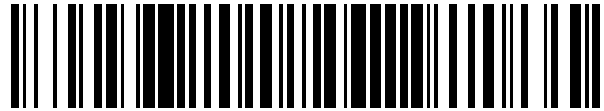


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 137**

21 Número de solicitud: 201330884

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

13.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.12.2014

71 Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (100.0%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla ES

72 Inventor/es:

PÉREZ SIMON, José Antonio y
BARBADO GONZÁLEZ, M^a Victoria

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Agentes para tratar el mieloma múltiple**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso de compuestos de naturaleza cannabinoide para inhibir la viabilidad a dosis crecientes de líneas celulares del mieloma. Adicionalmente, estos mismos compuestos han demostrado no afectar, en términos de viabilidad y proliferación, las células CD34+ (progenitores hematopoyéticos normales). Por lo tanto, esta invención abre las puertas a la utilización de compuestos de naturaleza cannabinoide como una terapia prometedora frente al mieloma múltiple y enfermedades relacionadas.

ES 2 525 137 A2

DESCRIPCIÓN

Agentes para tratar el mieloma múltiple

Campo de la invención

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la farmacia, y se refiere al uso de agentes cannabinoides para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de gammapatías monoclonales en general, y en particular para el tratamiento del mieloma múltiple.

Antecedentes de la invención

El mieloma múltiple (MM) es una hemopatía maligna caracterizada por una proliferación clonal de células plasmáticas

La tasa de incidencia del MM es de 4-5 por 100.000 habitantes y año. La edad de aparición se sitúa alrededor de los 65 años y aunque en los últimos años se ha expandido el arsenal terapéutico con el desarrollo de nuevas moléculas como los inhibidores de proteosomas o los fármacos inmunomoduladores (IMiDs), que se han venido a sumar a los tratamientos clásicos como melfalán y prednisona, además del trasplante de progenitores hematopoyéticos, el MM es considerado aún una enfermedad incurable.

Así, con los tratamientos disponibles hasta la fecha, la supervivencia a cinco años para el MM es aún baja, especialmente si se compara con otros tipos de cáncer. Por esta razón, existe la necesidad de proporcionar tratamientos alternativos a los actuales.

Breve descripción de la invención

Un primer aspecto de la invención, se refiere al uso de un agente cannabinoide en la elaboración de un medicamento para prevención y/o el tratamiento de una gammapatía monoclonal. En una realización preferida, la gammapatía monoclonal se selecciona de la lista que consiste en mieloma múltiple, leucemia de células

plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström y amiloidosis. En una realización aún más preferida, la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el agente cannabinoide se selecciona de entre agentes cannabinoides naturales o agentes
5 cannabinoide sintéticos. En otra realización preferida, el agente cannabinoide sintético se selecciona de entre un agonista del receptor CB1, un agonista del receptor CB2, o un agonista mixto.

En otra realización más preferida, el agente cannabinoide sintético se selecciona de la lista que consiste en: HU-308 ; JWH-133; L-759, 633; PRS 211,375; AM-1241;
10 JWH-015; L-759, 656; GW-842, 166X; GP-1 a; THC (tetrahidrocannabinol); HU-210; L-759, 656; WIN 55,212-2; CP 55940; CRA-13; SAB-378; JWH-018 (AM-678); CP 50,556-1 (levonantradol); cannabidiol+THC, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente, el agente cannabinoide es el WIN 55,212-2.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el agente
15 cannabinoide es natural y se selecciona de la lista que consiste en: agentes tipo cannabigerol (CBG), agentes tipo cannabicromeno (CBC), agentes tipo cannabidiol (CBD), agentes tipo cannabinodiol (CBND), agentes tipo tetrahidrocannabinol (THC), agentes tipo cannabinol (CBN), agentes cannabitriol (CBT), agentes cannabielsoin (CBE), agentes isocannabinoides, agentes tipo cannabicitrol (CBL), agentes tipo
20 cannabicitran (CBT), agentes tipo cannabicromanona (CBCN), o cualquiera de sus combinaciones.

Así, en otra realización preferida del primer aspecto de la invención el agente cannabinoide natural es un agente del tipo cannabigerol (CBG), que se selecciona de la lista que consiste en: cannabigerol (**E**)-**CBG-C₅**; cannabigerol monometil eter
25 (**E**)-**CBGM-C₅ A**; ácido cannabinerolico A (**Z**)-**CBGA-C₅ A**; cannabigerovarina (**E**)-**CBGV-C₃**; ácido cannabigerolico A (**E**)-**CBGA-C₅ A**; ácido cannabigerolico A monometil éter (**E**)-**CBGAM-C₅ A**; ácido cannabigerovarínico A (**E**)-**CBGVA-C₃ A**, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención el agente
30 cannabinoide natural es un agente del tipo tipo cannabicromeno (CBC), que se selecciona de la lista que consiste en: (±)-cannabicromeno **CBC-C₅**; (±)-ácido

cannabicromenico A **CBCA-C₅ A**; (±)-cannabicromevarina **CBCV-C₃**; (±)-ácido cannabichromevarinico A **CBCVA-C₃ A**, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida el agente cannabinoide natural es un agente del tipo cannabidiol (CBD), que se selecciona de la lista que consiste en: (-)-cannabidiol **CBD-C₅**; cannabidiol momometil eter **CBDM-C₅**; cannabidiol-C₄ **CBD-C₄**; (-)-cannabidivarina **CBDV-C₃**; cannabidiorcol **CBD-C₁**; ácido cannabidiolico **CBDA-C₅**; ácido cannabidivarinico **CBDVA-C₃**, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida el agente cannabinoide natural es un agente del tipo cannabinodiol (CBND), que se selecciona de la lista que consiste en: cannabinodiol **CBND-C₅**; cannabinodivarina **CBND-C₃**, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida el agente cannabinoide natural es un agente del tipo tetrahidrocannabinol (THC), que se selecciona de la lista que consiste en: Δ^9 -Tetrahidrocannabinol **Δ^9 -THC-C₅** ; Δ^9 Tetrahidrocannabinol-C₄ **Δ^9 -THC-C₄** ; Δ^9 -Tetrahidrocannabivarina **Δ^9 -THCV-C₃** ; Δ^9 -Tetrahidrocannabiorcol **Δ^9 -THCO-C₁** ; Δ^9 -Tetrahidrocannabinolic acid A **Δ^9 -THCA-C₅ A**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabinolico B **Δ^9 -THCA-C₅ B**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabinolico -C₄ A y/o B **Δ^9 -THCA-C₄ A y/o B**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabivarinico A **Δ^9 -THCVA-C₃ A**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabiorcolico A y/o B **Δ^9 -THCOA-C₁ A y/o B**; (-)- Δ^8 -*trans* (6aR,10aR)- Δ^8 -Tetrahidrocannabinol **Δ^8 -THC-C₅**; (-)- Δ^8 -*trans*-(6aR,10aR)-ácido tetrahidrocannabinolico A **Δ^8 -THCA-C₅ A**; (-)-(6aS,10aR)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol **(-)-cis- Δ^9 -THC-C₅**, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida el agente cannabinoide natural es un agente del tipo cannabinol (CBN), que se selecciona de la lista que consiste en: cannabinol **CBN-C₅**; cannabinol-C₄ **CBN-C₄**; cannabivarin **CBN-C₃**; cannabinol-C₂ **CBN-C₂**; cannabiorcol **CBN-C₁**; ácido cannabinolico A **CBNA-C₅ A**; cannabinol metil éter **CBNM-C₅**, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida el agente cannabinoide natural es un agente del tipo cannabitriol (CBT), que se selecciona de la lista que consiste en: (-)-(9R,10R)-*trans*-cannabitriol **(-)-trans-CBT-C₅**; (+) (9S,10S)-Cannabitriol **(+)-trans-CBT-C₅**; (±)-(9R,10S/9S,10R)-Cannabitriol **(±)-cis-CBT-C₅**; (-)-(9R,10R)-*trans*-10-O-Ethyl-cannabitriol **(-)-trans-CBT-OEt-C₅**; (±)-(9R,10R/9S,10S)-Cannabitriol-C₃ **(±)-trans-**

Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende uno de los agentes cannabinoides descritos en la presente invención, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una gammapatía monoclonal. Más preferiblemente, la gammapatía monoclonal se selecciona de la lista que consiste en: mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström y amiloidosis. En una realización aún más preferida, la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

Más preferiblemente, la composición del segundo aspecto de la invención además comprende otro principio activo. Aún más preferiblemente el principio activo se selecciona de la lista que consiste en: Velcade, Melfalan, Prednisona, Revlimd, Dexametasona, Talidomida, Doxirrubicina, Bortezomid, Mozobil, factor estimulante de colonias de granulocitos, pomailidomida, carfizomid, o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente la composición farmacéutica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una preparación combinada que comprende un agente cannabioide de la invención y otro principio activo, en la elaboración de un medicamento para su administración combinada, simultánea o secuencial, para el tratamiento de una gammapatía monoclonal. Más preferiblemente, la gammapatía monoclonal se selecciona de entre el mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida, la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple. Aún más preferiblemente el principio activo se selecciona de entre Velcade, Melfalan, Prednisona, Revlimd, Dexametasona, Talidomida, Doxirrubicina, Bortezomid, Mozobil, factor estimulante de colonias de granulocitos, pomailidomida, carfizomid, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, la preparación combinada de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la preparación combinada de la invención además comprende otro principio activo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: La línea celular de mieloma U266 fue incubada a las concentraciones indicadas con el cannabinoide WIN, 55-212,2 durante 48h y la viabilidad celular fue determinada mediante la metabolización de MTT. Los valores medios de proliferación de los cultivos celulares control no-tratados se tomaron como 100%.

5 Los datos corresponden a las medias +/- la desviación estándar de los triplicados de cada uno de los 4 ensayos realizados. La viabilidad celular de U266 disminuye significativamente ($p < 0.05$) a concentraciones de 10uM y 20uM hasta un 40%, mientras que a concentraciones de 50uM la inhibición de la viabilidad celular alcanza un 60%.

10 **Figura 2:** Está figura desarrolla las datos ejemplificados en la figura 1 y muestra como a tiempos de incubación más largos, 96h, la disminución de la viabilidad celular alcanza un 80% a concentraciones de 50uM.

Figura 3: La viabilidad celular de la línea U266 tras el tratamiento durante 48h con el agente cannabinoide fue determinada también por citometría de flujo mediante el marcaje con 7AAD. Los resultados obtenidos fueron similares a los detectados con el ensayo de MTT. Como se observa en la figura el cannabinoide ejerce efecto citotóxico en las células a partir de concentraciones de 10uM, y esta reducción de viabilidad celular es significativa ($p < 0.05$) según el análisis estadístico t de Student.

15 **Figura 4:** La línea celular de mieloma MM1.S fue incubada a concentraciones crecientes con el cannabinoide WIN, 55-212,2 y la viabilidad celular fue determinada mediante la metabolización de MTT. Los valores medios de proliferación de los cultivos celulares control no-tratados se tomaron como 100%. Los datos corresponden a las medias +/- la desviación estándar de los triplicados de cada uno de los 4 ensayos realizados. A tiempos de incubación de 48h, La viabilidad celular de la línea MM1.S disminuyó notablemente a partir de concentraciones de 10uM, 20uM y 50uM, con una citotoxicidad superior al 50%.

20 **Figura 5:** Está figura desarrolla los datos ejemplificados en la figura 4 y muestra que cuando la línea celular es tratada con el cannabinoide durante tiempos de incubación más largos (96h), la viabilidad celular también se ve afectada a las mismas dosis de WIN, 55-212,2, no obstante esta disminución es menor que a tiempos cortos de incubación.

Figura 6: Las células CD34+, progenitores hematopoyéticos (A) fueron aislados a partir de sangre periférica, y la citotoxicidad del WIN se determinó por el ensayo de MTT tras 18h de incubación. Los cultivos primarios de médula ósea fueron incubados durante 18h con el cannabinoide a las mismas concentraciones utilizadas en los ensayos anteriores. La población de células polimorfonucleadas (B) fue identificada con anti-CD64, y se observó que la viabilidad celular de esta población determinada mediante el marcaje con 7AAD no era afectada por el cannabinoide. Tras el tratamiento ex vivo durante 18h con el agente cannabinoide, observamos que la población de linfocitos (C) en el cultivo primario de la médula ósea, CD45+, ve afectada su viabilidad celular a la concentración de 50 uM, disminuyendo ésta en un 40%. Sin embargo la población de células plasmáticas (D) se reduce drásticamente tras la incubación a dosis de 20uM y 50uM, reduciéndose en este último caso más de un 80% la viabilidad celular de esta población.

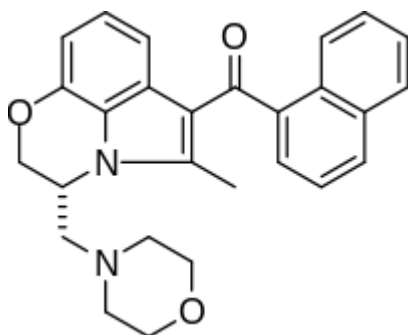
15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia que se caracteriza por la proliferación clonal de células plasmáticas malignas en la médula ósea y se asocia con presencia de componente monoclonal o proteína M en sangre y/o suero.

Con el objetivo de lograr una terapia eficaz frente a esta enfermedad, los autores de la presente invención han llegado al sorprendente hallazgo que compuestos de naturaleza cannabinoide son capaces de inhibir la viabilidad a dosis crecientes de líneas celulares del mieloma, mientras que las células CD34+ (progenitores hematopoyéticos normales), los granulocitos y los linfocitos no se ven afectados en términos de viabilidad y proliferación. Por lo tanto, esta invención abre las puertas a la utilización de compuestos de naturaleza cannabinoide como una terapia prometedora frente al mieloma múltiple y enfermedades relacionadas.

Para llevar a cabo el presente hallazgo, los autores de la presente invención valoraron si el compuesto cannabinoide denominado **WIN 55,212-2** con la siguiente fórmula química (R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morpholinylmethyl)pirrolo[1,2,3-de]-1,4 benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetanona, número CAS 131543-23-2, y estructura (I):

Estructura (I)



5

era capaz de inhibir la viabilidad de líneas celulares establecidas de mieloma tales como la línea celular de mieloma U266 y la línea celular del mieloma múltiple MM1.S. Se hace notar que el compuesto WIN 55,212-2 es un agonista inespecífico de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.

10

Para determinar el efecto del compuesto cannabinoide WIN 55,212-2, se incubó la línea celular de mieloma U266 durante un periodo de 48 y 96 horas con concentraciones crecientes de WIN 55,212-2 entre 0.5 y 50uM, la viabilidad celular fue determinada mediante la metabolización de MTT. El ensayo de MTT esta basado en la capacidad de las enzima mitocondrial, succinato-deshidrogenasa de células viables para transformar la sal de tetrazolio MTT en un producto de color azul, el MTT formazán, que es proporcional al número de células vivas presentes. Los valores medios de proliferación de los cultivos celulares control no-tratados se tomaron como 100%.

15

Tal y como se puede observar en la figura 1, concentraciones entre 10 y 20uM del compuesto WIN 55,212-2 fueron capaces de inhibir la viabilidad celular en aproximadamente un 40% y concentraciones de 50uM produjeron una inhibición de aproximadamente el 60% de la viabilidad celular, Adicionalmente, tal y como se refleja en la figura 2, periodos más largos de incubación, en concreto de 96 horas, produjeron una inhibición de la viabilidad celular de aproximadamente un 80% a concentraciones de 50uM.

20

Estos mismos ensayos se repitieron incubando la línea celular de mieloma U266 durante un periodo de 48 horas con concentraciones crecientes de WIN 55,212-2 entre 0.5 y 50uM. No obstante, la viabilidad celular se determinó mediante citometría de flujo en vez de mediante la metabolización de MTT, los resultados se ilustran en

25

la figura 3 y tal y como se puede observar éstos son muy similares a los ya expuestos anteriormente en las figuras 1 y 2.

Por lo tanto, a raíz de los resultados expuestos en las figuras 1 a 3, se puede determinar claramente cómo la viabilidad celular de líneas celulares establecidas de mieloma disminuye significativamente ($p < 0.05$) a concentraciones superiores a 10uM tanto a 48 horas como a tiempos de incubación más largos.

Con el objetivo de verificar los anteriores datos, los autores de la presente invención analizaron la capacidad del compuesto WIN 55,212-2 para inhibir la viabilidad de una segunda línea celular del mieloma, en este caso la línea celular del mieloma múltiple MM1.S. Los resultados de estos experimentos han quedado fielmente reflejados en las figuras 4 y 5.

En este sentido, para llevar a cabo estos ensayos los autores incubaron la línea celular de mieloma MM1.S a diferentes concentraciones con el agente cannabinoide WIN, 55-212,2 durante 48 y 96 horas, y la viabilidad celular fue determinada mediante la metabolización de MTT. Los valores medios de proliferación de los cultivos celulares control no-tratados se tomaron como 100%. Los datos corresponden a las medias +/- la desviación estándar de los triplicados de cada uno de los 4 ensayos realizados. Tal y como se puede observar en las figuras 4 y 5 la viabilidad celular disminuyó notablemente a partir de concentraciones superiores a 1uM cuando las células MM1.S fueron incubadas durante 48 horas. También se reduce la viabilidad celular tras 96 horas de exposición al fármaco a las mismas concentraciones. De estos datos se puede deducir que la línea celular MM1.S es más sensible al WIN 55,212-2, que la línea celular U266. Estos datos permiten afirmar la potencialidad del compuesto WIN 55,212-2, como terapia efectiva frente al tratamiento del mieloma múltiple y de enfermedades relacionadas.

Por último, los autores de la presente invención evaluaron la toxicidad del agente cannabinoide WIN 55,212-2, lo cual se determinó en términos de viabilidad celular mediante dos tipos de ensayos, uno basado en la reducción del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), y otro basado en la interacción de la 7AAD. Se utilizaron cultivos primarios de células mononucleadas obtenidas a partir de sangre periférica de donantes sanos (progenitores hematopoyéticos CD 34+) y de

médula ósea de pacientes de mieloma múltiple (CD64+, granulocitos (B), CD45+, linfocitos (C) y CD38+, células plasmáticas (D)).

Las células hematopoyéticas progenitoras CD34+ se aislaron a partir de aféresis de donantes sanos por métodos inmunomagnéticos. Para ello las células se incubaron 5 30 min a 4°C con microesferas magnéticas unidas al anticuerpo anti-CD34. Posteriormente las células fueron seleccionadas mediante un separador inmunomagnético, y posteriormente cultivadas en placas multi-pocillo a una densidad celular de millón de células por mililitro de medio RPMI suplementado más 20% suero bovino fetal (SBF).

10 Las células plasmáticas, granulocitos y linfocitos fueron obtenidas de muestras de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple tras lisis hipotónica con cloruro de amonio (0,16 M en Tris 0,17 M, pH 7,6) durante 10 min a temperatura ambiente, con el fin de eliminar la población celular de eritrocitos. La suspensión celular resultante de la lisis, que sólo contiene las células mononucleadas, se sembró en placas multi-15 pocillo a la misma densidad celular que las células progenitoras utilizando medio RPMI suplementado más 20% suero bovino fetal.

Los cultivos primarios fueron incubados en presencia y ausencia del agente cannabinoide WIN 55, 212-2 a diferentes concentraciones. El rango de concentraciones ensayado con el agente WIN 55, 212-2 fue de 0.5-50 micromolar.

20 Los tiempos de incubación de los cultivos primarios en presencia o ausencia del agente cannabinoide fueron de 12 ó 18 horas.

Tal y como se puede observar claramente en las figuras 6A-6D la viabilidad celular no fue afectada en las poblaciones de progenitores hematopoyéticos (A) y de granulocitos (B). En la población de linfocitos (C) sólo se detectó pérdida de 25 viabilidad a la dosis más alta. Sin embargo, WIN produjo una drástica reducción de la viabilidad celular de las células plasmáticas (D) cuando son tratadas a dosis superiores a 10uM.

Estos resultados demuestran que la utilización de compuestos agonistas de los receptores cannabinoides CB1 y/o CB2, particularmente WIN 55, 212-2, no sólo 30 presentan citotoxicidad frente a líneas celulares establecidas de mieloma sino que estos compuestos presentan un bajo perfil de toxicidad lo que abre las puertas hacia su utilización como una terapia prometedora frente al mieloma múltiple y

enfermedades relacionadas. Así, un agente agonista del receptor CB1, un agonista del receptor CB2, o un agonista mixto se puede utilizar en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una gammapatía monoclonal, particularmente para la prevención y/o el tratamiento del mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström y amiloidosis.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de un agente de naturaleza cannabinoide en la elaboración de un medicamento para prevención y/o el tratamiento de una una gammapatía monoclonal. En una realización preferida, la gammapatía monoclonal se selecciona de la lista que consiste en: mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström y amiloidosis.

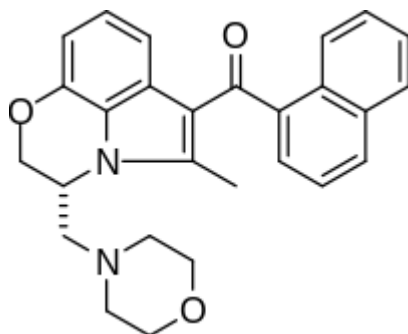
En otra realización preferida, el agente cannabinoide se selecciona de entre agentes cannabinoides naturales o agentes cannabinoides sintéticos. En otra realización preferida, el agente de naturaleza cannabinoide se selecciona de entre un agonista del receptor CB1, un agonista del receptor CB2, o un agonista mixto.

En otra realización más preferida, el agente cannabinoide sintético se selecciona de la lista que consiste en: HU-308; L-759, 633; PRS 211,375; AM-1241; 2-(3-metilciclohexil)-5-(1, 1'-dimetilheptil)-resorcinol isómeros (0 a 1,797 y 0-1798); 2 - (3R-metilciclohexil) -5 - (1,-dimetilheptil)-resorcinol (0 - 1826); bicíclicos derivados hidroxilo resorcinol; 1-{4 - (1, 1-Dimeitil-heptil) -2,6-dimetoxi-fenil}-3-metil-ciclohexanol (0 a 2137, 0-1966, 0-1967); JWH-015; L-759, 656; GW-842, 166X; GP-1 a; THC; HU-210; L-759, 656; WIN 55,212-2; CP 55940; CRA-13 (SAB-378); JWH-018 (AM-678) CP 50,556-1 (levonantradol), cannabidiol+THC, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente, el agente cannabinoide es WIN 55,212-2.

En esta memoria se entiende por WIN 55,212-2 un compuesto que tienen como fórmula química IUPAC (International Union of Puré and Applied Chemistry) (R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morpholinylmethyl)pirrolo[1,2,3-de]-1,4 benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetanona, número CAS 131543-23-2, y fórmula (I):

Fórmula (I)



5

o cualesquiera sales, solvatos y prodrogas farmacéuticamente aceptables de dicho compuesto.

- 10 El término “sales o solvatos farmacéuticamente aceptables” se refiere a cualquier sal, éster, solvato farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, en su administración, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal y como los descritos en el presente documento. No obstante, se observará que las sales farmacéuticamente inaceptables también caen dentro del alcance de la
- 15 invención, ya que éstas pueden ser útiles para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, prodrogas y derivados puede ser llevada a cabo mediante métodos conocidos en el estado de la técnica.

- Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos proporcionados en el presente documento son sintetizadas a partir del compuesto de
- 20 la invención, mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales son preparadas, por ejemplo, reaccionando las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos. En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol,
- 25 isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de las sales de adición ácidas incluyen sales de adición de ácidos minerales tales como, por ejemplo, hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluensulfonato.

Ejemplos de sales de adición alcalinas incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales alcalinas orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, glucamina y sales aminoácidas básicas.

- 5 Derivados o prodrogas especialmente preferidos son aquellos que incrementan la biodisponibilidad de los compuestos de la invención cuando estos compuestos son administrados al sujeto (por ejemplo, permitiendo que un compuesto administrado oralmente sea absorbido más rápidamente a la sangre) o que mejoran el suministro del compuesto a un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema
10 linfático) respecto al compuesto inicial.

En otra realización preferida, el agente cannabinoide es natural, y se selecciona de la lista que consiste en: agentes tipo cannabigerol (CBG), agentes tipo cannabicromeno (CBC), agentes tipo cannabidiol (CBD), agentes tipo cannabiniol (CBND), agentes tipo tetrahidrocannabinol (THC), agentes tipo cannabinol (CBN),
15 agentes cannabitril (CBT), agentes cannabielsoin (CBE), agentes isocannabinoides, agentes tipo cannabicitran (CBT), agentes tipo cannabicitran (CBT), agentes tipo cannabicromanona (CBCN), o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida el agente cannabinoide natural es un agente del tipo cannabigerol (CBG), que se selecciona de la lista que consiste en: cannabigerol
20 **(E)-CBG-C₅**; cannabigerol monometil éter **(E)-CBGM-C₅ A**; ácido cannabigerólico A **(Z)-CBGA-C₅ A**; cannabigerovarina **(E)-CBGV-C₃**; ácido cannabigerólico A **(E)-CBGA-C₅ A**; ácido cannabigerólico A monometil éter **(E)-CBGAM-C₅ A**; ácido cannabigerovarínico A **(E)-CBGVA-C₃ A**, o cualquiera de sus combinaciones.

25 En otra realización más preferida el agente cannabinoide natural es un agente del tipo tipo cannabicromeno (CBC), que se selecciona de la lista que consiste en: (±)-cannabicromeno **CBC-C₅**; (±)-ácido cannabicromenico A **CBCA-C₅ A**; (±)-cannabicromevarina **CBCV-C₃**; (±)-ácido cannabicromevarínico A **CBCVA-C₃ A**, o cualquiera de sus combinaciones.

30 En otra realización más preferida el agente cannabinoide natural es un agente del tipo tipo cannabidiol (CBD), que se selecciona de la lista que consiste en: (-)-cannabidiol **CBD-C₅**; cannabidiol momometil éter **CBDM-C₅**; cannabidiol-C₄ **CBD-C₄**;

(-)-cannabidivarina **CBDV-C₃**; cannabidiol **CBD-C₁**; ácido cannabidiolico **CBDA-C₅**; ácido cannabidivarinico **CBDVA-C₃**, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida donde el agente cannabinoide natural es un agente del tipo tipo cannabinodiol (CBND), que se selecciona de la lista que consiste en:
 5 cannabinodiol **CBND-C₅**; cannabinodivarina **CBND-C₃**, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida el agente cannabinoide natural es un agente del tipo tetrahidrocannabinol (THC), que se selecciona de la lista que consiste en: Δ^9 -Tetrahidrocannabinol **Δ^9 -THC-C₅** ; Δ^9 Tetrahidrocannabinol-C₄ **Δ^9 -THC-C₄** ; Δ^9 -Tetrahidrocannabivarina **Δ^9 -THCV-C₃** ; Δ^9 -Tetrahidrocannabinol **Δ^9 -THCO-C₁** ;
 10 ácido Δ^9 -Tetrahidrocannabinolico A **Δ^9 -THCA-C₅ A**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabinolico B **Δ^9 -THCA-C₅ B**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabinolico -C₄ A y/o B **Δ^9 -THCA-C₄ A y/o B**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabivarinico A **Δ^9 -THCVA-C₃ A**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabinolico A y/o B **Δ^9 -THCOA-C₁ A y/o B**; (-)- Δ^8 -*trans* (6aR,10aR)- Δ^8 -Tetrahidrocannabinol **Δ^8 -THC-C₅**; (-)- Δ^8 -*trans*-(6aR,10aR)-ácido tetrahidrocannabinolico A **Δ^8 -THCA-C₅ A**; (-)-(6aS,10aR)- Δ^9 -tetrahidrocannabinol **(-)-*cis*- Δ^9 -THC-C₅**, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida, el agente cannabinoide natural es un agente del tipo cannabinol (CBN), que se selecciona de la lista que consiste en: cannabinol
 20 **CBN-C₅**; cannabinol-C₄ **CBN-C₄**; cannabivarin **CBN-C₃**; cannabinol-C₂ **CBN-C₂**; cannabiorcol **CBN-C₁**; ácido cannabinolico A **CBNA-C₅ A**; cannabinol metil éter **CBNM-C₅**, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida el agente cannabinoide natural es un agente del tipo cannabitriol (CBT), que se selecciona de la lista que consiste en: (-)-(9R,10R)-*trans*-cannabitriol **(-)-*trans*-CBT-C₅**; (+) (9S,10S)-Cannabitriol **(+)-*trans*-CBT-C₅**; (\pm)-(9R,10S/9S,10R)-Cannabitriol **(\pm)-*cis*-CBT-C₅**; (-)-(9R,10R)-*trans*-10-O-Ethyl-cannabitriol **(-)-*trans*-CBT-OEt-C₅**; (\pm)-(9R,10R/9S,10S)-Cannabitriol-C₃ **(\pm)-*trans*-CBT-C₃**; 8,9-Dihidroxi- $\Delta^{6a(10a)}$ - tetrahidrocannabinol **8,9-Di-OH-CBT-C₅**; ácido cannabidiolico A cannabitriol ester **CBDA-C₅ 9-OH-CBT-C₅ ester**; (-)-(6aR,9S,10S,10aR)- 9,10-Dihidroxi- hexahidrocannabinol, Cannabiripsol **Cannabiripsol-C₅**; (-)-6a,7,10^a Trihidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol **(-)-**

monoclonal se selecciona de la lista que consiste en: mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström y amiloidosis.

Más preferiblemente, la composición además comprende otro principio activo. Aún más preferiblemente el principio activo se selecciona de entre Velcade, Melfalan, Prednisona, Revlimd, Dexametasona, Talidomida, Doxirrubicina, Bortezomid, Mozobil, factor estimulante de colonias de granulocitos, pomailidomida, carfizomid, o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente la composición farmacéutica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de de la invención se refiere al uso de una preparación combinada que comprende un agente cannabinoide de la invención y otro principio activo, en la elaboración de un medicamento para su administración combinada, simultánea o secuencial, para el tratamiento de una gammapatía monoclonal. Más preferiblemente, la gammapatía monoclonal se selecciona de entre el mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida, la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple. Aún más preferiblemente el principio activo se selecciona de entre Velcade, Melfalan, Prednisona, Revlimd, Dexametasona, Talidomida, Doxirrubicina, Bortezomid, Mozobil, factor estimulante de colonias de granulocitos, pomailidomida, carfizomid, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, la preparación combinada de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la preparación combinada de la invención además comprende otro principio activo.

El término “tratamiento”, según se usa en el contexto de esta memoria significa administración de un compuesto según la invención para aliviar o eliminar la patología mencionada anteriormente o reducir o eliminar uno o más síntomas asociados a dicha patología.

El término “tratamiento” también abarca aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad.

El término “prevención”, tal como se usa en la presente invención, se refiere a la capacidad de un compuesto de la invención de prevenir, minimizar o dificultar la aparición o el desarrollo de una enfermedad o estado antes de su aparición.

5 Los compuestos de la invención pueden estar en una forma cristalina como compuestos libres o solvatos y se pretende que ambas formas estén dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente en la técnica. Solvatos adecuados son los solvatos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular el solvato es un hidrato.

10 Los compuestos de la invención o sus sales o solvatos están preferiblemente en forma farmacéuticamente aceptable o en forma substancialmente pura. Como forma farmacéuticamente aceptable se entiende, *inter alia*, que tienen un nivel farmacéuticamente aceptable de pureza, excluyendo aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y excipientes, y sin incluir ningún material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el
15 compuesto de la invención están preferiblemente por encima del 50%, más preferiblemente por encima del 70%, y aún más preferiblemente por encima del 90%. En una realización preferida está por encima del 95% del compuesto de la invención, o de sus sales, solvatos o prodrogas.

20 Los compuestos de la presente invención pueden incluir enantiómeros dependiendo de la presencia de centros quirales o isómeros dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E). Los isómeros, enantiómeros o diastereómeros individuales y mezclas de los mismos están dentro del alcance de la presente invención. Cuando un compuesto se dibuja con estereoquímica explícita, se tiene la intención de representar la estructura racémica con la estereoquímica relativa, así
25 como los enantiómeros en diferentes grados de pureza. En cualquier caso, los enantiómeros y los diastereoisómeros de los compuestos representados con una estereoquímica particular también forman parte de los compuestos de la invención.

Dichas composiciones pueden tener uno o más agentes cannabinoides. Dichos agentes cannabinoides se podrían combinar en proporciones iguales o diferentes, y
30 podrían formar parte de la misma formulación o podrían formularse en formulaciones diferentes para su administración secuencial, conjunta o simultánea.

En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición de la invención además comprende otro principio activo.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se administran por vía tópica, transdérmica, oral, nasal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, enteral o parenteral. Ejemplos ilustrativos de administración tópica o transdérmica incluye, aunque no se limita, iontoforesis, sonoforesis, electroporación, presión mecánica, gradiente de presión osmótica, cura oclusiva, microinyecciones, inyecciones sin agujas mediante presión, parches microeléctricos y cualquier combinación de ellas. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro *"Tratado de Farmacia Galénica"*, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "substancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una formó modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Tanto las composiciones de la presente invención, así como la preparación combinada pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es una enfermedad que cursa con proliferación incontrolada de células plasmáticas en la médula ósea, preferiblemente es un mieloma múltiple.

Tales composiciones o preparaciones combinadas y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de agente o agentes cannabinoides que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada,

entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una forma farmacéutica que comprende un agente cannabinoide se ha descrito en los anteriores aspectos de la invención, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento una gammapatía monoclonal.

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

En otra realización preferida, la preparación combinada de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la preparación combinada de la invención además comprende otro principio activo.

15 Debe enfatizarse que el término "preparación combinada" o también denominada "yuxtaposición", en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición, para poder encontrarse disponibles para su aplicación separada o secuencial. De esta manera, la expresión "yuxtapuesta" implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los
20 componentes.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de
25 la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Materiales y métodos

- Análisis de viabilidad por el ensayo MTT

El procedimiento para la determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT se basa en la capacidad que tienen las células viables de metabolizar el bromuro de 3-(4,5-dimetiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). La reducción metabólica del MTT, por acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, da lugar a la forma insoluble y coloreada llamada formazán que puede ser cuantificado mediante espectocolorimetría. La cantidad de células vivas es proporcional a la densidad óptica resultante.

Tras la incubación con los cannabinoides se añadieron 10 microlitros de MTT a cada pocillo y se incubaron 2-4 horas en las mismas condiciones. Posteriormente se detiene la reacción y se solubiliza el formazán cristalizado y se determinó la densidad óptica a 450nm en un espectofotometro de placas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

- Análisis de viabilidad por citometría de flujo

Para el análisis de la viabilidad mediante citometría de flujo, las células fueron tratadas con anticuerpos monoclonales marcados apropiadamente para la identificación de cada uno de los tipos celulares utilizados. Una vez marcadas, las células fueron expuestas durante 15 min a 7AAD (7-actinomicina D) para evaluar la viabilidad celular y la lectura se realizó en el citómetro y se analizó con el programa informático adaptado al citómetro. Se adquirieron como mínimo 100.000 eventos y se obtuvo la intensidad media de fluorescencia.

- Análisis Estadístico

Los datos obtenidos, en el espectofotómetro de placas y en el citómetro, fueron analizados cuantitativamente comparándolos con el test t-Student utilizando el programa estadístico SPSS. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Ejemplo 2. Citotoxicidad del compuesto cannabinoide WIN 55,212-2 en la línea celular de mieloma U266.

Para determinar el efecto del compuesto cannabinoide WIN 55,212-2, se incubó la línea celular de mieloma U266 durante un periodo de 48 y 96 horas con concentraciones crecientes de WIN 55,212-2 entre 0.5 y 50uM, la viabilidad celular fue determinada mediante la metabolización de MTT. El ensayo de MTT esta

basado en la capacidad de las enzima mitocondrial, succinato-deshidrogenasa de células viables para transformar la sal de tetrazolio MTT en un producto de color azul, el MTT formazán, que es proporcional al número de células vivas presentes. Los valores medios de proliferación de los cultivos celulares control no-tratados se tomaron como 100%.

Tal y como se puede observar en la figura 1, concentraciones entre 10 y 20uM del compuesto WIN 55,212-2 fueron capaces de inhibir la viabilidad celular en aproximadamente un 40% y concentraciones de 50uM produjeron una inhibición de aproximadamente el 60% de la viabilidad celular, Adicionalmente, tal y como se refleja en la figura 2, periodos más largos de incubación, en concreto de 96 horas, produjeron una inhibición de la viabilidad celular de aproximadamente un 80% a concentraciones de 50uM.

Estos mismos ensayos se repitieron incubando la línea celular de mieloma U266 durante un periodo de 48 horas con concentraciones crecientes de WIN 55,212-2 entre 0.5 y 50uM. No obstante, la viabilidad celular se determinó mediante citometría de flujo en vez de mediante la metabolización de MTT, los resultados se ilustran en la figura 3 y tal y como se puede observar éstos son muy similares a los ya expuestos anteriormente en las figuras 1 y 2.

Ejemplo 3. Citotoxicidad del compuesto cannabinoide WIN 55,212-2 en la línea celular de mieloma múltiple MM1.S.

Con el objetivo de verificar los resultados descritos en el ejemplo 1, los autores de la presente invención analizaron la capacidad del compuesto WIN 55,212-2 para inhibir la viabilidad de una segunda línea celular del mieloma, en este caso la línea celular del mieloma múltiple MM1.S. Los resultados de estos experimentos han quedado fielmente reflejados en las figuras 4 y 5.

En este sentido, para llevar a cabo estos ensayos los autores incubaron la línea celular de mieloma MM1.S a diferentes concentraciones con el agente cannabinoide WIN, 55-212,2 durante 48 y 96 horas, y la viabilidad celular fue determinada mediante la metabolización de MTT. Los valores medios de proliferación de los cultivos celulares control no-tratados se tomaron como 100%. Los datos corresponden a las medias +/- la desviación estándar de los triplicados de cada uno de los 4 ensayos realizados. Tal y como se puede observar en las figuras 4 y 5 la

viabilidad celular disminuyó notablemente a partir de concentraciones superiores a 1µM cuando las células MM1.S fueron incubadas durante 48 horas. También se reduce la viabilidad celular tras 96 horas de exposición al fármaco a las mismas concentraciones. De estos datos se puede deducir que la línea celular MM1.S es más sensible al WIN 55,212-2, que la línea celular U266. Estos datos permiten afirmar la potencialidad del compuesto WIN 55,212-2, como terapia efectiva frente al tratamiento del mieloma múltiple y de enfermedades relacionadas.

Ejemplo 4. Citotoxicidad del compuesto cannabinoide WIN 55,212-2 sobre células mononucleadas obtenidas a partir de sangre periférica de donantes sanos (progenitores hematopoyéticos CD 34+) y de médula ósea de pacientes de mieloma múltiple (CD64+, granulocitos (B), CD45+, linfocitos (C) y CD38+, células plasmáticas (D)).

Los autores de la presente invención evaluaron la toxicidad del agente cannabinoide WIN 55,212-2, lo cual se determinó en términos de viabilidad celular mediante dos tipos de ensayos, uno basado en la reducción del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), y otro basado en la interacción de la 7AAD. Se utilizaron cultivos primarios de células mononucleadas obtenidas a partir de sangre periférica de donantes sanos (progenitores hematopoyéticos CD 34+) y de médula ósea de pacientes de mieloma múltiple (CD64+, granulocitos (B), CD45+, linfocitos (C) y CD38+, células plasmáticas (D)).

Las células hematopoyéticas progenitoras CD34+ se aislaron a partir de aféresis de donantes sanos por métodos inmunomagnéticos. Para ello las células se incubaron 30 min a 4°C con microesferas magnéticas unidas al anticuerpo anti-CD34. Posteriormente las células fueron seleccionadas mediante un separador inmunonagnético, y posteriormente cultivadas en placas multi-pocillo a una densidad celular de millón de células por mililitro de medio RPMI suplementado más 20% suero bovino fetal (SBF).

Las células plasmáticas, granulocitos y linfocitos fueron obtenidas de muestras de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple tras lisis hipotónica con cloruro de amonio (0,16 M en Tris 0,17 M, pH 7,6) durante 10 min a temperatura ambiente, con el fin de eliminar la población celular de eritrocitos. La suspensión celular resultante de la lisis, que sólo contiene las células mononucleadas, se sembró en placas multi-

pocillo a la misma densidad celular que las células progenitoras utilizando medio RPMI suplementado más 20% suero bovino fetal.

Los cultivos primarios fueron incubados en presencia y ausencia del agente cannabinoide WIN 55, 212-2 a diferentes concentraciones. El rango de concentraciones ensayado con el agente WIN 55, 212-2 fue de 0.5-50 micromolar. Los tiempos de incubación de los cultivos primarios en presencia o ausencia del agente cannabinoide fueron de 12 ó 18 horas.

Tal y como se puede observar claramente en las figuras 6A-6D la viabilidad celular no fue afectada en las poblaciones de progenitores hematopoyéticos (A) y de granulocitos (B). En la población de linfocitos (C) sólo se detectó pérdida de viabilidad a la dosis más alta. Sin embargo, WIN produjo una drástica reducción de la viabilidad celular de las células plasmáticas (D) cuando son tratadas a dosis superiores a 10uM.

Estos resultados demuestran que la utilización de compuestos agonistas de los receptores cannabinoides CB1 y/o CB2, particularmente WIN 55, 212-2, no sólo presentan citotoxicidad frente a líneas celulares establecidas de mieloma sino que estos compuestos presentan un bajo perfil de toxicidad lo que abre las puertas hacia su utilización como una terapia prometedora frente al mieloma múltiple y enfermedades relacionadas.

20

25

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de un agente cannabinoide para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una gammapatía monoclonal.
- 2.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación anterior, donde la gammapatía monoclonal se selecciona de entre mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones.
- 3.- El uso de un agente cannabinoide según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.
- 4.- El uso de un agente cannabinoide según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el agente cannabinoide es un agonista del receptor CB1, un agonista del receptor CB2, o un agonista mixto.
- 5.- El uso de un agente cannabinoide según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde el agente cannabinoide se selecciona de la lista que consiste en:
HU-308 ; JWH-133; L-759, 633; PRS 211,375 (también conocido como Cannabinor); AM-1241; JWH-015; L-759, 656; GW-842, 166X; GP-1 a; THC (Tetrahidrocannabinol); HU-210; L-759, 656; WIN 55,212-2; CP 55940; CRA-13; SAB-378; JWH-018 (también conocido como AM-678); CP 50,556-1 (levonantradol), o cualquiera de sus combinaciones.
- 6.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 5, donde el agente cannabinoide es el WIN 55,212-2 o cualquiera de sus sales o solvatos.
- 7.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 5, donde el agente cannabinoide es el WIN 55,212-2 o cualquiera de sus sales o solvatos y donde la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.
- 8.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 4, donde el agente cannabinoide se selecciona de la lista que consiste en: agentes tipo cannabigerol (CBG), agentes tipo cannabicromeno (CBC), agentes tipo cannabidiol (CBD), agentes tipo cannabinodiol (CBND), agentes tipo tetrahidrocannabinol (THC), agentes tipo cannabiol (CBN), agentes cannabitriol (CBT), agentes cannabielsoin (CBE), agentes isocannabinoides, agentes tipo cannabicitrol (CBL), agentes tipo

cannabicitran (CBT), agentes tipo cannabicromanona (CBCN), o cualquiera de sus combinaciones.

9.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo cannabigerol (CBG) se selecciona de la lista que consiste en:
 5 cannabigerol (**E**)-**CBG-C₅**; cannabigerol monometil eter (**E**)-**CBGM-C₅ A**; ácido cannabinerolico A (**Z**)-**CBGA-C₅ A**; cannabigerovarina (**E**)-**CBGV-C₃**; ácido cannabigerolico A (**E**)-**CBGA-C₅ A**; ácido cannabigerolico A monometil éter (**E**)-**CBGAM-C₅ A**; ácido cannabigerovarínico A (**E**)-**CBGVA-C₃ A**, o cualquiera de sus combinaciones.

10 10.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo cannabicromeno (CBC), se selecciona de la lista que consiste en: (\pm)-cannabicromeno **CBC-C₅**; (\pm)-ácido cannabicromenico A **CBCA-C₅ A**; (\pm)-cannabicromevarina **CBCV-C₃**; (\pm)-ácido cannabichromevarínico A **CBCVA-C₃ A**, o cualquiera de sus combinaciones.

15 11.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo cannabidiol (CBD), se selecciona de la lista que consiste en:
 (-)-cannabidiol **CBD-C₅**; cannabidiol momometil eter **CBDM-C₅**; cannabidiol-C₄ **CBD-C₄**; (-)-cannabidivarina **CBDV-C₃**; cannabidiorcol **CBD-C₁**; ácido cannabidiolico **CBDA-C₅**; ácido cannabidivarínico **CBDVA-C₃**, o cualquiera de sus
 20 combinaciones.

12.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo tipo cannabinodiol (CBND), se selecciona de la lista que consiste en: cannabinodiol **CBND-C₅**; cannabinodivarina **CBND-C₃**, o cualquiera de sus combinaciones.

25 13.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo tetrahidrocannabinol (THC), se selecciona de la lista que consiste en: Δ^9 -Tetrahidrocannabinol **Δ^9 -THC-C₅** ; Δ^9 Tetrahidrocannabinol-C₄ **Δ^9 -THC-C₄** ; Δ^9 -Tetrahidrocannabivarina **Δ^9 -THCV-C₃** ; Δ^9 -Tetrahidrocannabiorcol **Δ^9 -THCO-C₁** ; Δ^9 -Tetrahidrocannabinolic acid A
 30 **Δ^9 -THCA-C₅ A**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabinolico B **Δ^9 -THCA-C₅ B**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabinolico -C₄ A y/o B **Δ^9 -THCA-C₄ A y/o B**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabivarínico A **Δ^9 -THCVA-C₃ A**; Δ^9 -ácido tetrahidrocannabiorcolico A

y/o B Δ^9 -THCOA-C₁ A y/o B; (-)- Δ^8 -*trans* (6aR,10aR)- Δ^8 -Tetrahydrocannabinol Δ^8 -THC-C₅; (-)- Δ^8 -*trans*-(6aR,10aR)-ácido tetrahydrocannabinólico A Δ^8 -THCA-C₅ A; (-)-(6aS,10aR)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (-)-*cis*- Δ^9 -THC-C₅, o cualquiera de sus combinaciones.

5 14.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo cannabinol (CBN), se selecciona de la lista que consiste en: cannabinol **CBN-C₅**; cannabinol-C₄ **CBN-C₄**; cannabivarin **CBN-C₃**; cannabinol-C₂ **CBN-C₂**; cannabiorcol **CBN-C₁**; ácido cannabínolico A **CBNA-C₅ A**; cannabinol metil éter **CBNM-C₅**, o cualquiera de sus combinaciones.

10 15.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo cannabitriol (CBT), se selecciona de la lista que consiste en: (-)-(9R,10R)-*trans*-cannabitriol (-)-*trans*-**CBT-C₅**; (+) (9S,10S)-Cannabitriol (+)-*trans*-**CBT-C₅**; (\pm)-(9R,10S/9S,10R)-Cannabitriol (\pm)-*cis*-**CBT-C₅**; (-)-(9R,10R)-*trans*-10-O-Ethyl-cannabitriol (-)-*trans*-**CBT-OEt-C₅**; (\pm)-(9R,10R/9S,10S)-
 15 Cannabitriol-C₃ (\pm)-*trans*-**CBT-C₃**; 8,9-Dihydroxy- $\Delta^{6a(10a)}$ - tetrahydrocannabinol **8,9-Di-OH-CBT-C₅**; ácido cannabidiólico A cannabitriol ester **CBDA-C₅ 9-OH-CBT-C₅ ester**; (-)-(6aR,9S,10S,10aR)- 9,10-Dihydroxy- hexahidro-cannabinol, Cannabiripsol **Cannabiripsol-C₅**; (-)-6a,7,10^a Trihidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (-)-**Cannabitetrol** ; 10-Oxo- $\Delta^{6a(10a)}$ tetrahydrocannabinol **OTHC**, o cualquiera de sus
 20 combinaciones.

16.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo cannabielsoin (CBE), se selecciona de la lista que consiste en: (5aS,6S,9R,9aR)-Cannabielsoin **CBE-C₅**; (5aS,6S,9R,9aR)-C₃-Cannabielsoin **CBE-C₃**; (5aS,6S,9R,9aR)-ácido Cannabielsoico A **CBEA-C₅ A**; (5aS,6S,9R,9aR)-ácido
 25 Cannabielsoico B **CBEA-C₅ B**; (5aS,6S,9R,9aR)-C₃-ácido Cannabielsoico B **CBEA-C₃ B**; Cannabiglendol-C₃ **OH-iso-HHCV-C₃**; Dehidrocannabifuran **DCBF-C₅**; Cannabifuran **CBF-C₅**, o cualquiera de sus combinaciones.

17.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente
 30 cannabinoide del tipo isocannabinoides, se selecciona de la lista que consiste en: (-)- Δ^7 -*trans*-(1R,3R,6R)-Isotetrahydrocannabinol; (\pm)- Δ^7 -1,2-*cis*-

(1*R*,3*R*,6*S*/1*S*,3*S*,6*R*)- Isotetrahidro-cannabivarin; (-)- Δ^7 -*trans* (1*R*,3*R*,6*R*)- Isotetrahidrocannabivarin, o cualquiera de sus combinaciones.

18.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo cannabicitrol (CBL), se selecciona de la lista que consiste en:
 5 (±)-(1*aS*,3*aR*,8*bR*,8*cR*)-Cannabicitrol **CBL-C₅**; (±)-(1*aS*,3*aR*,8*bR*,8*cR*)-ácido Cannabicitrololico A **CBLA-C₅ A**; (±)-(1*aS*,3*aR*,8*bR*,8*cR*)-Cannabicitrovarin **CBLV-C₃**, o cualquiera de sus combinaciones.

19.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo Cannabicitran (CBL), se selecciona de la lista que consiste en:
 10 Cannabicitran **CBT-C₅**, o cualquiera de sus combinaciones.

20.- El uso de un agente cannabinoide según la reivindicación 8, donde el agente cannabinoide del tipo Cannabicromanona (CBCN), se selecciona de la lista que consiste en: Cannabicromanona **CBCN-C₅**; Cannabicromanona-C3; **CBCN-C₃**; Cannabicoumaronona **CBCON-C₅**, o cualquiera de sus combinaciones.

15 21.- Uso de una composición que comprende un agente cannabinoide tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4-20, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una gammapatía monoclonal.

22.- Uso de una composición según la reivindicación 21, donde la composición es una composición farmacéutica que opcionalmente comprende uno o más
 20 excipientes farmacéuticamente aceptables.

23. Uso de una preparación combinada que comprende un agente cannabinoide tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4-20, y otro principio activo adecuado para el tratamiento de una gammapatía monoclonal, en la elaboración de un medicamento para su administración combinada, simultánea o secuencial, para
 25 el tratamiento de una gammapatía monoclonal.

24.- El uso de una preparación combinada según la reivindicación anterior, donde la gammapatía monoclonal se selecciona de entre el mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldeström, amiloidosis, o cualquiera de sus combinaciones.

25.- El uso de una preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 23-24, donde la gammapatía monoclonal es el mieloma múltiple.

26.- El uso de una preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 23-25, donde el principio activo se selecciona de entre Velcade, Melfalan, 5 Prednisona, Revlimd, Dexametasona, Talidomida, Doxirrubicina, Bortezomid, Mozobil, factor estimulante de colonias de granulocitos, pomailidomida, carfizomid, o cualquiera de sus combinaciones.

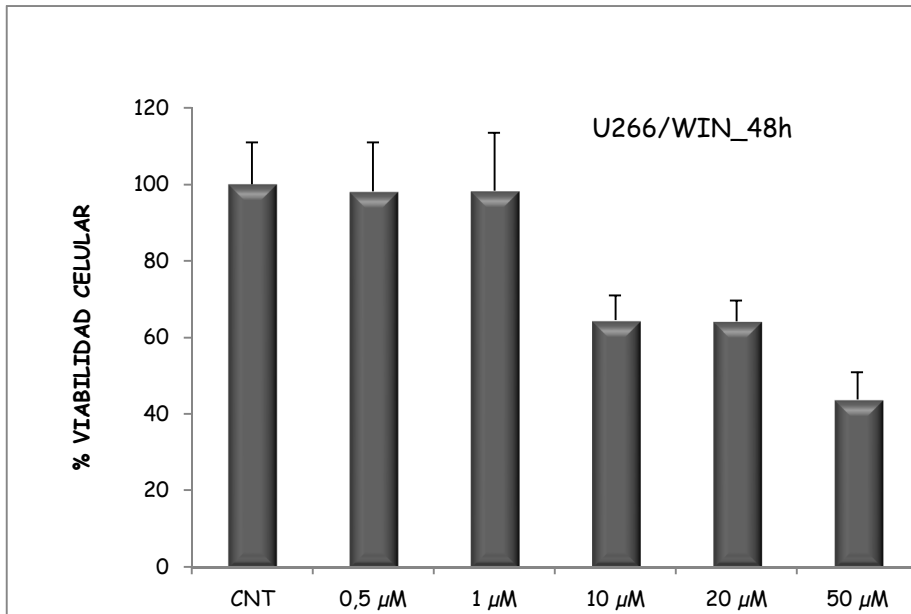


Fig. 1

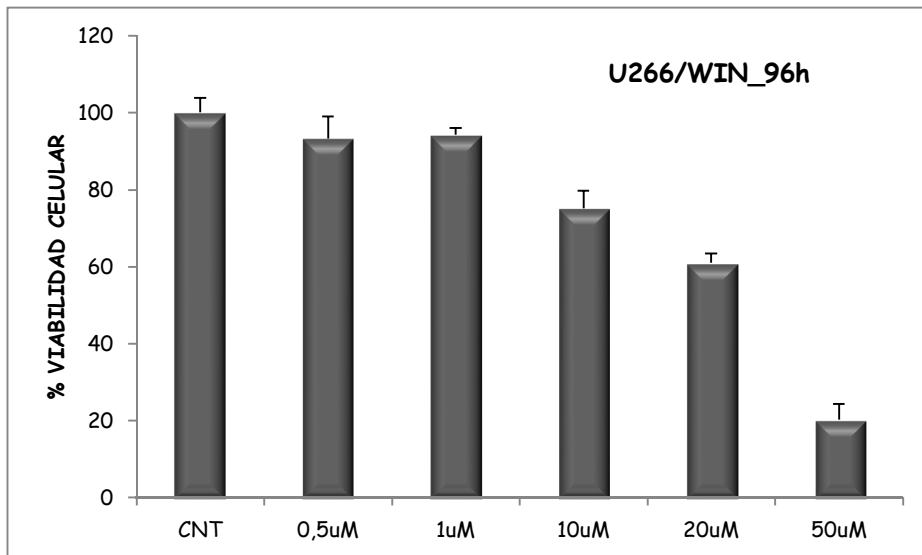


Fig. 2

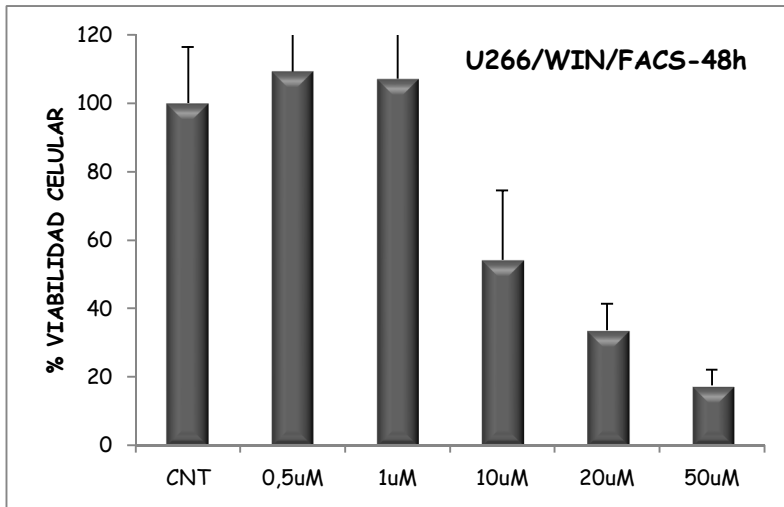


Fig. 3

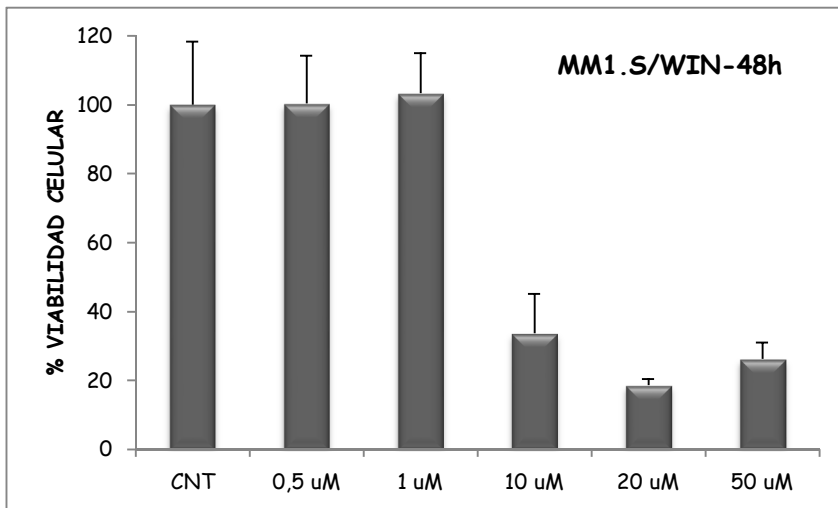


Fig. 4

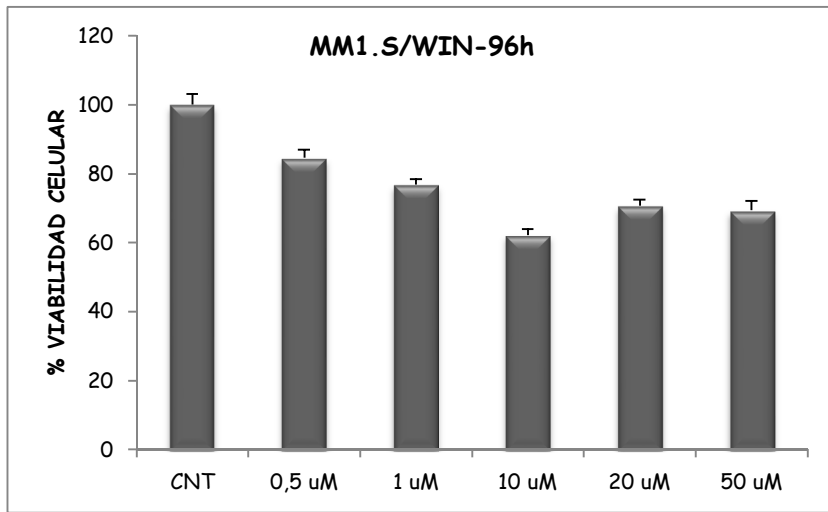


Fig. 5

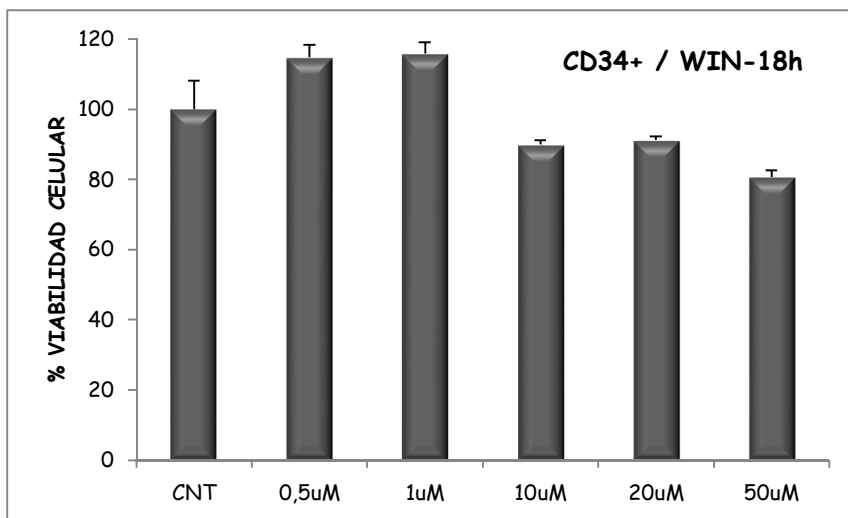


Fig. 6A

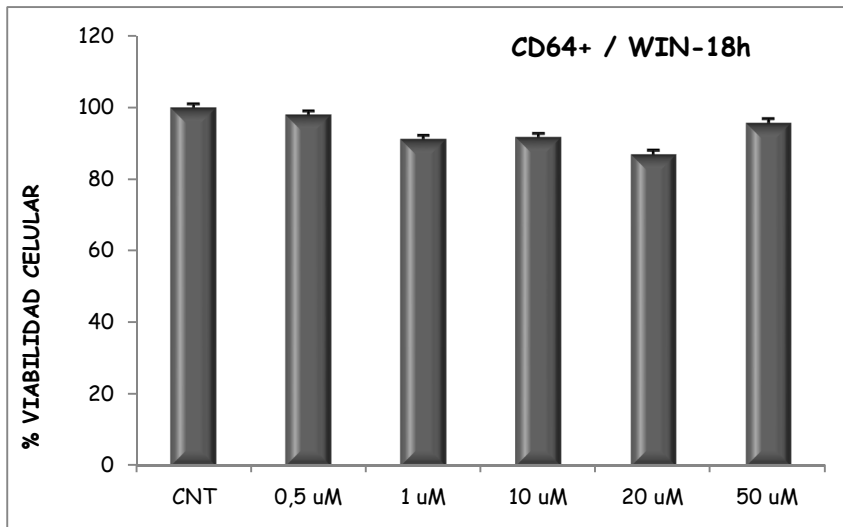


Fig. 6B

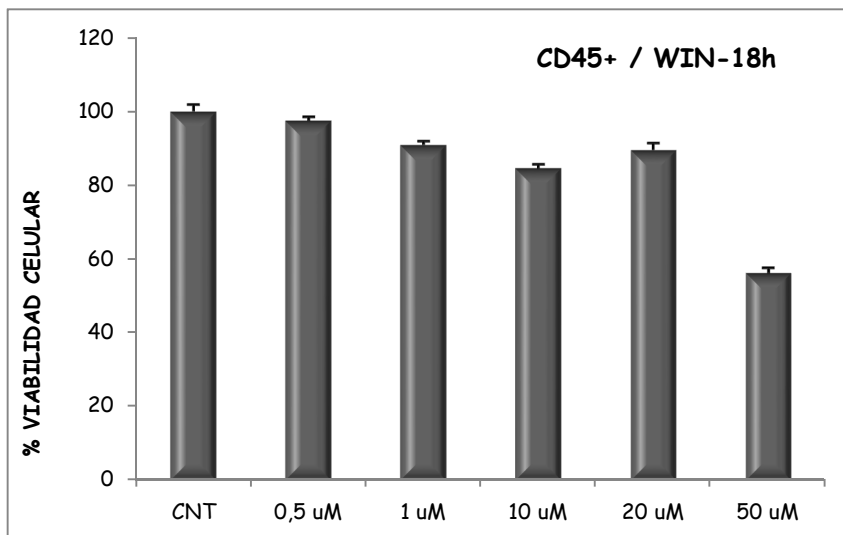


Fig. 6C

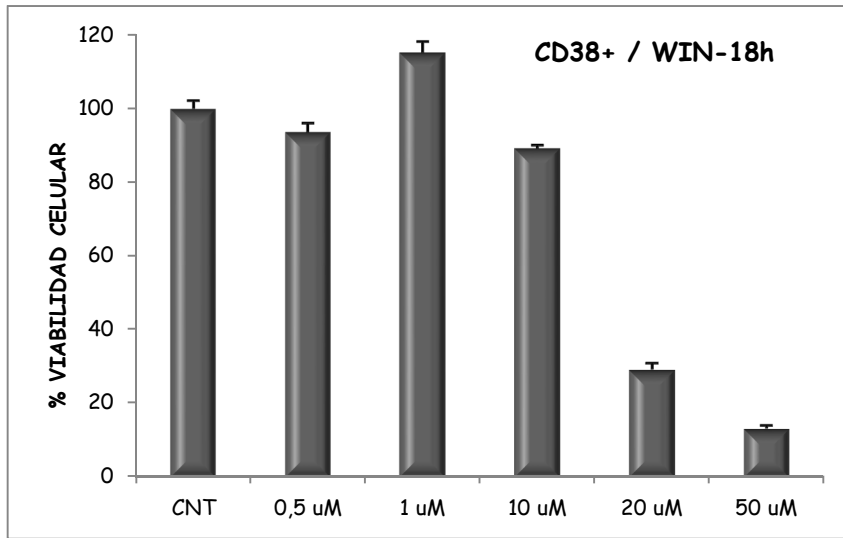


Fig. 6D