

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 669**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/4188 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011 E 11709175 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2544682**

54 Título: **Fitocannabinoides en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

12.03.2010 GB 201004137

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

12.05.2016

73 Titular/es:

GW PHARMA LIMITED (50.0%)
Sovereign House, Histon
Cambridge CB24 9BZ, GB y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

PAROLARO, DANIELA;
MASSI, PAOLA;
IZZO, ANGELO ANTONIO;
BORELLI, FRANCESCA;
AVIELLO, GABRIELLA;
DI MARZO, VINCENZO;
DE PETROCELLIS, LUCIANO;
MORIELLO, ANIELLO SCHIANO;
LIGRESTI, ALESSIA;
ROSS, RUTH ALEXANDRA;
FORD, LESLEY ANN;
ANAVI-GOFFER, SHARON;
GUZMAN, MANUEL;
VELASCO, GUILLERMO;
LORENTE, MAR;
TORRES, SOFIA;
KIKUCHI, TETSURO;
GUY, GEOFFREY;
STOTT, COLIN;
WRIGHT, STEPHEN;
SUTTON, ALAN;
POTTER, DAVID y
DE MEIJER, ETIENNE

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 569 669 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

Fitocannabinoides en el tratamiento del cáncer

5 Esta invención se refiere al uso de una combinación de los fitocannabinoides tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) junto con temozolomida, para usar en el tratamiento de un glioma.

Antecedentes

10 El cáncer es una clase de enfermedad que se produce porque las células se immortalizan; dejan de responder a las señales habituales para detener el crecimiento lo cual es una función normal de la remodelación en el cuerpo que requiere de la muerte de células en el momento preciso. La apoptosis, o muerte celular programada, puede llegar a ser defectuosa y cuando esto sucede puede tener lugar una transformación maligna. Las células inmortalizadas crecen más allá de sus límites normales e invaden los tejidos adyacentes. Las células malignas pueden además metastatizar y dispersarse a otros lugares en el cuerpo a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático. Las células cancerosas frecuentemente forman una masa conocida como un tumor.

15 Existen aproximadamente 200 tipos diferentes de cáncer; los cánceres pueden empezar en cualquier tipo de tejido corporal aunque muchos cánceres harán metástasis hacia otros tejidos corporales. Existen muchas causas diferentes de cáncer y estas incluyen; carcinógenos, la edad, mutaciones genéticas, problemas del sistema inmunológico, la dieta, el peso, el estilo de vida, factores ambientales tales como los contaminantes, algunos virus por ejemplo el virus del papiloma humano (HPV) está implicado en el cáncer del cuello del útero y se conoce además que algunas infecciones bacterianas provocan cánceres.

20 Existen muchas opciones de tratamientos diferentes para el cáncer y el tratamiento buscado se determina frecuentemente por el tipo y la etapa del cáncer. Las opciones de tratamiento incluyen; tratamiento con fármacos quimioterapéuticos, tratamiento con fármacos hormonales, radioterapia, cirugía, terapias complementarias y combinaciones de estos.

25 El cáncer de próstata es el tipo de cáncer más común en los hombres y representa el 24 % de todos los cánceres de hombres en el Reino Unido. En el año 2006 se registraron más de 35.000 casos nuevos de cáncer de próstata diagnosticados en el Reino Unido solamente.

30 La próstata es una glándula en el sistema reproductor masculino y los síntomas de cáncer en la próstata pueden incluir dolor, dificultad para orinar, problemas con las relaciones sexuales y disfunción eréctil. El cáncer de próstata puede metastatizar a los huesos y/o nódulos linfáticos. Las opciones de tratamiento para el cáncer de próstata incluyen cirugía, terapia de radiación, quimioterapia y tratamiento hormonal.

35 El tratamiento hormonal usualmente implica un tratamiento con un antiandrógeno tal como acetato de ciproterona, flutamida o bicalutamida, ya sea solos o en combinación con un agente quimioterapéutico. Estos tratamientos funcionan para detener la producción de testosterona (andrógeno) lo que puede disminuir la velocidad de crecimiento tumoral o incluso reducir el tamaño del tumor. Mientras las células cancerosas prostáticas responden a los antiandrógenos, se denomina como cáncer de próstata 'sensible a hormonas'. Desafortunadamente, después de unos pocos años de tratamiento con antiandrógenos el cáncer de próstata deja de responder al tratamiento hormonal y se denomina cáncer de próstata 'insensible a hormonas'. En esta etapa el crecimiento del cáncer no puede controlarse con el tratamiento hormonal.

40 Para probar la eficacia de diferentes compuestos en el tratamiento del cáncer de próstata sensible a hormonas o insensible a hormonas pueden usarse dos líneas celulares diferentes. La línea celular LNCaP son células cancerosas prostáticas sensibles a hormonas que se derivaron de una metástasis de un nódulo linfático supraclavicular en un hombre de 50 años de edad en 1977. La línea celular DU-145 son células cancerosas prostáticas insensibles a hormonas que se derivaron de una metástasis cerebral.

45 Se conoce que los niveles de expresión de ambos receptores de cannabinoides, CB1 y CB2, fueron significativamente mayores en células CA-papilomavirus humano-10 (células transformadas viralmente derivadas de adenocarcinoma de tejido prostático humano), y otras células prostáticas humanas LNCaP, DU-145, PC3, y CWR22RN1 que en células epiteliales prostáticas humanas y PZ-HPV-7 (células transformadas viralmente derivadas de tejido prostático humano normal) (Sarfaraz, 2005).

50 Adicionalmente se conoce que el tratamiento con WIN-55,212-2 (agonista de CB1/CB2 mezclado) con células LNCaP sensibles a hormonas resultó en una inhibición del crecimiento celular dependiente de la dosis (1-10 Mmol/l) y del tiempo (24-48 horas). El bloqueo de los receptores CB1 y CB2 por sus antagonistas SR141716 (CB1) y SR144528 (CB2) redujo significativamente este efecto.

65 Estos resultados sugirieron que WIN-55,212-2 u otros agonistas de los receptores de cannabinoides podrían desarrollarse como agentes terapéuticos novedosos para el tratamiento del cáncer de próstata.

Al Cannabis se le ha atribuido ser tanto un carcinógeno como un agente contra el cáncer. En particular se conoce que fumar cannabis es carcinogénico ya que el humo de cannabis contiene al menos 50 compuestos carcinogénicos conocidos diferentes, muchos de los cuales son las mismas sustancias encontradas en el humo del tabaco. Uno de estos carcinógenos, el benzopireno es conocido por provocar cáncer ya que altera un gen denominado p53, que es un gen supresor de tumores. Cannabis contiene la sustancia tetrahidrocannabinol (THC) la cual se ha demostrado que provoca que el benzopireno promueva un cambio del gen p53.

Sin embargo los investigadores han descubierto que algunos cannabinoides, que incluyen THC y cannabidiol (CBD) son capaces de promover el resurgimiento de la apoptosis de manera que algunos tumores respondan a las señales, dejen de dividirse, y mueran. El proceso de apoptosis se valora por la observación de varios fenómenos que incluyen: reducción del volumen celular, condensación de la cromatina nuclear, cambios en la distribución de fosfolípidos en los fosfolípidos de la membrana plasmática, y escisión de la cromatina en fragmentos de ADN denominados escaleras de ADN.

Otro método por el cual crecen los tumores es asegurando su nutrición: envían señales para promover la angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Los cannabinoides también pueden desactivar estas señales.

Se ha demostrado que los cannabinoides tienen un efecto antiproliferativo sobre diferentes líneas celulares de cáncer. Los cannabinoides THC, THCA, CBD, CBDA, CBG y CBC y la BDS de los cannabinoides THC y CBD se analizaron en ocho líneas celulares diferentes que incluyen DU-145 (cáncer de próstata sensible a hormonas), MDA-MB-231 (cáncer de mama), CaCo-2 (cáncer colorrectal) y C6 (células de glioma). Los datos para cada cannabinoide en cada tipo de cáncer diferente varió pero generalmente los mejores datos se observaron con CBD o CBD BDS. Los valores de IC50 para todos los cannabinoides sobre DU-145 fueron bastante altos de lo que se infiere que ninguno de los cannabinoides analizados fue particularmente eficaz en la inhibición del cáncer de próstata insensible a hormonas (Ligresti, 2006).

Varios canales de potencial de receptor transitorio (TRP) se han implicado en la supervivencia, el crecimiento y la dispersión del cáncer de próstata y otros cánceres. TRPM8 se expresa en las neuronas sensoriales, donde responde al frío y a los agentes de enfriamiento, particularmente mentol, pero además se expresa de manera abundante en la próstata. En particular TRPM8 está sobreexpresado en células cancerosas prostáticas sensibles a hormonas, pero la expresión de TRPM8 desaparece casi completamente una vez que el cáncer se vuelve insensible a las hormonas y en pacientes que reciben terapia antiandrogénica. La expresión de TRPM8 es estimulada por los andrógenos en las líneas celulares de cáncer de próstata sensible a hormonas (LNCaP). Existe evidencia de que se requiere la expresión de TRPM8 para la supervivencia de las células cancerosas prostáticas.

El mecanismo de dicha acción de TRPM8 probablemente se relacione con su capacidad para modular el calcio intracelular, y posiblemente incluso la distribución del calcio dentro de la célula. El último punto puede ser importante debido a la localización del TRPM8 en la célula cancerosa prostática. Aunque se encuentra en la membrana celular, se encuentra además en el retículo endoplásmico; por lo tanto cualquier agente terapéutico potencial que se dirija al receptor TRPM8 debe ser capaz de lograr un buen acceso al espacio intracelular.

El cannabinoide endógeno anandamida se ha demostrado que antagoniza con TRPM8 (De Petrocellis, 2007). Los autores demostraron además que la estimulación de los receptores CB1 antagonizó transitoriamente con los receptores de TRPM8 expresados en las mismas células.

La solicitud WO 2008/129258 describe el uso de extractos de plantas que contienen cannabinoides en la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones que se alivian por el bloqueo de uno o más tipos de canales TRP. Se describen diferentes potenciales de unión de los extractos de plantas que contienen cannabinoides a los canales TRPA1 y TRPM8. Las enfermedades y afecciones a prevenir o tratar incluyen: dolor neuropático, inflamación, vasoconstricción o cáncer.

El receptor TRPM8 se ha encontrado además en los cánceres de mama, colon y piel.

Se ha demostrado que CBD es capaz de regular negativamente la expresión del inhibidor de la proteína de unión al ADN, Id-1 en células de cáncer de mama humano (McAllister, 2007). Las concentraciones de CBD eficaces para inhibir la expresión de Id-1 se correlacionaron con las usadas para inhibir el fenotipo proliferativo e invasivo de las células de cáncer de mama. CBD fue capaz de inhibir la expresión de Id-1 a nivel de ARNm y proteína de una manera dependiente de la concentración.

Se ha demostrado además que CBD inhibe la proliferación y la invasión de células cancerosas humanas a través de una modulación diferencial de las vías de ERK y ROS, y que la activación sostenida de la vía de ERK conduce a la regulación negativa de la expresión de Id-1. Se demostró además que CBD regula positivamente el agente de prodiferenciación, Id-2. Con el uso de una línea celular 4T1 de ratón y un modelo de cáncer de mama metastásico, CBD redujo significativamente la dispersión metastásica. Como tal CBD puede representar un tratamiento prometedor para el cáncer de mama en pacientes con tumores secundarios (McAllister, 2009).

5 Evidencia reciente indica que CBD es un antagonista de GPR55; esto aumenta la posibilidad de que este receptor pueda subyacer a los efectos de CBD en las células de tumores de mamas y otros. GPR55 se acopla a G12/13 y la activación corriente abajo de las GTPasas pequeñas RhoA, rac1 y cdc42; esta vía es crucial en la reorganización citoesquelética y la migración celular. Se ha encontrado un aumento de la expresión de G12/13 en células de cáncer de mama humano en etapa temprana tomadas por biopsia, y la inhibición de G13 disminuye el nivel de metástasis de las células de cáncer de mama *in vivo* (Kelly et al, 2007).

10 Los efectos antiproliferativos de CBD se han evaluado además en las líneas celulares de glioma humano U87 y U373, (Massi, 2004). El efecto antiproliferativo de CBD se correlacionó con la inducción de apoptosis, según se determinó por análisis citofluorimétrico y tinción del ADN monocatenario, lo cual no se revirtió por los antagonistas de los cannabinoides. Además CBD, administrado s.c. a ratones desnudos a la dosis de 0.5 mg/ratón, inhibió significativamente el crecimiento de células de glioma humano U87 implantadas subcutáneamente. Se concluyó que CBD era capaz de producir una actividad antitumoral significativa tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que sugiere así una posible aplicación de CBD como un agente quimioterapéutico.

15 La solicitud WO/2006/037981 describe el uso del cannabinoide CBD para impedir la migración o metástasis de las células tumorales desde un área de crecimiento descontrolado a un área lejos del sitio del tumor original. CBD provocó una inhibición dependiente de la concentración de la migración de células de glioma U87, cuantificada en una cámara de Boyden. Dado que estas células expresan ambos receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en la membrana, el grupo evaluó además su vínculo en el efecto antimigratorio de CBD.

20 Se ha demostrado que los cannabinoides juegan un papel fundamental en el control de la supervivencia celular / muerte celular. Se ha reportado que los cannabinoides pueden inducir proliferación, cese del crecimiento, o apoptosis en un número de células, que incluyen neuronas, linfocitos, y diversas células neurales y no neurales transformadas, y que los cannabinoides inducen la apoptosis de células de glioma en cultivo y la regresión de gliomas malignos *in vivo* (Guzman, 2001).

25 Se ha realizado un estudio clínico piloto de THC en pacientes con glioblastoma multiforme recurrente. Este ensayo piloto fase I consistió en nueve pacientes con glioblastoma multiforme recurrente quienes se administraron con THC intratumoralmente. Los pacientes habían fracasado anteriormente con la terapia estándar (cirugía y radioterapia) y tenían una evidencia clara de la progresión del tumor. El criterio de valoración principal del estudio fue la determinación de la seguridad de la administración intracraneal de THC. Se evaluó además la acción de THC sobre el tiempo de supervivencia y diversos parámetros de las células tumorales. La mediana de la supervivencia de la cohorte desde el inicio de la administración del cannabinoide fue de 24 semanas (intervalo de confianza del 95 %: 15-33).

30 El documento GB 2,460,672 describe la combinación sinérgica de THC con CBD y la combinación sinérgica de THC con tamoxifeno o cisplatino. No muestra la combinación sinérgica de los cannabinoides THC y CBD junto con temozolomida. Además Velasco et al. (2007) describe una combinación de THC y temozolomida.

35 La solicitud WO 2008/144475 describe el tratamiento de trastornos de proliferación celular que incluyen el cáncer con derivados del cannabidiol lo mismo solos o en combinación con THC o un derivado de este.

40 La solicitud WO 2009/147439 describe el uso de una combinación de cannabinoides, particularmente tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD), en la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento del cáncer. En particular el cáncer a tratar es un tumor cerebral, más particularmente un glioma; más particularmente aún un glioblastoma multiforme (GBM).

45 La solicitud WO 2009/147438 describe el uso de uno o más cannabinoides, particularmente THC y/o CBD en combinación con un agente quimioterapéutico no cannabinoide en la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento del cáncer. En particular el cáncer a tratar es un tumor cerebral, más particularmente un glioma, más particularmente aún un glioblastoma multiforme (GBM). El agente quimioterapéutico no cannabinoide puede ser un modulador selectivo del receptor de estrógeno o un agente alquilante.

50 La literatura y las solicitudes de patentes correspondientes demuestran la utilidad general de los cannabinoides en el área de la investigación y el tratamiento del cáncer.

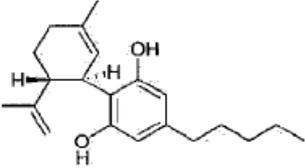
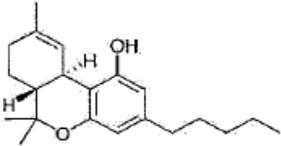
Definiciones y Abreviaturas

55 Las definiciones de algunos de los términos usados para describir la invención se detallan más abajo:

Los fitocannabinoides descritos en la presente solicitud se enumeran más abajo junto con sus abreviaturas estándar.

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

CBD	Cannabidiol	
THC	Tetrahydrocannabinol	

Los "fitocannabinoides" son cannabinoides que se originan de la naturaleza y pueden encontrarse en la planta de cannabis. Los fitocannabinoides pueden ser cannabinoides aislados o presentarse como una sustancia farmacológica botánica.

Un "cannabinoide aislado" se define como un fitocannabinoide que se ha extraído de la planta de cannabis y purificado en tal medida que todos los componentes adicionales tales como los cannabinoides secundarios y menores y la fracción no cannabinoide se han eliminado.

Una "sustancia farmacológica botánica" o "BDS" se define en la guía Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, Agosto 2000, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research como: "Un fármaco derivado de una o más plantas, algas, u hongos microscópicos. Se prepara a partir de materias primas botánicas mediante uno o más de los siguientes procesos: pulverización, decocción, expresión, extracción acuosa, extracción etanólica u otros procesos similares." Una sustancia farmacológica botánica no incluye una sustancia altamente purificada o químicamente modificada derivada de fuentes naturales. Así, en el caso de cannabis, las BDS derivadas de las plantas de cannabis no incluyen cannabinoides altamente purificados de grado de farmacopea.

Los "endocannabinoides" son los cannabinoides que se producen endógenamente por los cuerpos humanos o animales. La regulación positiva o negativa del sistema de endocannabinoides puede ser útil en el tratamiento de algunas enfermedades o afecciones.

Los "cannabinoides sintéticos" son compuestos que tienen una estructura similar a un cannabinoide aunque se fabrican mediante el uso de medios químicos. En dependencia del método de fabricación del cannabinoide sintético puede comprender una mezcla racémica de cannabinoides, en contraste con un cannabinoide aislado que será un único enantiómero.

Los fitocannabinoides pueden encontrarse como la forma neutral (forma descarboxilada) o la forma de ácido carboxílico en dependencia del método usado para extraer los cannabinoides. Por ejemplo, se conoce que el calentamiento de la forma de ácido carboxílico provocará que la mayoría de la forma de ácido carboxílico se descarboxile hacia la forma neutral.

Los fitocannabinoides pueden existir además como la variante pentilo (5 átomos de carbono) o propilo (3 átomos de carbono). Inicialmente se pensó que las variantes propilo y pentilo tendrían propiedades similares, sin embargo una investigación reciente ha encontrado que esto puede no ser cierto. Por ejemplo el fitocannabinoide THC se conoce que es un agonista del receptor CB1 mientras que se ha descubierto que la variante propilo THCV es un antagonista del receptor CB1 lo que significa que tienen efectos casi opuestos.

Breve Resumen de la Descripción

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona una combinación de los fitocannabinoides tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) junto con temozolomida, para usar en el tratamiento de un glioma.

5 Preferentemente la combinación de los fitocannabinoides y la temozolomida se empacan para la administración de manera separada, simultánea o secuencial.

Preferentemente el nivel de dosis de los fitocannabinoides es subeficaz para el tratamiento del glioma si se usan solos.

10 Preferentemente el nivel de dosis de la temazolamida es subeficaz para el tratamiento de glioma si se usa sola.

Breve Descripción de las Figuras

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

15

La Figura 1 muestra una visión general de la preparación de la Sustancia farmacológica botánica (BDS).

Descripción Detallada

20

El uso de los fitocannabinoides, ya sean aislados o con todos sus componentes coextraídos se describe en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

25

Producción botánica y fabricación de BDS de cannabinoides

La materia prima botánica (BRM) se obtiene a partir de variedades de Cannabis sativa L. (quimiotipos) que se han desarrollado para producir específicamente altos niveles de un fitocannabinoide dado como el fitocannabinoide principal. El cannabinoide CBG es la molécula precursora en la vía biosintética al THC, CBD y CBC. Otros cannabinoides se forman después a partir de estos cannabinoides. El cannabinoide principal producido en la planta estará presente como la forma de ácido carboxílico en el material vegetal, como lo está cualquiera de los otros cannabinoides secundarios o menores. La forma de ácido carboxílico del cannabinoide usualmente se descarboxila a la forma neutral durante el procesamiento de la BRM a la Sustancia farmacológica botánica (BDS).

30

35

Las plantas usadas para preparar la BDS de cannabinoides pueden ser plantas de tipo silvestre o plantas cultivadas específicamente para producir un cannabinoide como un cannabinoide principal. Estas plantas se denominan como 'quimiotipos'. Por ejemplo el artículo de (De Meijer & Hammond, 2005) describe el cultivo selectivo de una planta con alto contenido de CBG. Las plantas de tipo silvestre que producen una gran cantidad de CBG se han encontrado en poblaciones europeas de cáñamo para fibras.

40

Las sustancias farmacológicas botánicas (BDS) se preparan a partir de BRM y son extractos adecuados para una formulación adicional y/o propósitos investigativos. Estos extractos se denominan una Sustancia farmacológica botánica. Una breve visión general del método se proporciona en la Figura 1. Las condiciones para el proceso de extracción están optimizadas para dar el balance más favorable del contenido de cannabinoide y la fracción no cannabinoide junto con un rendimiento satisfactorio. Por ejemplo el contenido de cannabinoide de la CBG BDS es virtualmente 100 % de CBG, con solo cantidades muy pequeñas de otros cannabinoides presentes.

45

50

Las BDS libre de cannabinoides pueden prepararse a partir de la CBG BDS o de una planta con cero cannabinoide tal como USO-31. Dado que CBG es el cannabinoide principal presente en la CBG BDS es posible extraer el CBG presente relativamente fácil mediante el uso de técnicas estándar conocidas en la materia tales como cromatografía en columna. Un extracto libre de CBG puede usarse para evaluar qué efecto farmacológico en caso de existir alguno, se asocia con la fracción no cannabinoide. Es posible fraccionar la BDS completamente de manera que los compuestos individuales puedan retirarse para la purificación y el resto recombinarse para producir, después de la eliminación del disolvente, una BDS libre del (de los) compuesto(s) seleccionado(s). El extracto libre de CBG así producido permite la evaluación de cualquier sinergismo entre las fracciones de cannabinoides y sin cannabinoides.

55

Pueden prepararse además fitocannabinoides aislados. Como se indicó anteriormente la cromatografía en columna puede usarse para aislar el CBG a partir de CBG BDS para producir una pureza mayor que el 99 %. La BDS y el fitocannabinoide aislado pueden usarse después para comparar la eficacia y cualquier sinergismo entre el fitocannabinoide principal y los otros constituyentes fitocannabinoides y no cannabinoides en la BDS.

60

Ejemplo 2

Componentes fitocannabinoides y no cannabinoides en la BDS

65

El siguiente ejemplo ilustra los diferentes componentes fitocannabinoides que componen cada una de las BDS descritas. En cada tabla el fitocannabinoide principal se define en caracteres en negritas.

5 Las BDS se extrajeron mediante el uso de CO₂ líquido y después se usó un método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para analizar los diferentes componentes cannabinoides en cada BDS de cannabinoides.

10 Las tablas detalladas más abajo describen cantidades promedio de los fitocannabinoides principales, secundarios y menores en cada BDS representativa. El experto apreciará que a medida que las BDS se extraen de las plantas de cannabis están sujetas por supuesto a un grado de variación en su composición. Generalmente las cantidades en las que cada uno de los componentes fitocannabinoides variarán estarán en el en el intervalo de ± 10 % (p/p). Sin embargo en dependencia del material vegetal de partida y el método de extracción usado estas cantidades pueden variar en tan poco como ± 5 % hasta ± 50 % (p/p).

15 **Tabla 2.1.1 Cantidad de BDS tetrahidrocannabinol en total e intervalo**

THC BDS	Cantidad (% p/p)	Intervalo (± 10 %)	Intervalo (± 25 %)	Intervalo (± 50 %)
CBO	0.2	0.18 - 0.22	0.15 - 0.25	0.1 - 0.3
CBG	2.0	1.8 - 2.2	1.5 - 2.5	1.0 - 3.0
CBD	1.0	0.9 - 1.1	0.75 - 1.25	0.5 - 1.5
THCV	1.1	0.99 - 1.21	0.83 - 1.38	0.55 - 1.65
CBN	3.0	2.7 - 3.3	2.25 - 3.75	1.5 - 4.5
THC (sustancias relacionadas)	0.6	0.54 - 0.66	0.45 - 0.75	0.3 - 0.9
THC	74.0	66.6 - 81.4	55.5 - 92.5	37.0 - 100.0
CBC	2.0	1.8 - 2.2	1.5 - 2.5	1.0 - 3.0
THCA	1.5	1.35 - 1.65	1.13 - 1.88	0.75 - 2.25
Cannabinoides totales	85.40			
No cannabinoides totales	14.60			

40 La fracción total que contiene fitocannabinoide de THC BDS comprende aproximadamente 77-94 % (p/p) de la BDS total.

45 **Tabla 2.1.2 BDS tetrahidrocannabinol por porcentaje de cannabinoide**

THC BDS	Cantidad (% de cannabinoide total)
CBO	0.23
CBG	2.34
CBD	1.17
THCV	1.29
CBN	3.51
THC (sustancias relacionadas)	0.70
THC	86.65
CBC	2.34
THCA	1.76

60 La cantidad del fitocannabinoide principal en la THC BDS como un porcentaje de la fracción que contiene fitocannabinoide es de aproximadamente 78-95 % (p/p).

65

Tabla 2.2.1 Cantidad de BDS cannabidiol en total e intervalo

CBD BDS	Cantidad (% p/p)	Intervalo (\pm 10 %)	Intervalo (\pm 25 %)	Intervalo (\pm 50 %)
CBD (sustancias relacionadas)	0.3	0.27 - 0.33	0.23 - 0.38	0.15 - 0.45
CBDV	1.9	1.71 - 2.09	1.43 - 2.38	0.95 - 2.85
CBDA	1.3	1.17 - 1.43	0.98 - 1.63	0.65 - 1.95
CBG	2.5	2.25 - 2.75	1.88 - 3.13	1.25 - 3.75
CBN	0.2	0.18 - 0.22	0.15 - 0.25	0.1 - 0.3
CBD	70.0	63.0 - 77.0	52.5 - 87.5	35.0 - 100.0
THC	5.5	4.95 - 6.05	4.13 - 6.88	2.75 - 8.25
CBC	5.6	5.04 - 6.16	4.20 - 7.00	2.80 - 8.40
Cannabinoides totales	87.30			
No cannabinoides totales	12.70			

La fracción total que contiene fitocannabinoide de CBD BDS comprende aproximadamente de 79-96 % (p/p) de la BDS total.

Tabla 2.2.2 BDS cannabidiol por porcentaje de cannabinoide

CBD BDS	Cantidad (% de cannabinoide total)
CBD (sustancias relacionadas)	0.34
CBDV	2.18
CBDA	1.49
CBG	2.86
CBN	0.23
CBD	80.18
THC	6.30
CBC	6.41

La cantidad del fitocannabinoide principal en la CBD BDS como un porcentaje de la fracción que contiene fitocannabinoide es de aproximadamente 72-88 % (p/p).

La siguiente tabla detalla una visión general de la cantidad de la fracción cannabinoide y no cannabinoide en cada BDS de cannabinoides y la cantidad de cannabinoide como un porcentaje de los cannabinoides totales en cada BDS. Como se analizó anteriormente el experto apreciará que estos valores variarán debido a la naturaleza de origen natural del material vegetal de partida.

Tabla 2.3.1 Visión general de BDS de cannabinoides

BDS	Fracción cannabinoide (% p/p)	Fracción no cannabinoide (% p/p)	Cantidad del cannabinoide principal (% de cannabinoide total)
THC	85.4	14.6	86.7
CBD	87.3	12.7	80.2

Se prefiere maximizar la cantidad de fitocannabinoide principal en la fracción que contiene fitocannabinoide, sin embargo, en algunos casos puede existir sinergismo entre los cannabinoides principales y secundarios lo que puede conducir a mejores efectos medicinales.

5 Se prefiere además que el intervalo en el cual el porcentaje de la fracción que contiene fitocannabinoide, la fracción que no contiene fitocannabinoides y la cantidad de fitocannabinoide principal varíe. En la mayoría de los casos esta variación será pequeña y estará en el intervalo de $\pm 5\%$, hasta $\pm 10\%$, hasta $\pm 25\%$ y preferentemente no mayor que $\pm 50\%$.

10 **Ejemplo 3**

Efecto de los fitocannabinoides en células de glioma humano sobre la vitalidad celular (ensayo de MTT)

15 Las células se sembraron en presencia de FBS en placa de 6 pocillos con una densidad de 8×10^4 células/pocillo. Las células de glioma se trataron con concentraciones crecientes de los compuestos y la viabilidad celular se evaluó mediante la tinción con MTT.

CBD BDS y CBD, CBG y CBDV aislados se analizaron.

20 La Tabla 3.1 detalla los datos observados. Como puede observarse la CBD BDS produjo el mejor resultado, donde la menor concentración fue un poco más eficaz que su fitocannabinoide aislado respectivo.

Tabla 3.1: Efecto de fitocannabinoides sobre la vitalidad celular (Ensayo de MTT)

25

Muestra	IC ₅₀ sobre la vitalidad de células de glioma
CBD	8.92 μ M
CBD BDS	8.83 μ M
CBG	12.40 μ M
CBDV	12.40 μ M

30

35

Como puede observarse estos datos indican que tanto CBD BDS como el CBD aislado podrían ser tratamientos útiles en tumores cerebrales que incluyen el glioma.

40 **Ejemplo 4**

Efecto de los cannabinoides THC y CBD solos y en combinación entre sí y/o el agente quimioterapéutico temazolamida sobre la viabilidad de líneas celulares de glioma humano (ensayo de MTT)

45 La acción sinérgica de la administración combinada de los fitocannabinoides THC y CBD en cantidades iguales se analizó en líneas celulares de glioma humano. La administración combinada de los dos fitocannabinoides condujo a una reducción sinérgica en la viabilidad de las células de glioma humano durante un ensayo de MTT.

50 La Tabla 4.1 más abajo muestra que los niveles de dosis subeficaces de THC y CBD (0,7 μ M) conduce a una reducción estadísticamente significativa en la viabilidad celular cuando se combinan los dos cannabinoides. La viabilidad celular se reduce drásticamente cuando los niveles de dosis de THC y CBD se incrementan.

Tabla 4.1: Viabilidad celular de células de glioma U87 tratadas con THC, CBD y THC:CBD (1:1)

55

Compuesto	Nivel de dosis (μ M)	Viabilidad celular (%)
Control	-	100
THC	0.7	100
CBD	0.7	115

60

65

Compuesto	Nivel de dosis (µM)	Viabilidad celular (%)
HC:CBD (1:1)	0.7 (cada uno)	90
THC	0.9	92
CBD	0.9	95
THC:CBD (1:1)	0.9 (cada uno)	70
THC	1.2	80
CBD	1.2	70
THC:CBD (1:1)	1.2 (cada uno)	35

Otros experimentos se realizaron con el uso del agente quimioterapéutico temazolamida (TMZ), estos datos se muestran en la Tabla 4.2 más abajo.

Tabla 4.2: Viabilidad celular de células de glioma U87 tratadas con THC, CBD, THC:CBD (1:1) y TMZ

Compuesto	Viabilidad celular (%)
Control	100
THC (1 µM)	115
CBD (1 µM)	98
TMZ (100 µM)	82
THC:CBD (1 µM cada uno)	55
THC (1 µM) + TMZ (100 µM)	70
CBD (1 µM) + TMZ (100 µM)	65
THC:CBD (1 µM cada uno) + TMZ (100 µM)	38

La administración combinada de dosis submáximas de THC, CBD y TMZ condujo a una reducción sinérgica de la viabilidad de las células de glioma U87.

Ejemplo 5

Efecto de los cannabinoides THC y CBD solos y en combinación entre sí y/o el agente quimioterapéutico temazolamida sobre la viabilidad de xenoinjertos de glioma humano

La Tabla 5.1 más abajo detalla los datos registrados cuando los fitocannabinoides THC y CBD se analizaron solos o en combinación sobre tumores de xenoinjertos de glioma humano.

La dosis equivalente humana (HED) puede estimarse mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$HED = \text{Dosis animal (mg/kg)} \times \frac{K_m \text{ animal}}{K_m \text{ Humano}}$$

La K_m para un ratón es 3 y la K_m para un ser humano es 37.

Tabla 5.1: Volumen tumoral después del tratamiento con THC, CBD y THC:CBD (1:1)

Compuesto	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen tumoral (aumento a partir del día 1)
Control	-	10.3
THC	3.7	8.7
CBD	3.7	9.1
THC:CBD (1:1)	3,7 (cada uno)	8.9
THC	7.5	8.5
CBD	7.5	8.9
THC:CBD (1:1)	7,5 (cada uno)	5.7
THC	15.0	5.8
CBD	15.0	7.6

Los fitocannabinoides se analizaron además con la TMZ como se detalla en la Tabla 5.2 más abajo.

Tabla 5.2: Volumen tumoral después del tratamiento con THC, CBD, THC:CBD (1:1) y TMZ

Compuesto	Volumen tumoral (aumento a partir del día 1)
Control	10.3
THC:CBD (3.7 mg/kg cada uno)	8.9
TMZ (100 µM)	4.1
THC:CBD (3.7 mg/kg cada uno) + TMZ (100 µM)	2.6

Reivindicaciones

- 5 1. Una combinación de los fitocannabinoides tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) junto con temozolomida, para usar en el tratamiento de un glioma.
2. La combinación de los fitocannabinoides THC y CBD junto con temozolomida para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la combinación de los fitocannabinoides y la temozolomida se empacan para la administración de manera separada, simultánea o secuencial.
- 10 3. La combinación de los fitocannabinoides THC y CBD junto con temozolomida para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el nivel de dosis de los fitocannabinoides es subeficaz para el tratamiento del glioma si se usan solos.
- 15 4. La combinación de los fitocannabinoides THC y CBD junto con temozolomida para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en donde el nivel de dosis de la temozolomida es subeficaz para el tratamiento del glioma si se usa sola.

Figura 1: Visión general de la preparación de la Sustancia farmacológica botánica (BDS)

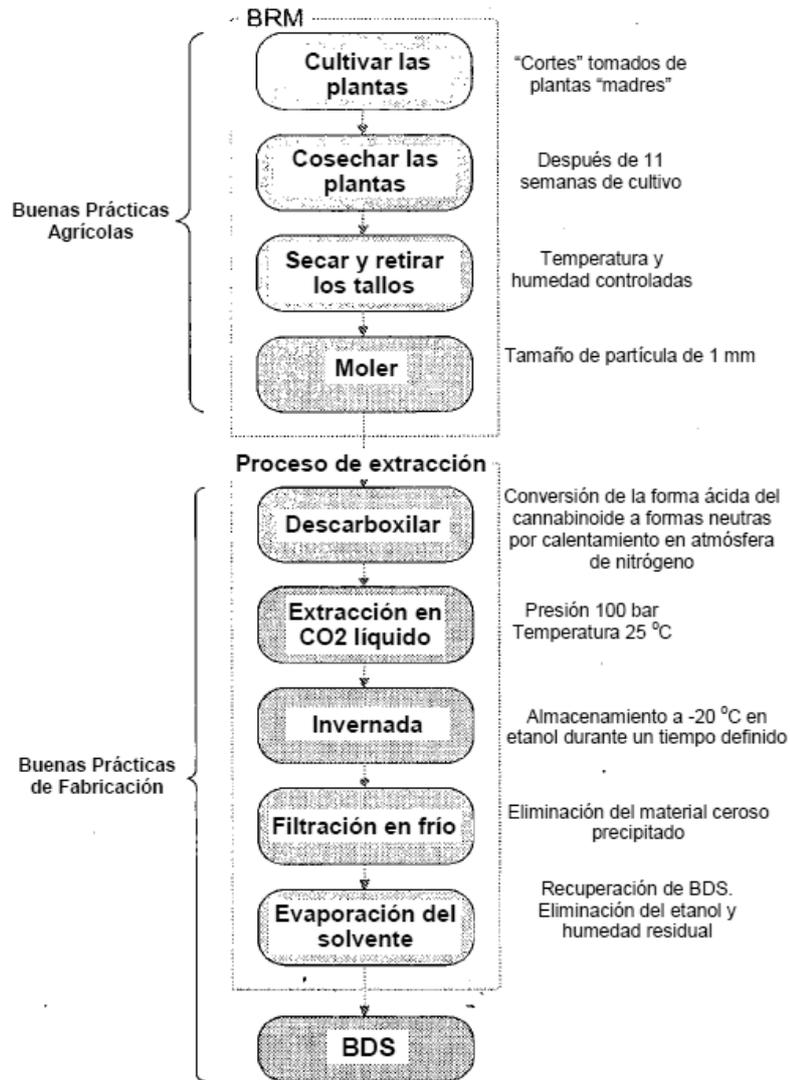


Figura 2: Efecto de los cannabinoides sobre la apoptosis en la línea celular de cáncer de próstata insensible a hormonas (DU-145) y la línea celular de cáncer de próstata sensible a hormonas (LNCaP)

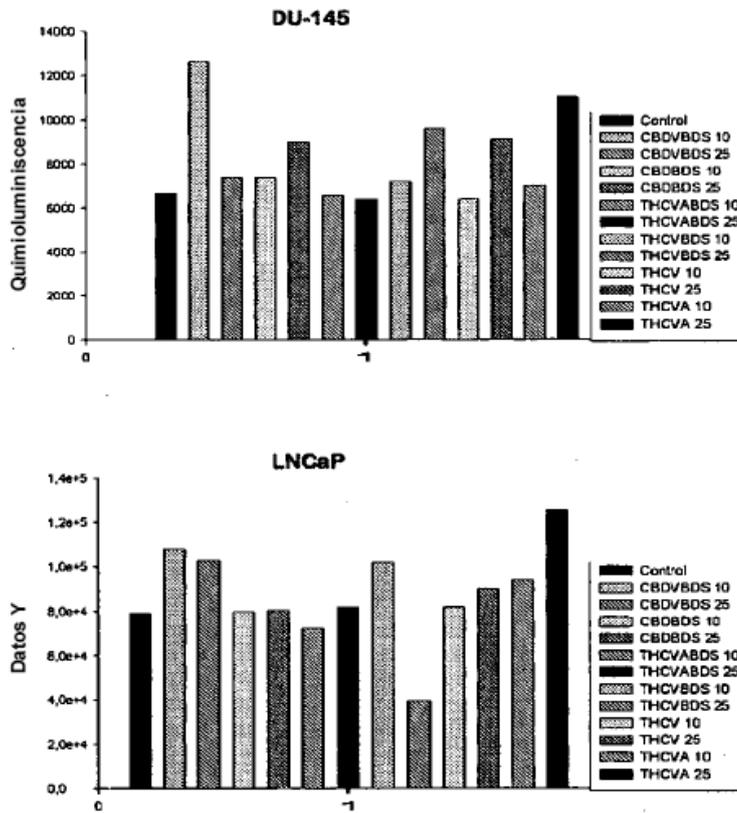
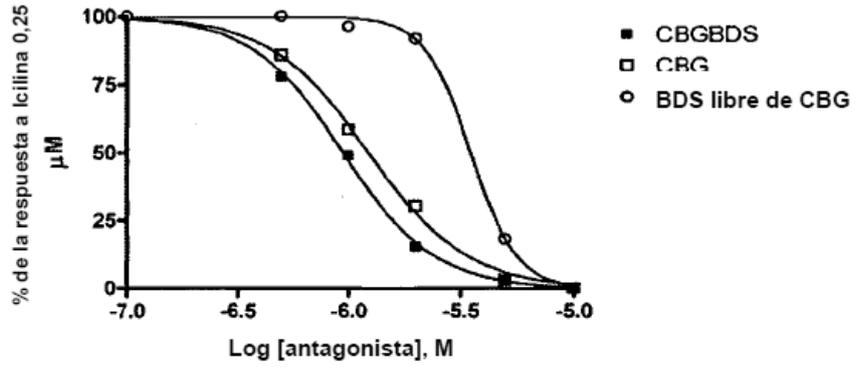


Figura 3: Efecto de la BDS de cannabinoides real y reconstituida sobre el antagonismo con TRPM8

BDS reconstituida



BDS real

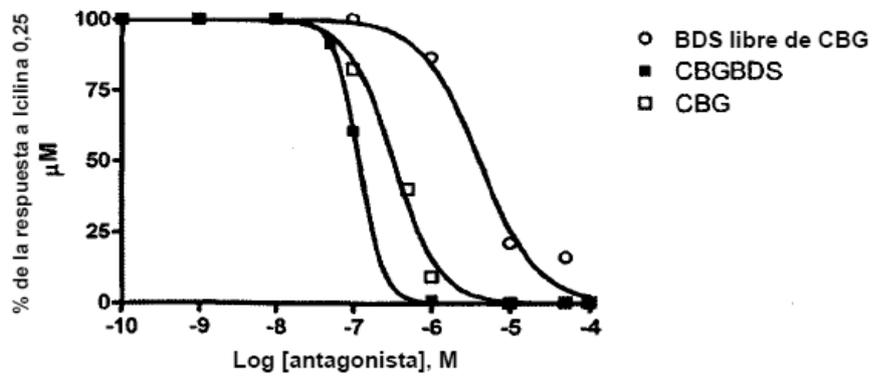
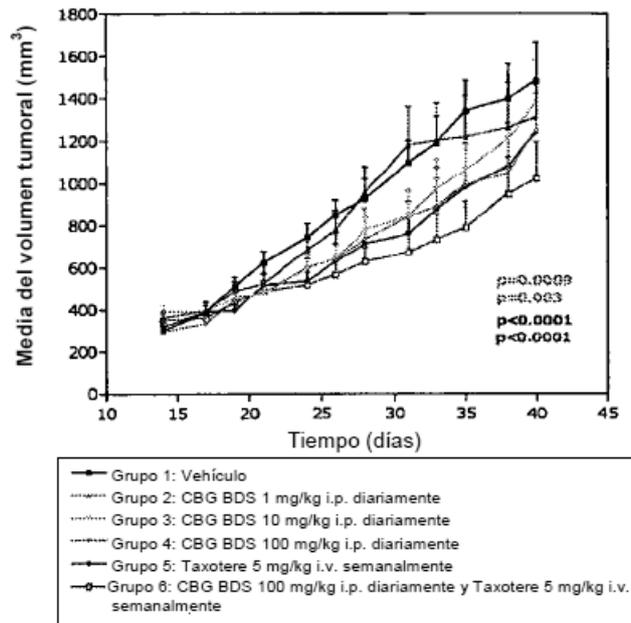
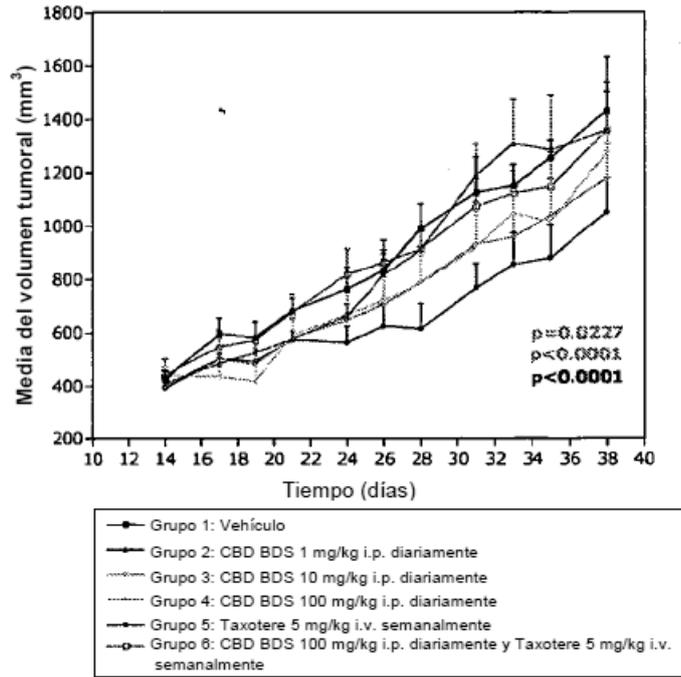


Figura 4: Efecto de cannabinoides solos o en combinación con un agente quimioterapéutico en la línea celular de cáncer de próstata insensible a hormonas (DU-145) y la línea celular de cáncer de próstata sensible a hormonas (LNCaP) en un modelo de xenoinjerto subcutáneo.

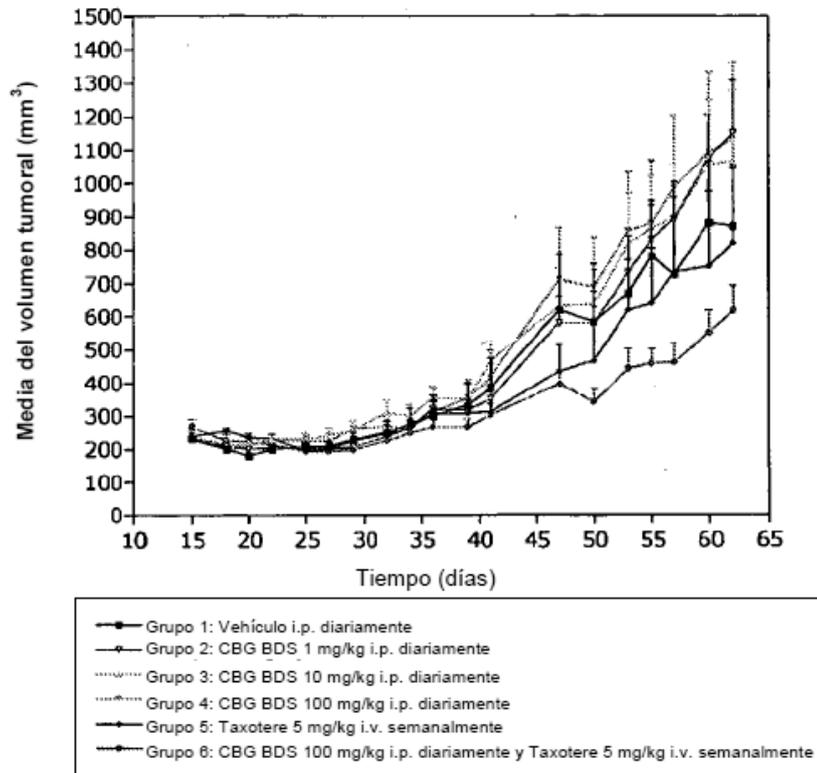
a) CBG BDS solo o en combinación con Taxotere en un modelo de xenoinjerto de LNCaP



b) CBD BDS solo o en combinación con Taxotere en un modelo de xenoinjerto de LNCaP



c) CBG BDS solo o en combinación con Taxotere en un modelo de xenoinjerto de DU-145



d) CBD BDS solo o en combinación con Taxotere en un modelo de xenoinjerto de DU-145

CSU1403: DU145

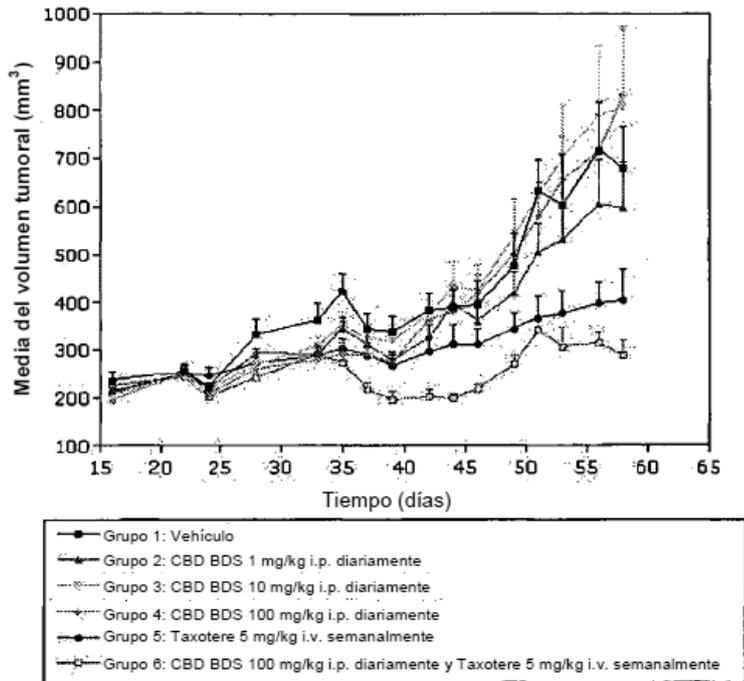
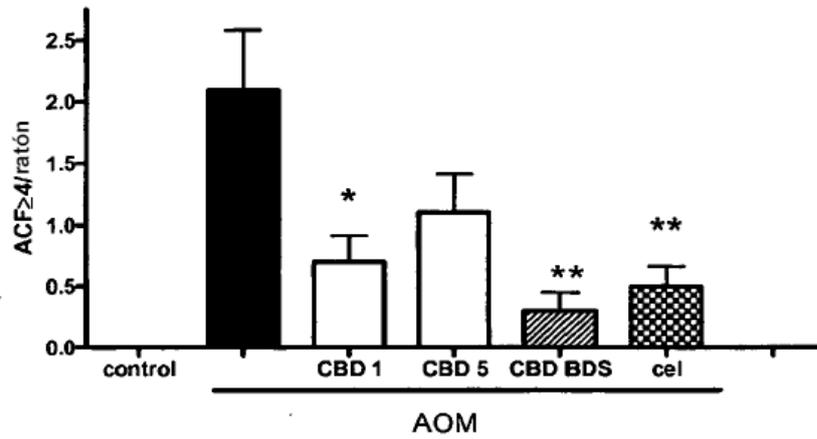
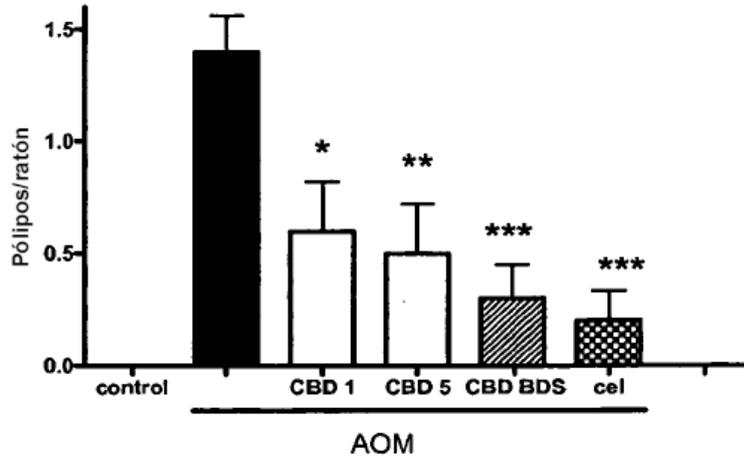


Figura 5: Efecto de los cannabinoides aislados CBD y CBD BDS en la carcinogénesis de colon en el ratón

b) Número de focos de criptas aberrantes (ACF) por ratón



a) Número de pólipos por ratón



c) Número de tumores por ratón

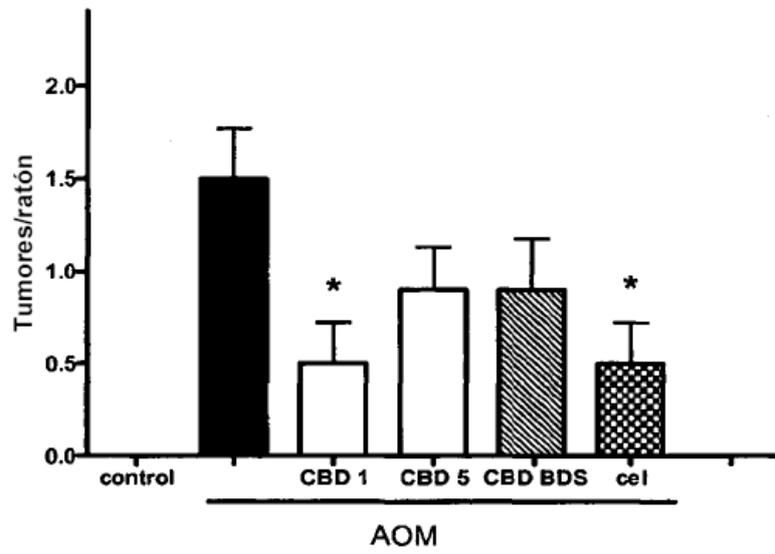
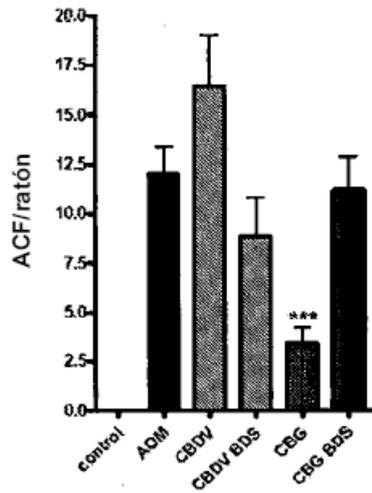
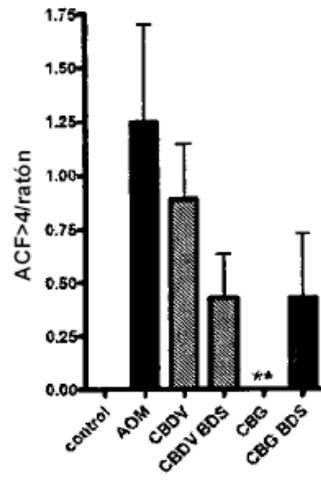


Figura 6: Efecto de los cannabinoides CBG aislado, CBDV aislado, CBG BDS y CBDV BDS en la carcinogénesis de colon en el ratón

a) Número de focos de criptas aberrantes (ACF) por ratón



b) Número de focos de criptas aberrantes (ACF) con 4 o más criptas por ratón



c) Número de tumores por ratón

