.1, se demostró que el Denbinobin inhibió de manera dosis dependiente la transactivación de HIV-1-LTR inducida por TNF-α. Esta activación también fue inhibida, aunque en menor medida, por CBD, Canflavina A y CBG (Figura 13).

#### **EJEMPLO 14. Efectos aditivos o sinérgicos del Cannabigerol (CBG), Cannabidiol (CBD), Canflavina A o Denbinobin combinado con CBD, Canflavina A o Denbinobin sobre la inhibición de la activación del factor de transcripción κB (NF-κB) inducida por TNF-α en células linfoides.**

El Cannabigerol (CBG), el Cannabidiol (CBD), la Canflavina A o el Denbinobin se testaron en las combinaciones que se indican y se analizaron en un ensayo del gen reportero luciferasa dependiente de NF-κB, donde la actividad luciferasa refleja la magnitud de la activación transcripcional de NF-κB.

Comparando los resultados obtenidos con los compuestos testados de forma individual, se demostró que la combinación por pares de estos compuestos tenía un efecto aditivo o sinérgico.

El CBG tenía un efecto aditivo cuando se combinó con CBD o con Denbinobin, pero este efecto era sinérgico cuando era combinado con CBD, Canflavina A o Denbinobin, a las concentraciones indicadas.

El CBD tenía un efecto aditivo o sinérgico con Canflavina A o Denbinobin, dependiendo de las concentraciones testadas.

La Canflavina A tenía un efecto aditivo cuando se combinaba con Denbinobin a todas las concentraciones testadas.

Tabla 2

%INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NF-κB INDUCIDA CON TNF-α		CBD		CBG		CANFLAVINA A		DENBINOBIN	
		10μM	20μM	10μM	20μM	10μM	20μM	1μM	2μM
-		14,43	59,67	0,00	18,33	16,62	38,83	44,88	93,07
CBD	5 μM								
	10 μM								
	25 μM								
CBG	5 μM	-4,90	83,86 *						
	10 μM	20,07 *	85,71						
	25 μM	79,01 **	94,47 **						
CANFLAVINA A	5 μM	-31,59	67,48 *	0,22	17,45				
	10 μM	27,33	88,25 **	28,29 **	33,40				
	25 μM	89,52 **	99,40 *	69,44 **	87,50 **				
DENBINOBIN	0,25μM	58,07 **	91,15 **	18,08	16,03	44,96 *	56,83 *		
	0,5μM	71,93 **	96,15 **	25,12	50,07 **	52,34 *	74,44 *		
	1 μM	88,17 **	98,59	50,10	64,72 *	74,41 *	88,05 *		
	2 μM	100,00 *	100,00 *	91,79	97,21 *	100,00 *	100,00 *		
* EFECTOS ADITIVOS									
** EFECTOS SINÉRGICOS									

5 La **Tabla 2** muestra los efectos sinérgicos o aditivos del Cannabigerol, el Cannabidiol, el Denbinobin y la Canflavina-A sobre la inhibición de la activación de NF-κB inducida por TNF-α.

10 **EJEMPLO 15. Inhibición de la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 por Cannabigerol (CBG), Cannabidiol (CBD) o Denbinobin en monocitos activados con LPS.**

15 Los monocitos se aislaron de donantes humanos sanos como se indicó anteriormente, y fueron después tratados con LPS (10ng/ml), en ausencia o presencia de CBG, CBD o Denbinobin, como se indica, disueltos en DMSO. La producción de IL-1 se determinó por ELISA y se muestra la media de los valores de dos experimentos independientes. El valor de la activación mediada por LPS se estableció arbitrariamente como el 100%.

Los diferentes compuestos causaron una disminución significativa dosis-dependiente de la secreción al medio de IL-1 inducida por LPS, siendo el más potente el Denbinobin, seguido por el CBD y el CBG (Figura 14).

20 **EJEMPLO 16. Efectos aditivos o sinérgicos producidos sobre la inhibición de la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 por Cannabigerol (CBG), Cannabidiol (CBD), Canflavina A o Denbinobin combinados con CBD, Canflavina A o Denbinobin en monocitos activados con LPS.**

25 Monocitos procedentes de donadores humanos sanos se trataron con LPS (10ng/ml) en ausencia o presencia de CBG, CBD o Canflavina A, combinados de la manera indicada. La producción de IL-1 se determinó por ELISA y se muestra la media de dos experimentos independientes.

30 Los resultados se compararon con los obtenidos con los compuestos testados de forma individual y se mostró que la combinación por pares de estos compuestos tenía efecto aditivo o sinérgico dependiendo de las concentraciones de los compuestos utilizadas en cada caso.

El CBG tenía un efecto aditivo combinado con CBD o Denbinobin, pero este efecto era sinérgico cuando se combinaba con Canflavina A o Denbinobin a las concentraciones indicadas.

35 El CBD tenía un efecto aditivo combinado con Canflavina A o Denbinobin pero este efecto era sinérgico con Canflavina A dependiendo de las concentraciones testadas.

La Canflavina A tenía un efecto sinérgico cuando se combinaba con Denbinobin.

Tabla 3

%INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 INDUCIDA CON LPS	CBD		CBG		CANFLAVINA A		DENBINOBIN	
	10µM	20µM	10µM	20µM	10µM	20µM	1µM	2µM
-	70,10	84,00	9,40	32,60	0,00	0,00	37,00	70,00
CBD	5 µM							
	10 µM							
	25 µM							
CBG	1 µM	68,78	91,44 *					
	5 µM	82,71	93,43 *					
	10 µM	91,32 **	98,52 *					
	25 µM	100,00 *	100,00 *					
CANFLAVINA A	1 µM	89,27 **	89,53	21,45 **	84,70 **			
	5 µM	40,51	92,04 *	55,81 **	69,63 **			
	10 µM	47,47	96,01 **	77,32 **	61,05			
	25µM	68,51	100,00 **	85,00 **	46,54			
DENBINOBIN	0,25µM		92,94 *		51,43 *			
	0,5µM		100,00 *		81,94 **			
	1 µM	95,41 *	100,00 *	40,12	100,00 **	-8,06	38,03 *	
	2 µM	100,00 *	100,00 *	100,00 **	100,00 *	100,00 **	96,49 **	
* EFECTOS ADITIVOS								
** EFECTOS SINÉRGICOS								

5 La **Tabla 3** muestra los efectos sinérgicos o aditivos del Cannabigerol, Cannabidiol, Denbinobin y Canflavina-A sobre la liberación de IL-1 $\beta$  en monocitos activados con LPS.

**EJEMPLO 17. Inhibición de la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  por Cannabigerol (CBG), Cannabidiol (CBD) o Denbinobin en monocitos activados con LPS.**

10 La producción de TNF- $\alpha$  se determinó por ELISA en el sobrenadante de monocitos tratados con LPS en ausencia o presencia de CBG, CBD o Denbinobin de la manera indicada. Los diferentes compuestos causaron una disminución significativa dosis-dependiente de la secreción al medio de TNF- $\alpha$  inducida por LPS, siendo el Denbinobin el más potente, seguido por el CBD y el CBG (Figura 15).

15 **EJEMPLO 18. Efectos aditivos o sinérgicos en la inhibición de la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  por Cannabigerol (CBG), Cannabidiol (CBD), Canflavina A o Denbinobin combinado con CBD, Canflavina A o Denbinobin en monocitos activados con LPS.**

20 Monocitos procedentes de donantes humanos sanos se trataron con LPS (10ng/ml) en ausencia o presencia de CBG, CBD, Canflavina A o Denbinobin de forma individual o combinados de la manera indicada. La producción de TNF- $\alpha$  se determinó por ELISA.

25 Los resultados se compararon con los obtenidos con los compuestos testados solos y se demostró que la combinación por pares tenía un efecto aditivo o sinérgico dependiendo de las concentraciones de los compuestos utilizadas en cada caso.

El CBG tenía un efecto aditivo combinado con CBD o Denbinobin, pero este efecto era sinérgico cuando era combinado con Canflavina A o Denbinobin, a las concentraciones que se indican.

30 El CBD tenía un efecto aditivo combinado con Canflavina A o Denbinobin pero este efecto era sinérgico con Canflavina A dependiendo de las concentraciones testadas.

Tabla 4

%INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TNF- $\alpha$ INDUCIDA POR LPS	CBD		CBG		CANFLAVINA A		DENBINOBIN	
	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M
-	33,30	83,60	24,90	59,80	0,00	0,00	32,00	64,00
CBD	5 $\mu$ M							
	10 $\mu$ M							
	25 $\mu$ M							
CBG	1 $\mu$ M	17,05	88,60					
	5 $\mu$ M	24,35	100,00 *					
	10 $\mu$ M	72,45	100,00 *					
	25 $\mu$ M	100,00	100,00 *					
CANFLAVINA A	1 $\mu$ M	6,20	98,28 *	-43,68	-26,74			
	5 $\mu$ M	17,89	98,91 *	18,40	-6,49			
	10 $\mu$ M	29,01	100,00 **	34,79	28,70			
	25 $\mu$ M	66,66 **	100,00 **	54,94 **	48,25			
DENBINOBIN	0,25 $\mu$ M		99,82		76,99**			
	0,5 $\mu$ M		100,00 *		92,12 **			
	1 $\mu$ M	98,78 **	100,00 *	86,31 **	100,00 *	80,25 **	64,64 **	
	2 $\mu$ M	100,00 *	100,00 *	100,00 **	100,00 *	100,00 **	95,04 **	
* EFECTOS ADITIVOS								
** EFECTOS SINÉRGICOS								

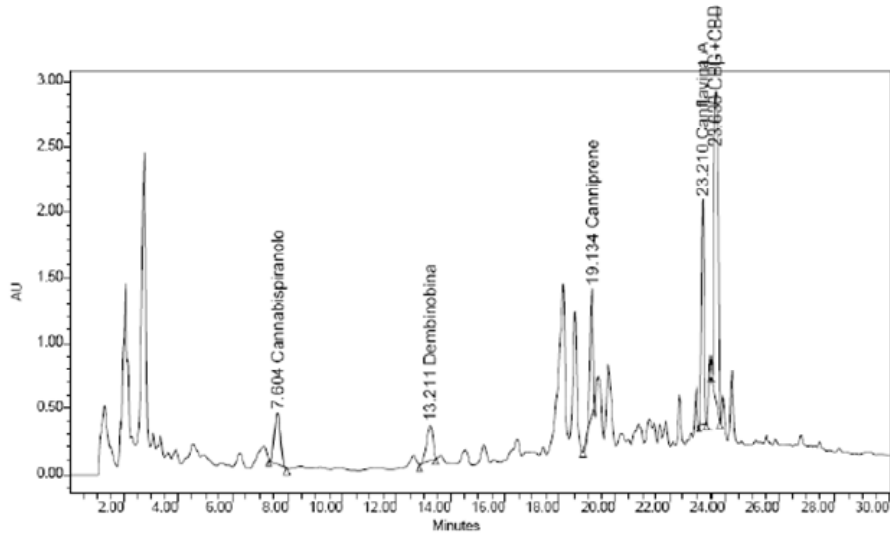
- 5 La **Tabla 4** muestra los efectos aditivos o sinérgicos del Cannabigerol, Cannabidiol, Denbinobin y Canflavina-A sobre la liberación de TNF- $\alpha$  inducida por LPS.

**EJEMPLO 19. Actividades aditivas citotóxicas del Cannabigerol (CBG) y el Cannabidiol (CBD) en las líneas celulares cancerígenas AGS, HCT-116 y SW480.**

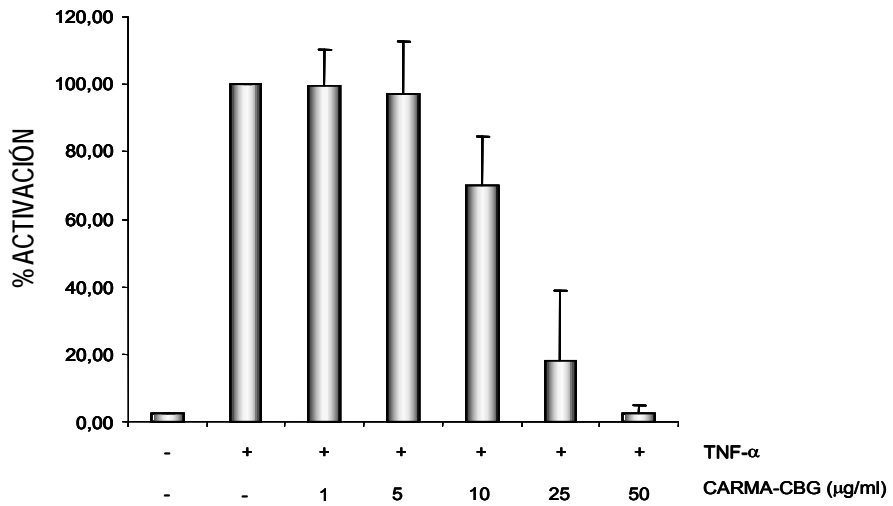
- 10 Este ejemplo demuestra los efectos antitumorales in vitro del presente método inventivo mediante la ilustración de los efectos citotóxicos de la combinación entre el Cannabidiol (CBD) y el Cannabigerol (CBG) sobre las líneas celulares tumorales AGS (cáncer gástrico), HCT-116 y SW480 (cáncer de colon).
- 15 El efecto citotóxico del Cannabigerol (CBG) y del Cannabidiol (CBD) solos o en combinación se investigó por el ensayo de Calceína-AM. Brevemente, las células AGS, SW480 y HCT-116 se cultivaron a una densidad de  $1.0 \times 10^4$  células/ml en placas de 96 pocillos, con 200 $\mu$ l de suspensión celular por pocillo y cultivadas en DMEM completado con 10% de suero fetal bovino. Las células se trataron con y sin CBD, CBG o una combinación de ambos compuestos durante 24 h, tras lo cual los pocillos se lavaron y las células se incubaron con Calceína-AM (1 $\mu$ M) (Molecular Probes) durante 30 min. Después se detectó la fluorescencia de las células viables en un lector de placas (TECAN Genius Pro). La intensidad de la fluorescencia fue inversamente proporcional a la muerte celular inducida por los compuestos. Los resultados se representan en porcentaje de supervivencia celular (dando el valor de 100% de supervivencia a las células no tratadas control). Ambos, CBD y CBG indujeron citotoxicidad en las tres líneas celulares y se observó un efecto aditivo cuando las células se trataron con una combinación de ambos compuestos (Figura 16).
- 20

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende cannabidiol y denbinobin, y que presenta un contenido en delta-9-tetrahidrocannabidiol menor del 0,7 % del peso total de la composición, donde
- 5           a. denbinobin está presente a concentraciones de entre 0,25  $\mu\text{M}$  y 0,5  $\mu\text{M}$  cuando el cannabidiol está presente a concentraciones de entre 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$ , y
- b. denbinobin está presente a concentraciones entre 0,25  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  cuando el cannabidiol está presente a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ .
- 10   2. La composición según la reivindicación 1, donde la composición es una composición basada en cannabis.
3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el cannabidiol y el denbinobin derivan de al menos un extracto de al menos una planta de cannabis.
- 15   4. La composición según la reivindicación 3, donde la planta de cannabis está seleccionada de *Cannabis sativa*.
5. La composición basada en cannabis de la reivindicación 4, donde la planta de cannabis está seleccionada de la variedad CARMA de *Cannabis sativa*.
- 20   6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso como medicamento.
- 7.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso como anti-inflamatorio.
- 25   8. La composición según la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades anti-inflamatorias.
- 9.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.



**FIG.1**



**FIG.2**



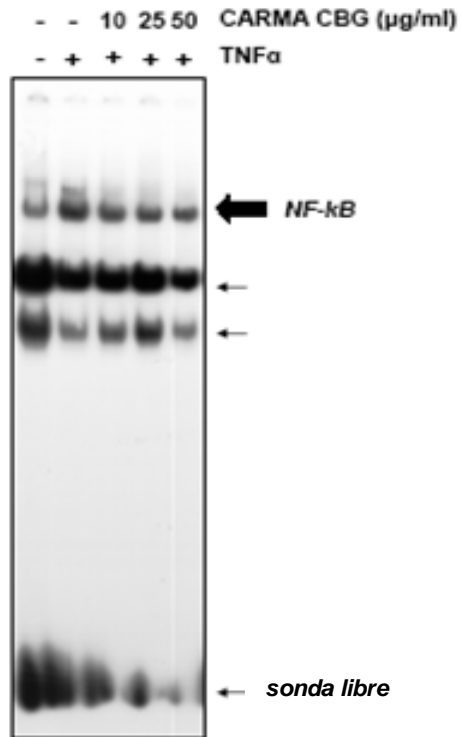


FIG.3

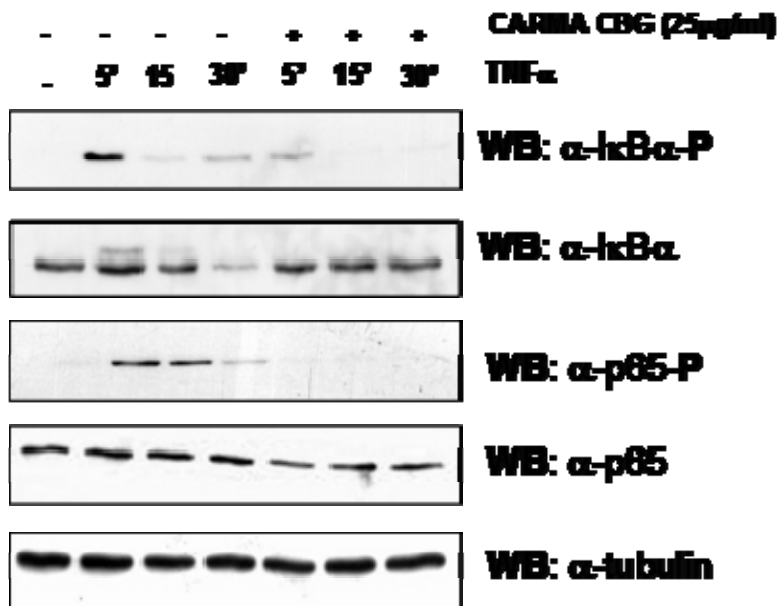
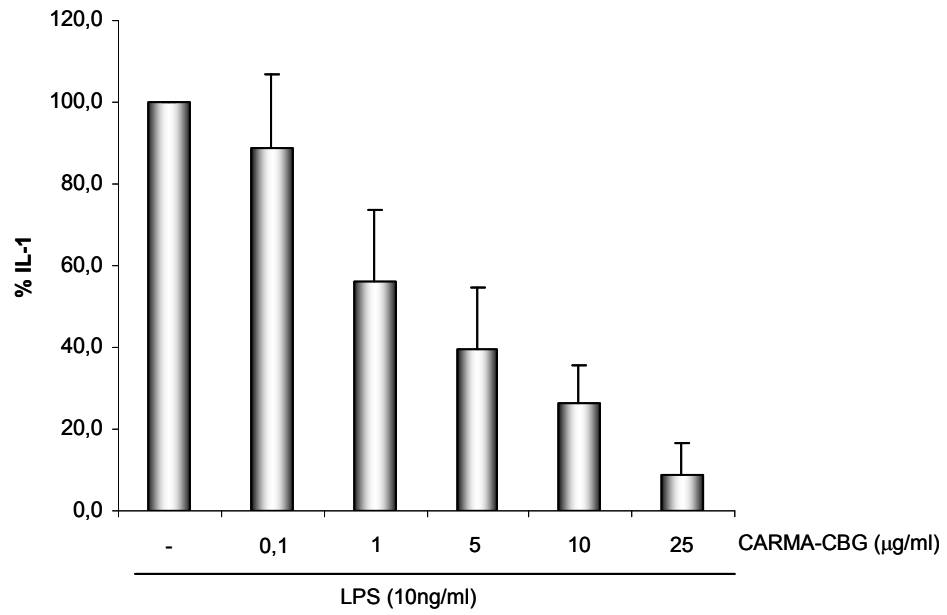
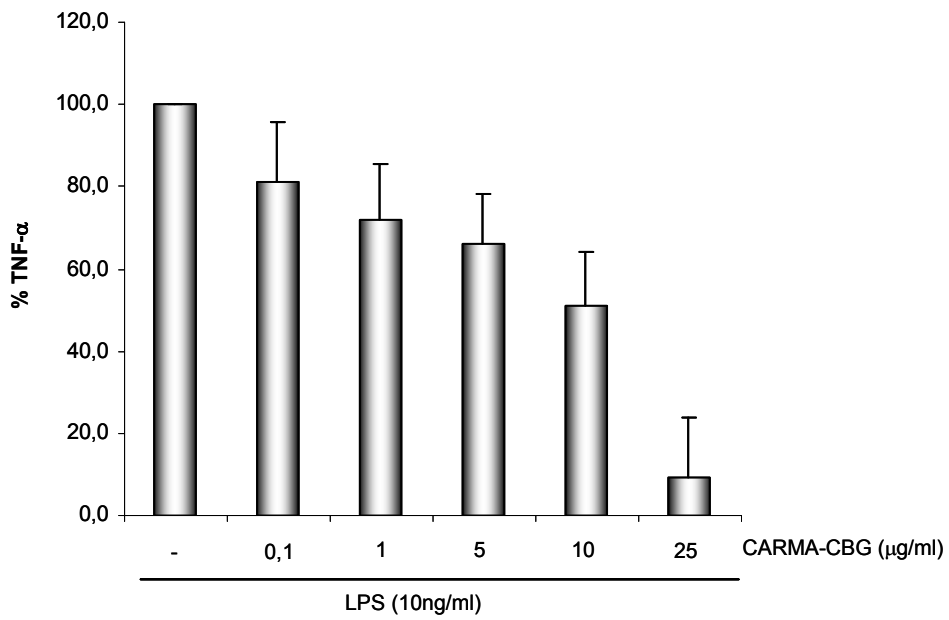


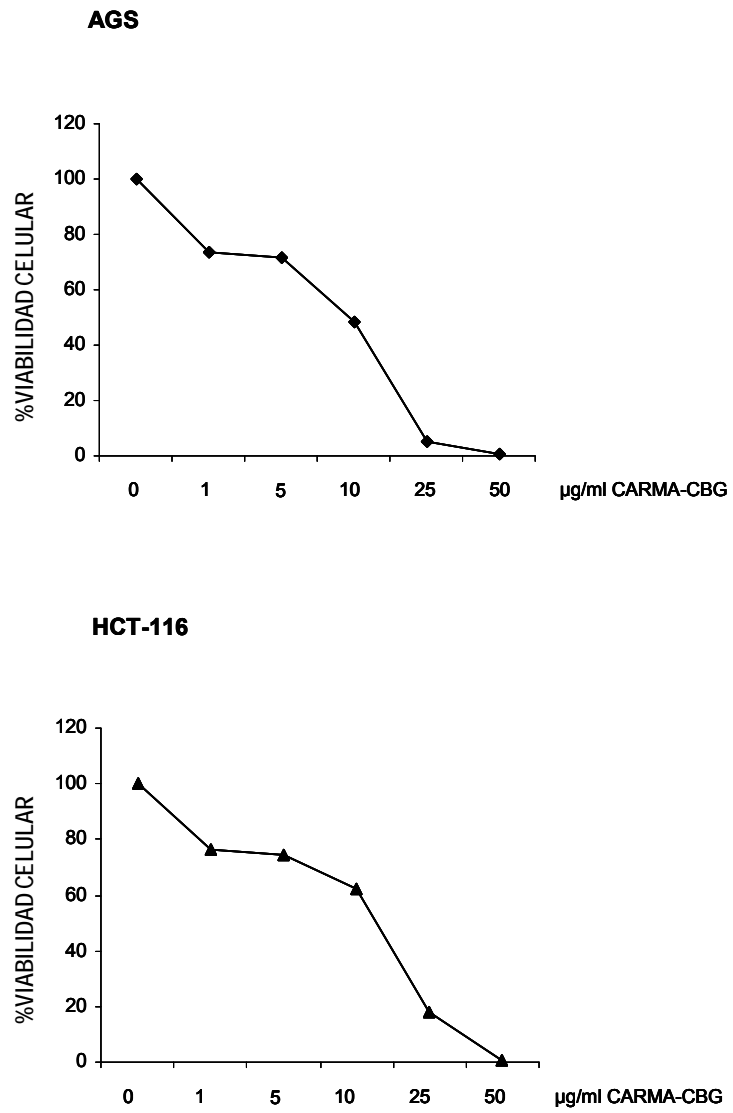
FIG.4



**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**

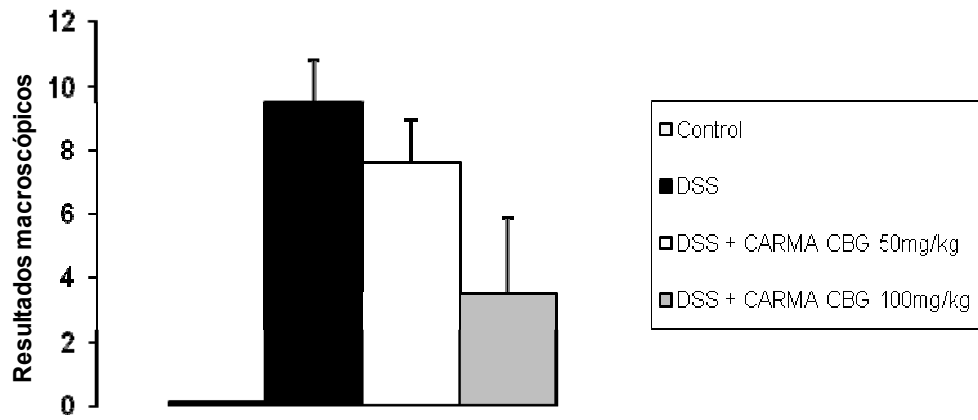


FIG. 8

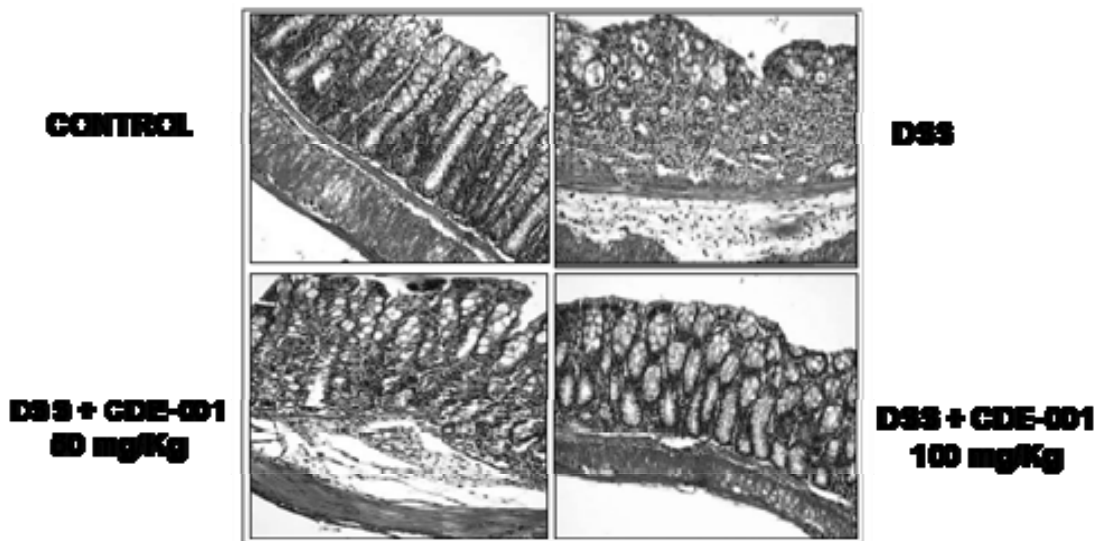


FIG. 9

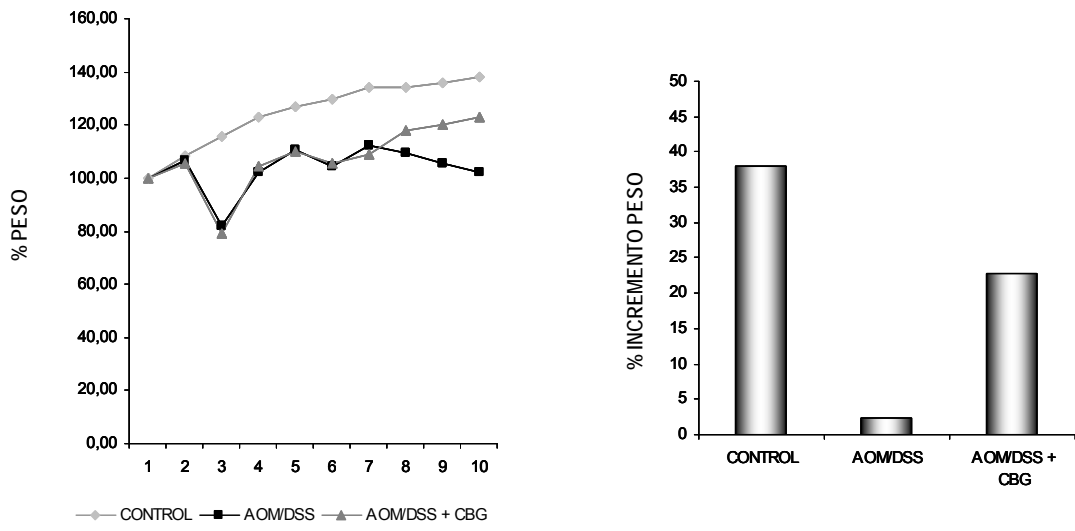


FIG. 10

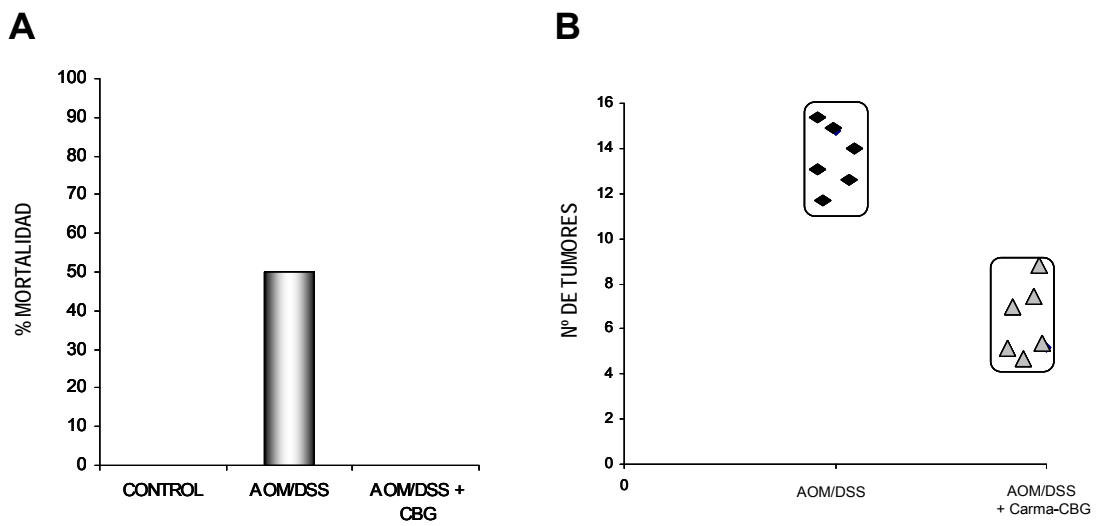


FIG.11

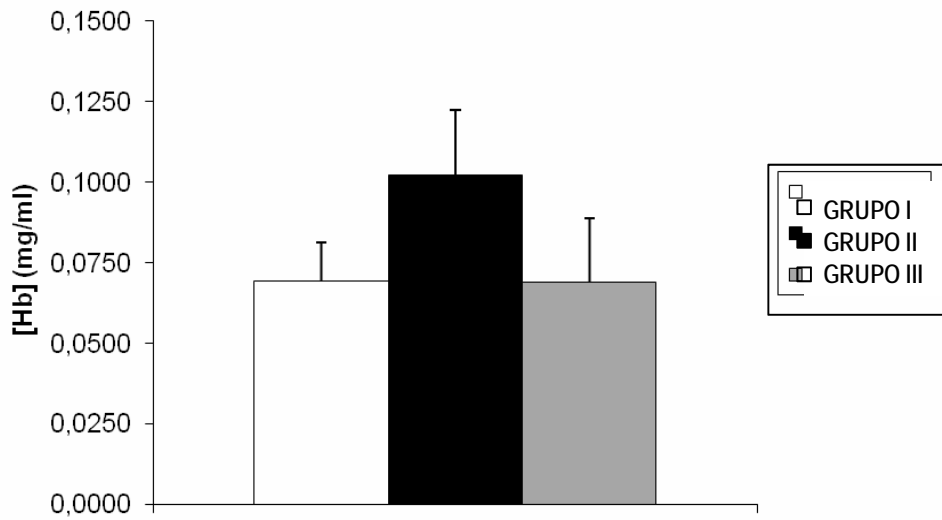


FIG.12

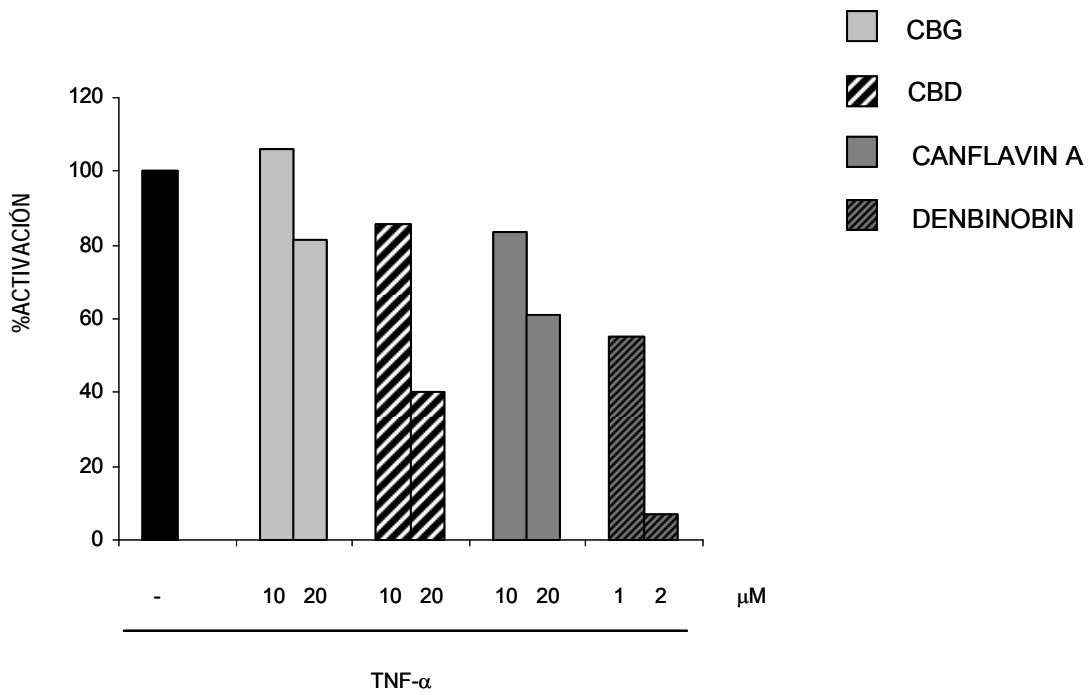


FIG.13

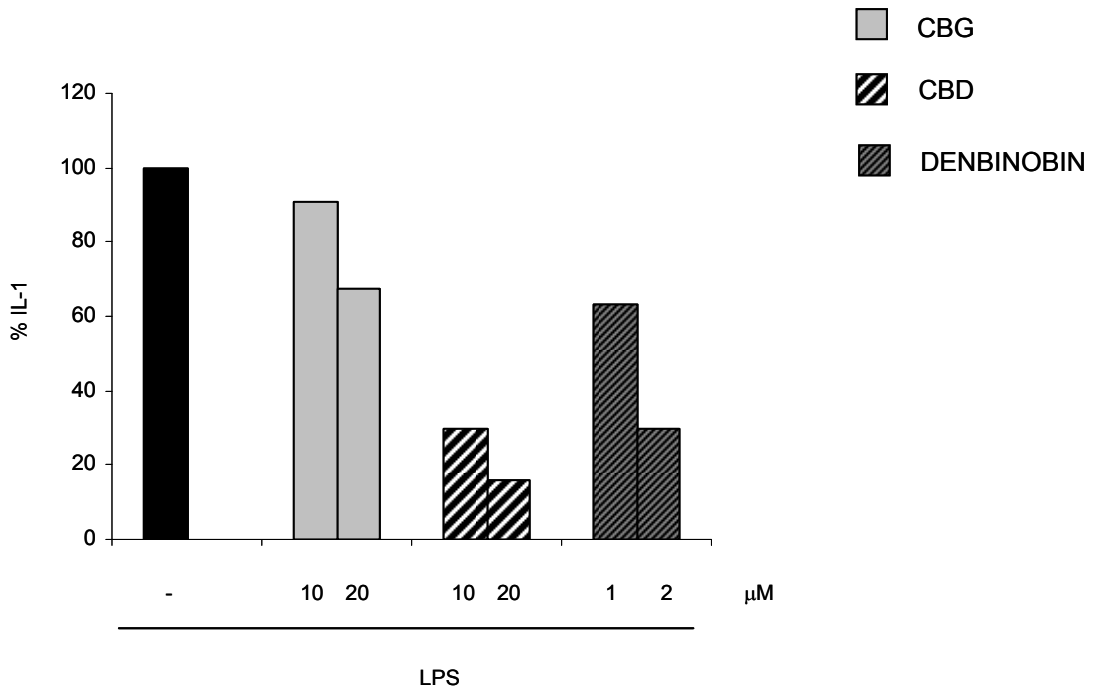


FIG.14

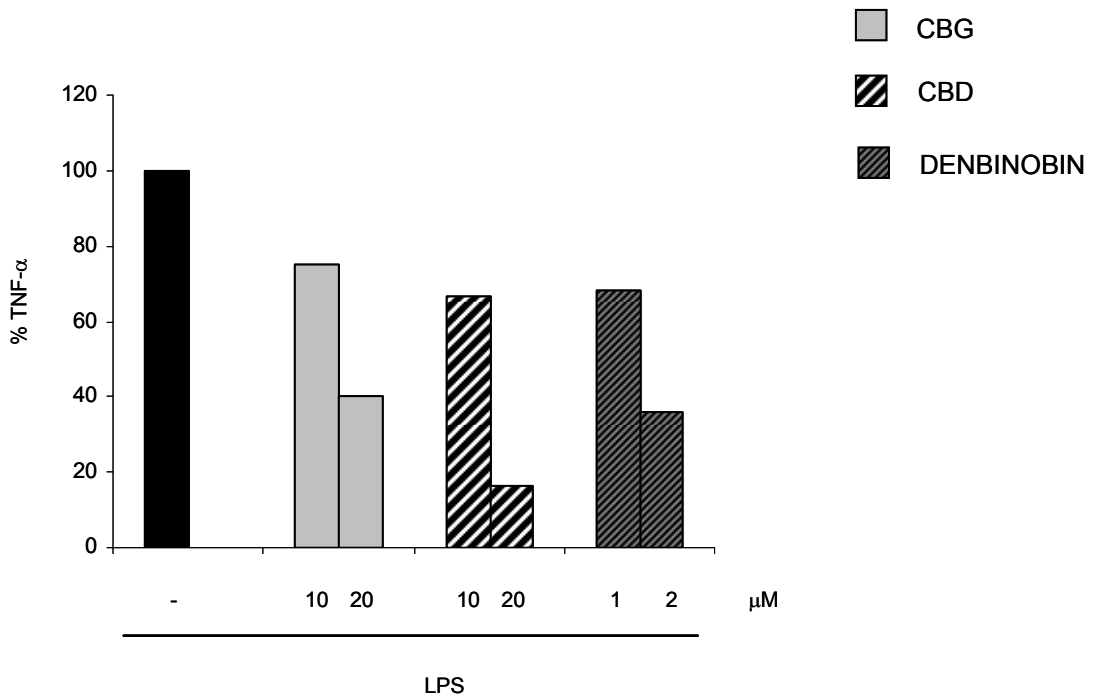


FIG.15

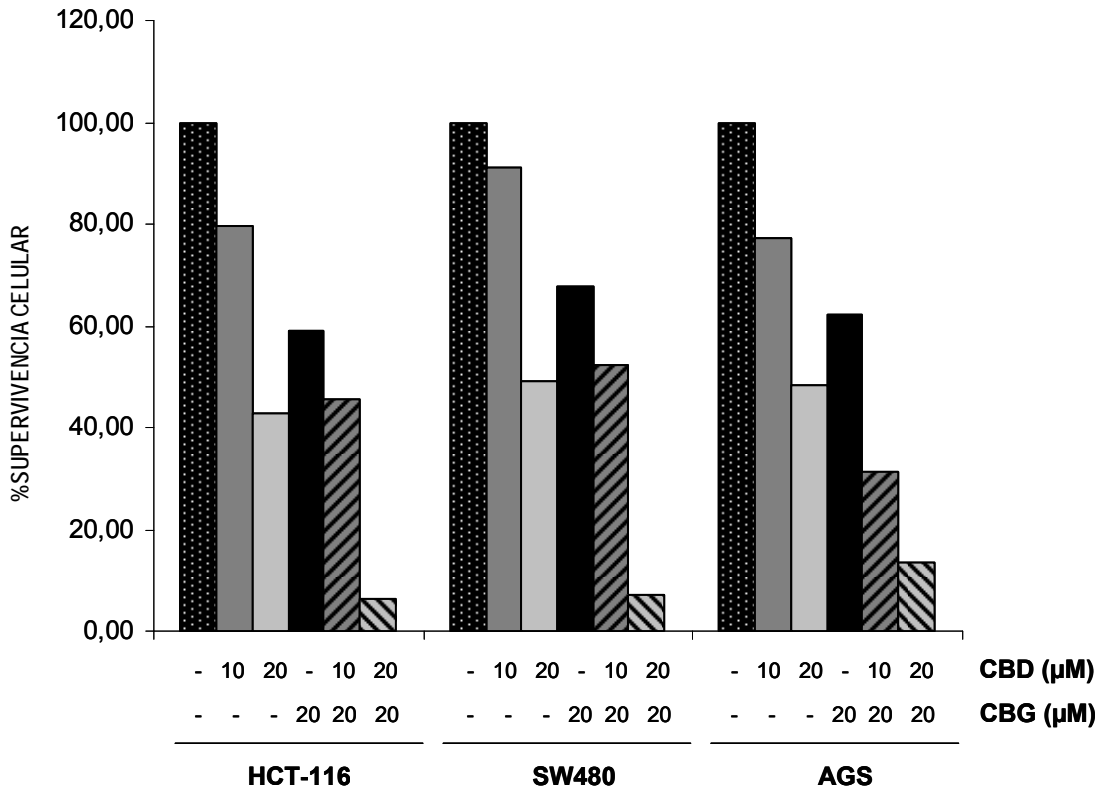


FIG.16



## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

### Documentos de patente citados en la descripción

- DE 566 [0005]
- DE 662663 [0005]
- WO 9952524 A [0005]
- US 6403126 B1 [0010]

### Literatura no patente citada en la descripción

- GUZMAN M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer.*, October 2003, vol. 3 (10), 745-55 [0002]
- BLAZQUEZ C ; CASANOVA ML ; PLANAS A ; DEL PULGAR TG ; VILLANUEVA C ; FERNANDEZ-ACENERO MJ ; ARAGONES J ; HUFFMAN JW ; JORCANO JL ; GUZMAN M. Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J.*, March 2003, vol. 17 (3), 529-31 [0002]
- KOGAN NM. Cannabinoids and cancer. *Mini Rev Med Chem.*, October 2005, vol. 5 (10), 941-52 [0002]
- LIGRESTI A ; MORIELLO AS ; STAROWICZ K ; MATIAS I ; PISANTI S ; DE PETROCELLIS L ; LAEZZA C ; PORTELLA G ; BIFULCO M ; DI MARZO V. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther.*, September 2006, vol. 318 (3), 1375-87 [0002]
- STERN E ; LAMBERT DM. Medicinal chemistry endeavors around the phytocannabinoids. *Chem Biodivers.*, August 2007, vol. 4 (8), 1707-28 [0002]
- KULKARNI-NARLA A ; BROWN DR. Localization of CB1-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system. *Cell Tissue Res.*, October 2000, vol. 302 (1), 73-80 [0003]
- MATHISON R ; HO W ; PITTMAN QJ ; DAVISON JS ; SHARKEY KA. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br J Pharmacol.*, August 2004, vol. 142 (8), 1247-54 [0003]
- MASSA F ; MARSICANO G ; HERMANN H ; CANNICH A ; MONORY K ; CRAVATT BF ; FERRI GL ; SIBAEV A ; STORR M ; LUTZ B. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest.*, April 2004, vol. 113 (8), 1202-9 [0003]
- KLEIN TW ; NEWTON CA. Therapeutic potential of cannabinoid-based drugs. *Adv Exp Med Biol.*, 2007, vol. 601, 395-413 [0003]
- *Cannabis sativa L. Experientia*, 1986, vol. 42 (4), 452-3 [0004] [0005]
- *Biochem Pharmacol*, 1985, vol. 34 (11), 2019-24 [0004]
- *Subcell Biochem.*, 2007, vol. 42, 193-212 [0004]
- *World J Gastroenterol*, 2005, vol. 11 (20), 3040-5 [0006]
- *J Biomed Sci*, 2005, vol. 12 (1), 113-21 [0006]
- LEE YH ; PARK JD ; BAEK NL ; KIM SL ; AHN BZ. In vitro and in vivo antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Med*, 1995, vol. 61, 178-180 [0006]
- KROHN, K. ; LOOCKA, U. ; PAAVILAINENA, K. ; HAUSENB, B.M. ; SCHMALLEC HW ; KIESELED H. Synthesis and electrochemistry of annoquinone-A, cypripedin methyl ether, denbinobin and related 1,4-phenanthrenequinones. *ARKIVOC*, 2001, vol. i, 88-130 [0006]
- SÁNCHEZ-DUFFHUES, G. ; CABALLERO, F.J. ; CALZADO, M.A. ; MAXIA, L. ; APPENDINO, G ; SCHMITZ, L. ; MUÑOZ E. El denbinobin aislado del *Cannabis sativa* es un potente inhibidor de la replicación del VIH-1 por actuar sobre la ruta de NF-κB. *7a Reunion Anual. Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides*, 2006 [0006]
- KARIN M ; GRETEN FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.*, October 2005, vol. 5 (10), 749-59 [0007]
- CHUNG DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology*, 2000, vol. 119, 854-865 [0007]
- Ekbohm A. *Risk of cancer in ulcerative colitis*. *J. Gastroenterol. Surg.*, 1998, vol. 2, 312-313 [0007]
- *Inflamm Bowel Dis*, 2002, vol. 8 (3), 201-12 [0007]
- *Oncogene*, 2001, vol. 20 (7), 819-27 [0007]
- *N Engl J Med*, 2000, vol. 342 (26), 1960-8 [0007]
- *Nat Rev Drug Discov*, 2004, vol. 3 (1), 17-26 [0008]
- *Cell*, 2004, vol. 118 (3), 285-96 [0009]
- Kuo-Ching Yang ; Yih-Huei Uen ; Fat-Moon Suk ; Yu-Chih Liang ; Ying-Jan Wang ; Yuan-Soon Ho ; I-Hsuan Li ; Shyr-Yi Lin. Molecular mechanisms of denbinobin-induced antitumorigenesis effect in colon cancer cells. *World J Gastroenterol*, 2005, vol. 11 (20), 3040-3045 [0010]

- **SANCHO R ; CALZADO MA ; DI MARZO V ; APPENDINO G ; MUNOZ E.** Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. *Mol Pharmacol.*, February 2003, vol. 63 (2), 429-38 [0038] [0040]
- **APPENDINO G ; OTTINO M ; MARQUEZ N ; BIANCHI F ; GIANA A ; BALLERO M ; STERNER O ; FIEBICH BL ; MUNOZ E.** Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *J Nat Prod.*, April 2007, vol. 70 (4), 608-12 [0038]
- **APPENDINO G ; MAXIA L ; BASCOPE M ; HOUGHTON PJ ; SANCHEZ-DUFFHUES G ; MUNOZ E ; STERNER O.** A meroterpenoid NF-kappaB inhibitor and drimane sesquiterpenoids from *Asafetida*. *J Nat Prod.*, July 2006, vol. 69 (7), 1101-4 [0038]
- **MARQUEZ N ; SANCHO R ; BEDOYA LM ; ALCAMI J ; LOPEZ-PEREZ JL ; FELICIANO AS ; FIEBICH BL ; MUNOZ E.** Mesuol, a natural occurring 4-phenylcoumarin, inhibits HIV-1 replication by targeting the NF-kappaB pathway. *Antiviral Res.*, June 2005, vol. 66 (2-3), 137-45 [0038]
- **NEURATH MF ; FUSS I ; SCHURMANN G ; PETERSSON S ; ARNOLD K ; MULLER-LOBECK H ; STROBER W ; HERFARTH C ; BUSCHENFELDE KH.** Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci.*, 17 November 1998, vol. 859, 149-59 [0049]
- **SUZUKI R ; KOHNO H ; SUGIE S ; NAKAGAMA H ; TANAKA T.** Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, January 2006, vol. 27 (1), 162-9 [0052]