(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 657 940**

(51) Int. Cl.:

C07C 50/28 (2006.01)
C07C 50/38 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2010** **PCT/ES2010/070156**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011** **WO11117429**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2010** **E 10712954 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 2551255**

(54) Título: **Derivados de quinona de cannabinoides**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2018

(73) Titular/es:

EMERALD HEALTH PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
5820 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121, US

(72) Inventor/es:

MUÑOZ BLANCO, EDUARDO;
APPENDINO, GIOVANNI y
BELLIDO CABELLO DE ALBA, MARÍA LUZ

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 657 940 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

Derivados de quinona de cannabinoides

Campo de la invención

La presente invención se refiere a derivados de quinona de cannabinoides para ser utilizados como medicamentos, particularmente como agonistas del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPARg) para tratar enfermedades cuya etiología se basa en una función alterada del PPARg como factor de transcripción, es decir, enfermedades relacionadas con PPARg.

Debido a la expresión casi ubicua del PPARg en diferentes tejidos, la presente invención puede englobarse en el campo médico, en general, y más específicamente, en aquel campo de la medicina que trata con el tratamiento de enfermedades, que comparten la etiología mencionada anteriormente, ejerciendo un efecto agonista sobre PPARg.

Estado de la técnica

PPARg es un miembro de la subfamilia PPAR de receptores hormonales nucleares que son factores de transcripción inducibles por ligando. Los PPAR forman heterodímeros con su obligada pareja el receptor X retinoide (RXR). Todos los isotipos PPAR tienen una organización de dominios similar: el dominio N-terminal A/B contiene una función de activación 1 de la transcripción independiente de ligando putativo (AF-1). El dominio C de unión a ADN, compuesto de dos dedos de cinc, se une al elemento de respuesta al proliferador de peroxisomas (PPRE) en la región reguladora de los genes diana de PPAR. El dominio D es una región bisagra que confiere flexibilidad entre el dominio C y el dominio E (dominio de unión al ligando o LBD) que contiene la función de activación 2 de la transcripción dependiente de ligando (AF-2). La actividad transcripcional de los PPAR es regulada no sólo por sus lígandos, sino también por modificaciones post-traduccionales, tales como la fosforilación.

PPARg se expresa en un intervalo de tejidos que incluye células del músculo esquelético, osteoclastos, osteoblastos, varios tipos de células inmunes y en el cerebro y sistema nervioso periférico. El tejido adiposo exhibe los mayores niveles de expresión de PPARg en el cuerpo humano.

PPARg es de especial interés puesto que está implicado en la regulación de la formación de adipocitos, en la sensibilidad a la insulina y en la inflamación (Fievet *et al*. 2006; Stienstra *et al*. 2007; Tontonoz y Spiegelman, 2008). Es obvio que PPARg es el regulador dominante o "principal" de la adipogénesis, debido al hecho de que es suficiente y necesario para la diferenciación de los adipocitos. Las regiones reguladoras de un gran número de genes que desempeñan importantes papeles en la lipogénesis y sensibilidad a la insulina contienen sitios de unión para PPARg, incluyendo aP2, LPL, adiponectina, y Glut4 (Rosen y MacDougald, 2006).

Por otra parte, la activación de PPARs ejerce actividades antiinflamatorias en varios tipos de células mediante la inhibición de la expresión de genes pro-inflamatorios, reduciendo así la producción de citoquinas, metaloproteasas y proteínas de fase aguda. También actúa aumentando las citoquinas antiinflamatorias e inhibiendo la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (véase Széles *et al*., 2007 para una reciente revisión). Los PPAR regulan negativamente la transcripción de genes de respuesta inflamatoria al antagonizar las vías de señalización de AP-1, del factor nuclear kappaB (NF-KB), del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) y del factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT) (Vanden Berghe *et al*. 2003). Cabe destacar que los PPAR también estimulan el catabolismo de los eicosanoides pro-inflamatorios (Delerive *et al*. 2001).

PPARg ha sido reconocido por desempeñar un papel de importancia fundamental en la respuesta inmunitaria a través de su capacidad para inhibir la expresión de citoquinas inflamatorias y dirigir la diferenciación de células inmunes hacia fenotipos antiinflamatorios (Tontonoz y Spiegelman, 2008).

Los efectos antiinflamatorios de PPARg están estrechamente vinculados a sus efectos antidiabéticos. La activación por ligando de PPARg en adipocitos está asociada con la disminución de la producción de proteínas llamadas adipocinas (TNFα, IL-6, resistina, etc.) que se cree que causan resistencia a la insulina. Por lo tanto, la activación de PPARg en el tejido adiposo afecta a la sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo mediante la alteración de la producción de adipocinas. Esta es la razón por la cual los activadores de PPARg, tales como las tiazolidinedionas (TZDs, p. ej., rosiglitazona, piaglitazona) se utilizan clínicamente en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Lehmann *et al*., 1995).

Además, se ha demostrado que los agonistas de PPARg tienen efectos cardiovasculares positivos, los cuales incluyen una disponibilidad aumentada de óxido nítrico, reducción en la presión arterial y atenuación de la aterosclerosis (Bishop-Bailey, 2000; Hsueh y Bruemmer, 2004).

Por lo tanto, los agonistas de PPARg son un tratamiento adecuado para un grupo de anomalías metabólicas, llamadas en su conjunto síndrome metabólico y que incluyen una presión arterial elevada, un nivel de triglicéridos elevado, un nivel bajo de lipoproteínas de alta densidad (C-LAD), obesidad abdominal, inflamación, resistencia a la

insulina, y nivel elevado de glucosa en sangre (Lottenberg *et al*., 2007; Murphy y Holder, 2000). El síndrome metabólico tiene como causa principal la resistencia a la insulina, que es secundaria al exceso abdominal o al tejido adiposo visceral.

Cabe destacar que los agonistas de PPARg han demostrado efectos antiinflamatorios y neuroprotectores en varios modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple y apoplejía, así como en algunos estudios clínicos (Bernardo y Minghetti, 2008).

Adicionalmente, PPARg ha de de considerarse formalmente un gen supresor de tumores en el sentido genético. Se expresa en varias células tumorales y la activación de PPARg mediante ligando conduce tanto a la inhibición de la proliferación celular como a la inducción de la apoptosis (Tachibana *et al*., 2008; Tontonoz y Spiegelman, 2008).

Los efectos beneficiosos de la activación de PPARg pueden utilizarse para el tratamiento de varias enfermedades, como se muestra en la **Tabla 1**. Esta tabla resume las acciones de los PPAR en las enfermedades inflamatorias. Abreviaturas: ↓ inhibición, ↑ estimulación, células estrelladas hepáticas (CEH), células del músculo liso vascular (CMLV), proteína-1 de quimioatracción de monocitos (MCP-1), T-auxiliar (Th), factor de necrosis tumoral α (TNFa), ciclooxigenasa (COX), interferón-gamma (INFy), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1). Adaptado de Kostadinova *et al*., 2005.

Tabla 1

Enfermedad	**Efecto de PPARγ y sus ligandos**
Aterosclerosis	↓Reclutamiento de células inmunes ↓Migración y proliferación de CMLV.
Enfermedades intestinales inflamatorias	↓IL-1β-inducida, IL-8 y MCP-1 en células epiteliales del colon. Modulación de la respuesta inflamatoria: ↓Th1 y ↑Th2. Mejora de la colitis en modelos de ratones. Mejora de la colitis en 4/15 pacientes.
Artritis reumatoide	↑Sinoviocitos y apoptosis de condrocitos. ↓TNFα, IL-1β y COX-2 en sinoviocitos reumatoides. Mejora de la artritis en modelos de ratones.
Fibrosis hepática	↓Activación de las CEH. ↓Activación de las células de Kupffer.
Nefropatía	↓IL-1β, MCP-1, COX-2, iNOS, proliferación y ↑apoptosis de las células mesangiales. Mejora de la micro-albuminuria en pacientes con diabetes tipo 2 y ratas diabéticas.
Psoriasis y cicatrización cutánea	Mejora de las lesiones de psoriasis en modelos de ratón y pacientes.
Pancreatitis	↓Desarrollo de pancreatitis crónica en modelos de ratón.
Gastritis	↓TNFα, iNOS, IL-1β, COX-2 y apoptosis en la mucosa gástrica. Mejora de la gastritis en modelos de ratón.
Trastornos neurodegenerativos	↓iNOS, TNFα, IL-1β, IL-6, INFy, MCP-1 y COX-2 en astrocitos y microglía. ↓Apoptosis neuronal.
Cáncer	↑Apoptosis y ↓proliferación de células cancerígenas. ↓Cáncer de colon asociado con colitis en modelos de ratón.

Se reconoce generalmente que existen varios efectos secundarios asociados con los ligandos de PPARg, incluyendo ganancia de peso, edema y aumento de lipoproteínas del plasma (Gelman *et al*., 2007). Se están investigando actualmente nuevos agonistas de PPARg que no posean estos efectos secundarios, y se sugiere que los agonistas de afinidad parcial o baja pueden ser beneficiosos (Gelman *et al*., 2007).

La unión directa de cannabinoides a PPARs ha sido demostrada en varios estudios a través de ensayos de genes indicadores o ensayos de adipogénesis en 3T3-L1. Estos incluyen oleiletanolamida (Fu *et al*., 2003), ácido ajulémico (Liu *et al*., 2003; Burstein, 2005), 2-araquidonoilglicerol (Burstein, 2005), anandamida (Bouaboula *et al*., 2005), WIN55212-2, noladín éter y virodamina (Sun *et al*., 2007), Δ^9-THC (O'Sullivan *et al*., 2005), y CBD (O'Sullivan *et al*., 2009). Se ha descrito que alguno de ellos interaccionan con el dominio LBD de PPARg (Liu *et al*. 2003; O'Sullivan *et al*., 2009). Sin embargo, la activación de PPAR no es común a todos los cannabinoides (LoVerme *et al*., 2006; Bouaboula *et al*., 2005; Fu *et al*., 2003). La activación de PPAR mediante cannabinoides se ha sugerido en algunas revisiones (O'Sullivan y Kendall, 2009; Burstein, 2005; O'Sullivan, 2007; Sun y Bennett, 2007). No obstante, nunca se han notificado los derivados de quinona de cannabinoides por su actividad PPARg.

Como se muestra en los ejemplos comparativos llevados a cabo en la presente invención, desafortunadamente muchos de esos agonistas de PPARg conocidos, particularmente algunos derivados de cannabinoides, exhiben una baja eficacia de unión a PPARg y por lo tanto, un efecto agonista de PPARg reducido. Además, aún peor, algunos de ellos muestran una elevada toxicidad en varios tipos celulares (citotoxicidad).

Por lo tanto, considerando la disposición ubicua de PPARg en los tejidos, y por consiguiente la elevada cantidad de enfermedades relacionadas con PPARg que existen, el desarrollo de agonistas de PPARg sintéticos, con una mayor eficacia de unión a PPARg en comparación con los agonistas de PPARg conocidos y por consiguiente, siendo capaces de ejercer un mayor efecto agonista de PPARg, tanto *in vitro* como *in vivo*, sería de suma importancia y ayuda la mejora de la condición de pacientes que padecen enfermedades relacionadas con PPARg. Además, sería deseable que esos agonistas de PPARg exhibieran baja toxicidad en las células (baja citotoxicidad).

La presente invención da un nuevo paso adelante hacia la solución del problema anterior, desarrollando compuestos innovadores adecuados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con PPARg debido a su elevado efecto agonista de PPARg y baja citotoxicidad.

El documento WO 2005/067917 desvela derivados de quinoides de cannabinoides y su uso terapéutico en enfermedades hiperproliferativas tales como carcinoma, linfoma, melanoma, glioblastoma y sarcoma.

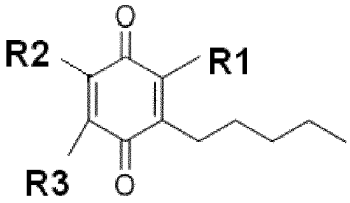
El documento WO 2008/107878 desvela derivados de quinoides, y desvela que éstos tienen una actividad antineoplásica y anticancerosa y puede utilizarse en composiciones farmacéuticas.

Descripción

La presente invención se centra en la materia objeto de las reivindicaciones 1 a 11.

Asimismo se desvela en la presente memoria la formulación de derivados de cannabinoides, particularmente derivados de quinona (Q) de cannabinoides, sintetizados partiendo de cannabinoides naturales tales como CBD (cannabidiol) y CBG (cannabigerol) por medio de la sustitución de algunos radicales específicos.

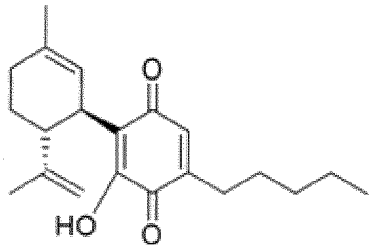
Los compuestos también desvelados en la presente memoria son compuestos de quinona (Q) de cannabinoides de Fórmula (I):



(I)

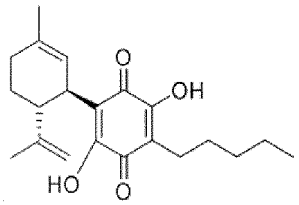
en la que

R1 significa un grupo hidrógeno, hidroxilo, metilo o aldehído,
R2 significa un derivado de ciclohexeno o un compuesto alifático, preferentemente un alqueno, y **R3** significa un grupo hidroxilo o metiloxi,
exceptuando el compuesto de fórmula **(II)**



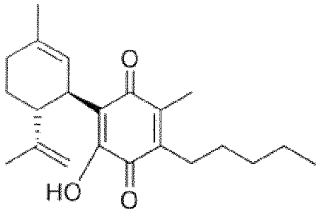
(II)

Los compuestos específicos desvelados en la presente memoria son aquellos de Fórmula **(III)**, **(IV)** y **(V)** y los de la presente invención de Fórmula **(VI)**:



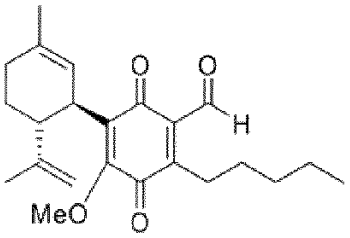
(III)

Hidroxi-CBD-Q (H-CBD-Q)



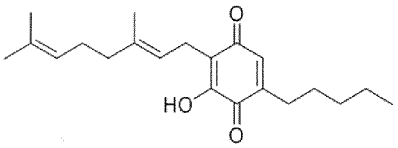
(IV)

Metil-CBD-Q (M-CBD-Q)



(V)

Formil-metoxi-CBD-Q (FM-CBD-Q)



(VI)

CBG-Q

Como se deducirá a continuación a partir de los ejemplos y figuras, el grupo quinona (Q) comprendido en la Fórmula I general confiere a los compuestos desvelados la capacidad de unirse directamente a PPARg, siendo dichos compuestos buenos candidatos agonistas de PPARg. Además, la presente divulgación también muestra que dicha capacidad de unión directa a PPARg es incluso más eficiente cuando los compuestos tienen una fórmula que comprende dicho grupo quinona en combinación con los radicales **R1**, **R2** y **R3** citados anteriormente, estos compuestos también muestran un nivel bajo de citotoxicidad valorable en varias estirpes celulares en comparación con los compuestos comprendidos en el estado de la técnica.

Como se muestra en las **Figuras 1 y 2**, el compuesto de la invención, CBG-Q, se une directamente a PPARg, con un valor CI_{50} de 2,2 y, de este modo, mucho más bajo que el valor CI_{50} del compuesto conocido CBD-Q y CBN. Esta conclusión mostrada en las **Figuras 1 y 2** es ratificada además por la **Figura 3**, mostrando que CBG-Q es capaz de inducir la activación de PPARg con mayor eficacia que CBG **(Figura 3B)** y también, que CBD y CBD-Q **(Figura 3A)**. La estimulación de la diferenciación de fibroblastos a adipocitos es una propiedad bien conocida de los ligandos de

PPARg y esta función se llevó claramente a cabo por CBG-Q, el cual, como se muestra en la **Figura 4**, fue capaz de estimular la diferenciación de fibroblastos a adipocitos de una forma más fuerte que CBG.

Además, como se muestra en la **Figura 8A**, los derivados de CBD-Q desvelados (M-CBD-Q, H-CBD-Q y FM-CBD-Q) son capaces de inducir la activación de PPARg con mayor eficacia que CBD-Q, mostrando a FM-CBD-Q como el mayor valor de activación de PPARg. Adicionalmente, la **Figura 8B** confirma que las modificaciones químicas introducidas en CBD-Q (M-CBD-Q, H-CBD-Q y FM-CBD-Q) mantuvieron o, en el caso de FM-CBD-Q incluso aumentaron, la afinidad por PPARg. Estos resultados se confirmaron en cultivos celulares, examinando la capacidad para estimular la diferenciación a adipocitos en fibroblastos 3T3L1, mostrando que los derivados de CBD-Q (M-CBD-Q, H-CBD-Q y FM-CBD-Q), particularmente FM-CBD-Q, estimularon la diferenciación de fibroblastos a adipocitos de una forma más potente que CBD y CBD-Q, y sin el efecto citotóxico observado para CBD-Q (véase el **Ejemplo 7**) a una concentración superior a 1 μM (**Figura 8C**).

Todos los datos inferidos de las **Figuras 1** a **4** y **8** muestran que M-CBD-Q, H-CBD-Q, FM-CBD-Q y CBG-Q son ligandos de PPARg capaces de unirse a PPARg y aumentar su actividad transcripcional de una forma más eficiente en comparación con compuestos conocidos (CBD-Q y CBN).

Por lo tanto, los compuestos desvelados en la presente memoria pueden ser utilizados como agonistas de PPARg para el tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en una función alterada de PPARg como factor de transcripción (enfermedades relacionadas con PPARg) tales como, por ejemplo, enfermedades metabólicas (hipertensión, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia (HDL-C), obesidad), enfermedades inflamatorias (véase la **Tabla 1**) (aterosclerosis, enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide, fibrosis hepática, neuropatía, psoriasis, cicatrización cutánea, regeneración de la piel, pancreatitis, gastritis, trastornos neurodegenerativos y cáncer), diabetes tipo II (resistencia a la insulina) o nivel elevado de glucosa en sangre.

Como se muestra en la **Figura 5**, CBG y CBG-Q tienen efectos positivos como compuestos antiinflamatorios en el tejido adiposo y, por lo tanto, son adecuados como agonistas de PPARg para el tratamiento de la diabetes tipo II por medio de la disminución de la resistencia a la insulina. Además, como se elucida en la **Figura 6**, ambos compuestos CBG y CBG-Q fueron capaces de aumentar la absorción de glucosa tanto en presencia como en ausencia de insulina, pero mostrando a CBG-Q con un mayor efecto que CBG en ausencia de insulina. De este modo, aunque CBG y CBG-Q son adecuados como agonistas de PPARg para el tratamiento de la diabetes tipo II por medio de la disminución de la resistencia a la insulina, CBG-Q es particularmente preferente ya que puede utilizarse para el tratamiento de la diabetes tipo II por medio de la disminución de la resistencia a la insulina a través de la reducción de las condiciones pro-inflamatorias del tejido adiposo y, además, a través del aumento de la absorción de glucosa, además en ausencia de insulina, sin tener el efecto adicional observado en el desarrollo de osteoporosis cuando se emplean compuestos conocidos tales como TZD rosiglitazona **(Figura 7)**. Además, también se confirmó que FM-CBD-Q era capaz de aumentar la absorción de glucosa en presencia de insulina. (**Figura 9**). Por lo tanto, los compuestos desvelados en la presente memoria son particularmente adecuados como agonistas de PPARg, particularmente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (véase la **Tabla 1** del estado de la técnica), enfermedades metabólicas y diabetes tipo II.

Si bien todos los compuestos desvelados en la presente memoria mostraron buenas propiedades como agonistas de PPARg, y por lo tanto, ninguno de ellos debería ignorarse, CBG-Q y FM-CBD-Q son particularmente preferidos debido a su aumento en la actividad de PPARg tanto *in vivo* como *in vitro*, así como por su efecto mejorado en la sensibilidad a la insulina, y también por su baja citotoxicidad.

Los compuestos desvelados en la presente memoria también comprenden sus formas tautoméricas, esteroisómeros, polimorfos, sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables y composiciones que contienen los mismos.

De este modo, los compuestos desvelados en la presente memoria pueden utilizarse solos o formulados en composiciones, particularmente composiciones farmacéuticas, junto con otros principios activos (por ejemplo otros derivados de cannabinoides) o excipientes tales como: co-solventes, surfactantes, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizantes y antioxidantes. Cualquier tampón farmacéuticamente aceptable puede utilizarse, p. ej., TRIS o tampones fosfato.

Las composiciones típicas incluyen los compuestos desvelados en la presente memoria, asociados con excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden ser un portador o un diluyente. Tales composiciones pueden encontrarse en forma de cápsula, sobre, papel u otro envase. Para la fabricación de las composiciones pueden utilizarse técnicas convencionales para la preparación de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, el compuesto de interés se mezclará normalmente con un portador o diluido por un portador, o contenido en un portador que puede encontrarse en forma de ampolla, cápsula, sobre, papel u otro envase. Cuando el portador sirve como diluyente, éste puede ser un material sólido, semi-sólido o líquido que actúa como vehículo, excipiente o medio para el compuesto activo. El compuesto de interés puede ser absorbido en un envase granular sólido, por ejemplo, en un sobre. Algunos ejemplos de portadores adecuados son agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrina, amilosa,

estearato de magnesio, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, ácido esteárico o ésteres de celulosa de alquil inferior, ácido silícico, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, pentaeritritol, ésteres de ácidos grasos, polioxietileno, hidroximetilcelulosa, y polivinilpirrolidona. De forma similar, el portador o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como glicerilmonoestearato o glicerildiestearato, solo o mezclado con cera. Las formulaciones también pueden incluir agentes humectantes, emulsificantes y agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes saborizantes. Las formulaciones pueden ser formuladas para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo tras la administración al paciente mediante el empleo de procedimientos bien conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser esterilizadas y mezcladas, si se desea, con agentes auxiliares, emulsificantes, sales influyentes en la presión osmótica, tampones y/o sustancias colorantes y similares, que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos.

La vía de administración puede ser cualquier vía que transporte eficazmente el compuesto de interés al sitio de acción deseado o apropiado, tal como oral, nasal, pulmonar, transdérmica o parenteral, p. ej., rectal, subcutánea, intravenosa, intrauretral, intramuscular, intranasal, solución oftálmica o pomada.

Para la administración nasal, la preparación puede contener el compuesto de interés disuelto o suspendido en un portador líquido, en particular un portador acuoso, para la aplicación en aerosol. El portador puede contener aditivos, tales como agentes solubilizantes, p. ej., propilenglicol, surfactantes, potenciadores de la absorción tales como lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina o conservantes tales como parabenos.

Como se conoce en la técnica, para la preparación de formulaciones tópicas, el compuesto de interés se coloca en un vehículo dermatológico. La cantidad del compuesto de interés a administrar y la concentración del compuesto en las formulaciones tópicas depende del vehículo, sistema de liberación o dispositivo seleccionado, la afección clínica del paciente, los efectos secundarios y la estabilidad del compuesto en la formulación. De este modo, el médico emplea la preparación apropiada que contiene una concentración apropiada del compuesto de interés y selecciona la cantidad de formulación administrada, dependiendo de la experiencia clínica con el paciente en cuestión o con pacientes similares.

Para las aplicaciones oftálmicas, el compuesto de interés es formulado en soluciones, suspensiones y pomadas apropiadas para su uso en el ojo. Las concentraciones son normalmente las discutidas anteriormente para preparaciones locales.

Para la administración oral, pueden prepararse formas de dosificación única sólida o fluida. Para la preparación de composiciones sólidas, tales como comprimidos, el compuesto de interés se mezcla en formulaciones con ingredientes convencionales, tales como talco, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, silicato de magnesio y aluminio, sulfato cálcico, almidón, lactosa, acacia, metilcelulosa y materiales funcionalmente similares como diluyentes o portadores farmacéuticos.

Las cápsulas se preparan mezclando el compuesto de interés con un diluyente farmacéutico inerte y llenando con la mezcla una cápsula de gelatina dura de tamaño apropiado. Las cápsulas de gelatina blanda se preparan mediante la encapsulación en una máquina de una suspensión del compuesto de interés con un aceite vegetal aceptable, petrolato líquido ligero u otro aceite inerte. Pueden prepararse formas de dosificación única fluida para la administración oral, tales como siropes, elixires y suspensiones. Las formas solubles en agua se pueden disolver en un vehículo acuoso con azúcar, agentes aromáticos saborizantes y conservantes para formar un sirope. Un elixir se prepara utilizando un vehículo hidroalcohólico (p. ej., etanol) con edulcorantes adecuados tales como azúcar y sacarina, junto con un agente aromático saborizante. Las suspensiones se pueden preparar con un vehículo acuoso con la ayuda de un agente de suspensión tal como acacia, tragacanto y metilcelulosa.

Las formulaciones apropiadas para su uso parenteral son evidentes para el experto en la materia, tales como el uso de soluciones o suspensiones inyectables adecuadas. La formulación, que es estéril, es adecuada para varias vías de administración tópica o parenteral, que incluyen la vía intradérmica, intramuscular, intravascular y subcutánea.

Además del compuesto de interés, las composiciones pueden incluir, dependiendo de la formulación y el modo de administración deseado, portadores o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que incluyen vehículos utilizados habitualmente para formar composiciones farmacéuticas para la administración en animales o seres humanos. El diluyente se selecciona de forma que no afecte indebidamente a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de dichos diluyentes que son especialmente útiles para las formulaciones inyectables son agua, varias soluciones salinas, soluciones de sales orgánicas o inorgánicas, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir aditivos tales como otros portadores, adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos y no inmunogénicos.

Es más, se pueden incluir en la formulación excipientes. Los ejemplos incluyen codisolventes, surfactantes, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizantes y antioxidantes. Se puede utilizar cualquier tampón

farmacológicamente aceptable, p. ej., tris o tampones fosfato. Las cantidades efectivas de diluyentes, aditivos y excipientes son aquellas cantidades que son efectivas para obtener una formulación farmacéuticamente aceptable en términos de solubilidad, actividad biológica, etc.

El compuesto de interés puede incorporarse en una microesfera. El compuesto de interés puede cargarse en microesferas de albúmina, de forma que es posible recuperar dichas microesferas en un polvo seco para su administración nasal. Otros materiales adecuados para la preparación de microesferas incluyen agar, alginato, quitosano, almidón, almidón hidroxietil, albúmina, agarosa, dextrano, ácido hialurónico, gelatina, colágeno y caseína. Las microesferas se pueden producir mediante varios procesos conocidos por el experto en la materia, tales como un proceso de secado por pulverización o un proceso de emulsificación.

Por ejemplo, las microesferas de albúmina se pueden preparar mediante la adición de albúmina sérica de conejo en tampón fosfato a aceite de oliva mediante la agitación para producir una emulsión de agua en aceite. Una solución de glutaraldehído se añade entonces a la emulsión y la emulsión se agita para reticular la albúmina. Las microesferas se pueden aislar entonces por centrifugación, el aceite se elimina y las esferas se lavan, p. ej., con éter de petróleo seguido de etanol. Finalmente, las microesferas pueden tamizarse, recogerse y secarse mediante filtración.

Las microesferas de almidón se pueden preparar mediante la adición de una solución de almidón en agua caliente, p. ej., de almidón de patata, a una solución caliente de polietilenglicol en agua mediante agitación para formar una emulsión. Cuando el sistema de dos fases se ha formado (con la solución de almidón en la fase interna), la mezcla se enfría entonces a temperatura ambiente bajo agitación continua con lo cual la fase interna se convierte en partículas de gel.

Estas partículas se filtran entonces a temperatura ambiente y se suspenden en un solvente tal como etanol, después del cual las partículas se filtran de nuevo y se dejan secar al aire.

Las microesferas pueden ser endurecidas mediante procedimientos de reticulación bien conocidos, tales como el tratamiento térmico o mediante el uso de agentes reticulantes químicos. Agentes adecuados incluyen dialdehídos, incluyendo glioxal, malondialdehído, succinicaldehído, adipaldehído, glutaraldehído y ftalaldehído, dicetonas, tales como butadiona, epiclorohidrín, polifosfato y borato. Los dialdehídos se utilizan para reticular proteínas tales como la albúmina mediante la interacción con grupos amino, y las dicetonas forman bases de Schiff con grupos amino. La epiclorohidrín activa compuestos con nucleófilos tales como amino o hidroxilo a un derivado epóxido.

La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos, p. ej., sujetos mamíferos, p. ej., seres humanos, perros, gatos y roedores, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un material activo calculado para producir el efecto farmacéutico deseado en asociación con el diluyente, portador o vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria desveladas en la presente memoria se dictan por y dependen de (a) las características única del material activo y el efecto particular a conseguir y (b) las limitaciones inherentes en la técnica para componer dicho material activo para su uso en seres humanos y animales. Ejemplos de formas de dosificación unitaria son comprimidos, cápsulas, píldoras, sobres de polvos, obleas, supositorios, gránulos, sellos, cucharaditas, cucharadas, cuentagotas, ampollas, viales, aerosoles con descargas dosificadas, múltiples segregados de cualquiera de los anteriores y otras formas que se describen en la presente memoria. Las composiciones pueden incluirse en kits, que pueden contener una o más formas de dosificación unitaria de la composición e instrucciones para su uso para tratar una o más de los trastornos descritos en la presente memoria.

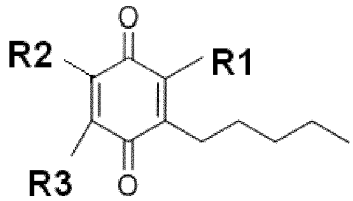
Los sistemas de administración de liberación lenta o prolongada, incluyendo cualquiera de una serie de biopolímeros (sistemas de base biológica), sistemas que emplean liposomas, coloides, resinas y otros sistemas de administración con polímeros o reservorios compartimentalizados se pueden utilizar con las composiciones descritas en la presente memoria para proporcionar una fuente continua o a largo plazo del compuesto terapéutico. Dichos sistemas de liberación lenta se aplican a formulaciones para administrarse por vías tópica, intraocular, oral y parenteral.

En el tratamiento se emplea una cantidad eficaz del compuesto de interés. La dosificación de los compuestos utilizados de acuerdo con la invención varía en función del compuesto y de la afección a tratar, por ejemplo, la edad, peso y la condición clínica del paciente receptor. Otros factores incluyen: la vía de administración, el paciente, el historial médico del paciente, la gravedad del proceso de enfermedad y la potencia del compuesto particular. La dosificación debe ser suficiente para mejorar los síntomas o signos de la enfermedad tratada sin producir una toxicidad inaceptable al paciente. En general, la cantidad eficaz del compuesto es aquella que proporciona un alivio subjetivo de los síntomas o una mejora objetivamente identificable observada por el médico u otro observador cualificado.

Los compuestos de la presente divulgación también pueden darse oralmente en combinación con compuestos naturales o sintéticos que se unen a o modifican la actividad del receptor de la vitamina D o en combinación con compuestos que se unen a o modifican la actividad del receptor X retinoide para proporcionar un efecto sinérgico en el tratamiento o la prevención de los trastornos. Ejemplos de dichos compuestos que proporcionan un efecto

sinérgico cuando se dan en combinación con los fármacos abarcados en la presente divulgación incluyen análogos de vitamina D, varios derivados del ácido retinoico y otros activadores del receptor X retinoide o receptores del ácido retinoico que incluyen, entre otros, compuestos tales como LG100268, tazaroteno, TTNPPB, AGN190121, adapaleno, o LGD1069 (Targretin).

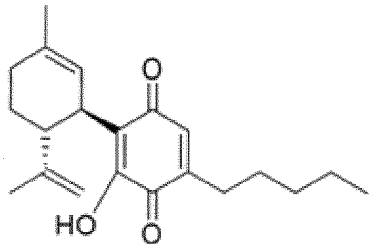
Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a compuestos de Fórmula (I) o derivados de la misma:



(I)

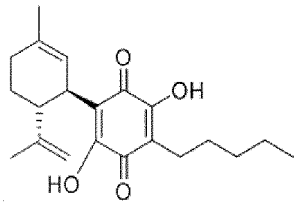
en la que

R1 significa un grupo hidrógeno, hidroxilo, metilo o aldehído,
R2 significa un derivado de ciclohexeno o un compuesto alifático, preferentemente un alqueno, y **R3** significa un grupo hidroxilo o metiloxi,
exceptuando el compuesto de fórmula **(II)**



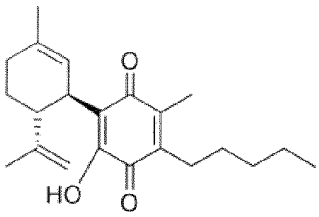
(II)

En una realización preferente, los compuestos desvelados en la presente memoria son aquellos de Fórmula **(III)**, **(IV)**, **(V)** y los de la presente invención de Fórmula **(VI)**:



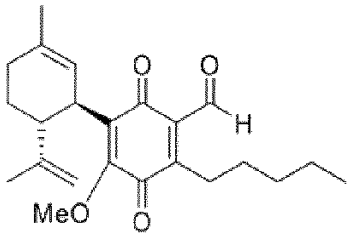
(III)

Hidroxi-CBD-Q (H-CBD-Q)



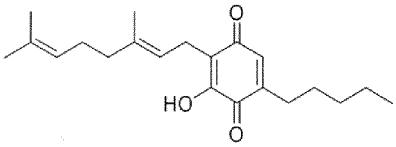
(IV)

Metil-CBD-Q (M-CBD-Q)



(V)

Formil-Metoxi-CBD-Q (FM-CBD-Q)



(VI)

CBG-Q

La segunda realización desvelada en la presente memoria se refiere al uso de un compuesto de Fórmula (VI) como medicamentos, particularmente como agonistas de PPARg en el tratamiento de enfermedades relacionadas con PPARg, seleccionadas entre enfermedades inflamatorias (por ejemplo: aterosclerosis, enfermedades intestinales inflamatorias, artritis reumatoide, fibrosis hepática, neuropatía, psoriasis, cicatrización cutánea, regeneración de la piel, pancreatitis, gastritis, trastornos neurodegenerativos o cáncer), enfermedades metabólicas (por ejemplo, hipertensión, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia (HDL-C), obesidad), y diabetes tipo II.

La tercera realización desvelada en la presente memoria se refiere al uso del compuesto de Fórmula (VI) mencionado anteriormente para la preparación de una composición para el tratamiento de enfermedades relacionadas con PPARg seleccionadas entre enfermedades inflamatorias (por ejemplo: aterosclerosis, enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide, fibrosis hepática, neuropatía, psoriasis, cicatrización cutánea, regeneración de la piel, pancreatitis, gastritis, trastornos neurodegenerativos o cáncer), enfermedades metabólicas (por ejemplo hipertensión, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia (HDL-C), obesidad), y diabetes tipo II.

La cuarta realización desvelada en la presente memoria se refiere a una composición que comprende al menos uno de los compuestos mencionados anteriormente y cualquier excipiente aceptable adecuado.

La última realización desvelada en la presente memoria se refiere a un método para el tratamiento de enfermedades relacionadas con PPARg seleccionadas entre enfermedades inflamatorias (por ejemplo: aterosclerosis, enfermedades intestinales inflamatorias, artritis reumatoide, fibrosis hepática, neuropatía, psoriasis, cicatrización cutánea, regeneración de la piel, pancreatitis, gastritis, trastornos neurodegenerativos o cáncer), enfermedades metabólicas (por ejemplo hipertensión, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia (HDL-C), obesidad), y diabetes tipo II; que comprende la administración al paciente de una cantidad eficaz de la composición anterior.

Breve descripción de las figuras

A continuación se describen brevemente las figuras de la divulgación. Se incluye una explicación en profundidad de cada figura en cada ejemplo pertinente.

Figura 1. Ensayo de unión a PPARg de algunos cannabinoides conocidos.
La concentración del compuesto ensayado (μM) se muestra en el eje x y el porcentaje de reducción de la polarización fluorescente tomado como medición de la unión a PPARg se muestra en el eje y. Esta figura muestra cómo algunos cannabinoides comprendidos en el estado de la técnica se unen directamente a PPARg, observándose los mejores valores con CBD-Q y CBN.
Figura 2. Ensayo comparativo de unión a PPARg de CBG vs CBG-Q.
La concentración del compuesto ensayado (μM) se muestra en el eje x y el porcentaje de reducción de la polarización fluorescente tomado como medición de la unión a PPARg se muestra en el eje y. Esta figura indica que CBG-Q se une directamente a PPARg, con el mejor valor de CI_{50}, en comparación con CBG y también con

los mejores compuestos conocidos mostrados en la **Figura 1** (CBD-Q y CBN). Los datos se proporcionan como medias con desviación estándar mediante barras de erros de las tres réplicas.

Figura 3. Ensayo de transactivación.

La concentración del compuesto ensayado (μM) se muestra en el eje x y el múltiplo de activación de PPARg se muestra en el eje y. Esta figura muestra el efecto de CBD y CBD-Q (**Figura 3A**) o CBG y CBG-Q (**Figura 3B**) en la actividad de PPARg, ratificando que CBG-Q es capaz de inducir la activación de PPARg con mayor eficacia que CBG, CBD y CBD-Q.

Figura 4. Ensayo de diferenciación de adipocitos.

Cuantificación de triglicéridos totales (mmol/l de 3T3-L1, eje y) en adipocitos completamente diferenciados. Los datos se proporcionan como medias con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. En todas las concentraciones ensayadas, se encontró que el derivado de CBD-Q estimula la diferenciación de fibroblastos a adipocitos. Esta figura muestra la capacidad para estimular la diferenciación de los adipocitos en fibroblastos 3T3L1 como confirmación adicional de que CBG-Q es un ligando de PPARg. Se halló que CBG-Q estimula la diferenciación de fibroblastos a adipocitos de una forma más fuerte que CBG. Tomados en conjunto, estos datos muestran por vez primera que CBG-Q es un ligando de PPARg capaz de unirse al mismo y aumentar su actividad transcripcional.

Figura 5. Efecto comparativo de CBG y CBG-Q como compuestos antiinflamatorios en tejido adiposo.

Esta figura muestra el efecto de CBG y CBG-Q en la expresión de varios genes utilizados como marcadores de la diferenciación de adipocitos (aP2 y PPARg), así como para varios genes que codifican adipoquinas (resistina, IL-6, AdipoQ). Se observó una reducción de la expresión génica de la citoquina IL-6 pro-inflamatoria, así como un aumento en la expresión génica de AdipoQ, que es la principal adipoquina antiinflamatoria. El resultado muestra que CBG y CBG-Q tienen efectos positivos como compuestos antiinflamatorios en tejido adiposo.

Figura 6. Efecto comparativo de CBG y CBG-Q en la absorción de glucosa en pre-adipocitos 3T3-L1.

Esta figura muestra que los compuestos CBG y CBG-Q son capaces de aumentar la absorción de glucosa tanto en presencia (+) como en ausencia (-) de insulina, mostrando a CBG-Q con un mayor efecto que CBG en ausencia de insulina. El eje y representa DPM del múltiplo de proteínas (μM). De este modo, CBG-Q se puede utilizar para tratar la resistencia a la insulina a través de la reducción de las condiciones del tejido adiposo pro-inflamatorio y asimismo a través del aumento de la absorción de glucosa.

Figura 7. CBG-Q como agonista de PPARg en células mesenquimales derivadas de la médula espinal. CBG-Q no inhibe la diferenciación de osteoblastos.

Esta figura muestra el efecto de CBG y CBG-Q en la expresión génica específica de adipocitos (isoforma PPARg2 y LPL) (**Figura 7B**) y la expresión génica específica de los osteoblastos (RUNX2 y ALP) (**Figura 7A**). El múltiplo de expresión génica se ilustra en el eje y. Se sabe que un aumento en la actividad de PPARg debido al tratamiento con el fármaco antidiabético tiazolidinediona (TZD) rosiglitazona resulta en un descenso del número de osteoblastos y un aumento del número de adipocitos. No obstante, esta figura muestra que no se produce ninguna alteración significativa en la expresión de genes marcadores, tanto en adipocitos (PPAR y LPL) como en osteoblastos (RUNX2 y LPL) como consecuencia del uso de CBG-Q. Este resultado indica que CBG-Q se podría utilizar como agonista de PPARg sin efectos adicionales en el desarrollo de osteoporosis.

Figura 8. Efecto de varios derivados de CBD-Q en la actividad de PPARg.

Figura 8A. La concentración del compuesto ensayado (μM) se muestra en el eje x y el múltiplo de activación de PPARg se muestra en el eje y. Los datos se proporcionan como medias con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. Se apreció un aumento significativo en la actividad de la luciferasa con los derivados de CBD-Q en comparación con CBD-Q. Este resultado indica que los derivados de CBD-Q son capaces de inducir la activación de PPARg con mayor eficacia que CBD-Q. FM-CBD-Q mostró los mayores valores de activación de PPARg.

Figura 8B. La concentración del compuesto ensayado (μM) se muestra en el eje x y el porcentaje de reducción de la polarización fluorescente tomado como medición de la actividad de PPARg en presencia de ligandos se muestra en el eje y. La CI50 se incluye en la leyenda. Los datos se proporcionan como medias con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. Esta figura indica que las modificaciones químicas de CBD-Q mantuvieron o incluso aumentaron (FM-CBD-Q) la afinidad por PPARg.

Figura 8C. Cuantificación de triglicéridos totales (mmol/l de 3T3-L1, eje y) en adipocitos completamente diferenciados. Los datos se proporcionan como medias con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. En todas las concentraciones ensayadas, se halló que los derivados de CBD-Q estimulan la diferenciación de fibroblastos a adipocitos de una forma más potente que CBD y CBD-Q, y sin el efecto citotóxico observado para CBD-Q a una concentración superior a 1 μM (observe que la barra está ausente). De nuevo, FM-CBD-Q mostró la mayor eficacia.

Figura 9. Efecto comparativo de CBD, CBD-Q y FM-CBD-Q en la absorción de glucosa en pre-adipocitos 3T3-L1.

Se sometieron a ensayo dos dosis (1 y 10 μM) en presencia de insulina (1,74 μM). Los datos se proporcionan como medias con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. El eje y representa el DPM del múltiplo de proteínas (μM). Los resultados muestran que el compuesto FM-CBD-Q es capaz de aumentar la absorción de glucosa incluso en presencia de insulina.

Ejemplos

Los ejemplos de la presente divulgación descritos a continuación pretenden ilustrar sus realizaciones preferentes sin limitar su alcance de protección.

Ejemplo 1. Ensayo de unión a PPARg.

La capacidad de los compuestos desvelados en la presente memoria para unirse al dominio de unión al ligando de PPARg se midió utilizando el kit de PolarScreen™ PPARg Competitor Assay Green (Invitrogen). Brevemente, los competidores se diluyeron en un tampón de reacción en una placa poco profunda de 384 pocillos negra (NUNC). Se añadieron entonces el dominio de unión de ligando a PPARg purificado y el ligando de PPARg fluorescente (Fluormone™ PPAR Green). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h y la polarización de fluorescencia se obtuvo mediante la lectura de la placa utilizando un Tecan Genius Pro con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm. Como se muestra en la **Figura 1**, este ensayo de unión a PPARg se llevó a cabo inicialmente con cannabinoides comprendidos en el estado de la técnica, mostrando también su valor CI_{50}: CBG (cannabigerol), CBD (cannabidiol), CBDV (cannabidivarina), CBN (cannabinol), CBC (cannabicromeno), THC (Δ8-tetrahidrocannabinol), THCV (Δ8-tetrahidrocannabinol-viridina) CBD-Q (CBD-Quinona) y CBD anormal. Los datos se proporcionan como medias con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. Estos cannabinoides desplazaron el ligando fluorescente Fluormone™ PPAR Green del complejo PPAR-LBD/Fluormone™ PPAR Green, resultando en la reducción del valor de polarización. Este resultado indica que dichos cannabinoides se unen directamente a PPARg, observándose los mejores valores con CBD-Q y CBN. Además, la **Figura 2** ilustra el mismo ensayo de unión a PPARg, pero llevado a cabo con el cannabinoide CBG comprendido en el estado de la técnica y el cannabinoide CBD-Q de la invención, mostrándose también sus valores CI_{50}. Los datos se proporcionan como medias con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. CBG-Q desplazó el ligando fluorescente Fluormone™ PPAR Green del complejo PPAR-LBD/Fluormone™ PPAR Green con mejor CI_{50} que cualquiera de los otros cannabinoides. Este resultado indica que CBG-Q se une directamente a PPARg, con el mejor valor CI_{50} en comparación con CBG (**Figura 2**) e incluso con CBD-Q y CBN (**Figura 1**).

Ejemplo 2. Líneas celulares utilizadas.

Se utilizaron varias estirpes celulares: AGS, adenocarcinoma gástrico humano; HCT116, carcinoma de colon humano; HeLa, carcinoma de cérvix humano; MDA, cáncer de mama humano; T47D, adenocarcinoma de mama humano; 293T, línea de células epiteliales renales humanes; y 3T3-L1, fibroblastos de embriocitos de ratón similares al tejido adiposo. Todas las estirpes celulares se cultivaron a 37 ºC y 5 % de CO_2 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado (Cambrex Co., Barcelona, España), conteniendo un 10 % de suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (Cambrex Co., Barcelona, España), glutamina 2 mM, penicilina (50 U/ml) y estreptomicina (50 mg/ml). Las células mesenquimales (MSC) se obtuvieron de donantes Servicio de Hematología. Servicio en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Las MSC se mantuvieron en α-MEM con un 15% de SBF.

Ejemplo 3. Ensayo de diferenciación de adipocitos 3T3-L1.

La línea celular de pre-adipocitos 3T3-L1 se cultivó en placas a una concentración de 2 x 10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos para el aislamiento de ARN y la cuantificación de triglicéridos. Los fibroblastos 3T3-L1 se cultivaron hasta su confluencia (3 días) en DMEM con un 10 % de SBF y antibióticos. Entonces (día 0), el medio se suplementó con 1 µM de dexametasona, IBMX 0,5 mM y 10 µg/ml de insulina, para inducir la diferenciación durante dos días. En el día 2, el medio se suplementó sólo con 5 µg/ml de insulina durante dos días más. Todos los medios utilizados se suplementaron adicionalmente con cannabinoides o rosiglitazona (1 µM) como control, desde el día 0. En caso de extracciones de ARN, las células fueron recogidas en el día 4. Para la cuantificación de triglicéridos, las células se mantuvieron en medio suplementado con cannabinoides hasta el día 12 y se renovaron cada 2 días. Este ejemplo se ilustra en la **Figura 4** que muestra el efecto de CBG y CBG-Q en la adipogénesis de células 3T3-L1. Como se ha citado anteriormente, se utilizó rosiglitazona (1 µM) como control de la diferenciación de adipocitos. Se evaluó la capacidad para estimular la diferenciación de adipocitos en fibroblastos 3T3 L1 con el fin de confirmar que CBG-Q es un ligando de PPARg. Se halló que CBG-Q estimula la diferenciación de fibroblastos a adipocitos de una forma más potente que CBG. Esto se demuestra mediante la acumulación de triglicéridos en los adipocitos. Tomados en conjunto, estos datos muestran por vez primera que CBG-Q es un ligando de PPARg capaz de unirse al mismo y aumentar su actividad transcripcional de PPARg.

Ejemplo 4. Efecto de CBG y CBG-Q en la expresión génica específica de adipocitos (aP2 y PPARg), y expresión génica de adipocinas (resistina, IL-6, AdipoQ).

Se examinó el efecto de CBG y CBG-Q en varios genes utilizados como marcadores de la diferenciación de adipocitos (aP2 y PPARγ), así como en varios genes que codifican adipocinas (resistina y AdipoQ) mediante el uso de PCR. El gen GAPDH se utilizó como gen constitutivo. CBG y CBG-Q mostraron una respuesta de expresión génica aditiva en comparación con los adipocitos sin ningún compuesto añadido, confirmando su efecto estimulante en la diferenciación de adipocitos. Se observó una reducción de la citoquina IL-6 pro-inflamatoria, así como un

aumento en AdipoQ, que es la principal adipocina antiinflamatoria. Es resultado muestra que CBG y CBG-Q tienen un efecto positivo como compuestos antiinflamatorios en un tejido adiposo. La producción de citoquinas pro-inflamatorias y la reducción de AdipoQ en tejido adiposo dan lugar a un aumento de la resistencia a la insulina, no sólo en tejido adiposo, sino también en músculo e hígado, lo que conduce a diabetes tipo II a corto plazo (**Figura 5**).

Ejemplo 5. Absorción de glucosa.

Para ensayos del transporte de 2-deoxi-D-glucosa, se privó a pre-adipocitos 3T3-L1 cultivados en placas de 12 pocillos de suero mediante una incubación durante 2 horas. Las células se incubaron entonces con 1,74 µM de insulina durante 20 minutos en 450 µl de tampón KRH (HEPES-NaOH 25 mM [pH 7,4], NaCl 120 mM, KCl 5 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, $CaCl_2$ 1,3 mM, y KH_2PO_4 1,3 mM). El transporte de glucosa se inició mediante la adición de 50 µl de tampón KRH que contiene 2-deoxi-D-[1,2-3H]glucosa 0,5 mM (0,25 µCi) en cada pocillo; tras 5 minutos, se finalizó el transporte lavando las células 3 veces con tampón KRH enfriado en hielo. Las células se solubilizaron y se midió la radioactividad incorporada mediante un contador de centelleo líquido. Este ensayo se ilustra en la **Figura 6** que muestra el efecto de CBG y CBG-Q en la absorción de glucosa en pre-adipocitos 3T3-L1. Se sometieron a ensayo dos dosis en presencia y ausencia de insulina (1,74 µM). Los datos se proporcionan como media con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. Los resultados muestran que ambos compuestos son capaces de aumentar la absorción de glucosa tanto en presencia como en ausencia de insulina, mostrando a CBG-Q con un mayor efecto que CBG en ausencia de insulina. De este modo, CBG-Q se podría utilizar para tratar la resistencia a la insulina a través de la reducción del tejido adiposo pro-inflamatorio e incluso a través del aumento de la absorción de glucosa. También la **Figura 9** muestra el efecto de CBD, CBD-Q y FM-CBD-Q sobre la absorción de glucosa en pre-adipocitos 3T3-L1. Se sometieron a ensayo dos dosis en presencia de insulina (1,74 µM). Los datos se proporcionan como medias con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. Para analizar el efecto de FM-CBD-Q sobre la absorción de glucosa en pre-adipocitos 3T3-L1, se sometieron a ensayo dos dosis en presencia de insulina. Los resultados muestran que el compuesto FM-CBD-Q es capaz de aumentar la absorción de glucosa en presencia de insulina.

Ejemplo 6. CBG-Q como agonista de PPAR en células mesenquimales de la médula espinal. CBG-Q no inhibe la diferenciación de osteoblastos.

Las células se cultivaron en placas a 500 células/cm^2 en placas P6 (TPP, Trasadingen, Suiza) que contienen medio α-MEM con un 10 % de SBF. Cuando los cultivos celulares confluyeron en un 80-90 %, el medio se suplementó con dexametasona 10^{-8} M, ácido ascórbico 0,2 mM y β-glicerolfosfato 10 mM para inducir la diferenciación a osteoblastos, y dexametasona 5 x 10^{-7} M, isobutilmetílxantína 0,5 mM e indometacina 50 mM para inducir la diferenciación a adipocitos. Todos los inductores eran de Sigma-Aldrich. Las MSC (células madre mesenquimales) se cultivaron en un medio osteogénico o adipogénico durante 21 días, junto con el control correspondiente (en ausencia de inductores de la diferenciación). Las muestras celulares se recogieron el día 13. Como se muestra en la **Figura 7**, se evaluó el efecto de CBG y CBG-Q en la expresión génica específica de los adipocitos (PPARg2 y LPL) (**Figura 7B**) y la expresión génica específica de los osteoblastos (Runx2 y ALP) (**Figura 7A**). Los valores de expresión del ADN ribosomal nuclear se utilizaron para normalizar los valores obtenidos. Los adipocitos y osteoblastos se obtuvieron mediante la diferenciación de células madre mesenquimales cultivadas en medios de cultivo de diferenciación específicos de adipogénesis u osteoblastogénesis. El análisis se llevó a cabo mediante QRT-PCR, y los resultados se presentan como medias con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. Los osteoblastos formadores de hueso y los adipocitos formadores de grasa se derivan de células madre mesenquimales (MSCs). Un aumento en la actividad de PPARg debido al tratamiento con el fármaco antidiabético tiazolitinediona (TZD) rosiglitazona resulta en un reducido número de osteoblastos y en un mayor número de adipocitos. Para ensayar el efecto de CBG y CBG-Q en la diferenciación de MSC en osteoblastos o adipocitos, se añadieron los compuestos a un medio de diferenciación durante 21 días y la expresión génica específica se midió por PCR cuantitativa en tiempo real. No se observó ninguna alteración significativa en la expresión de genes marcadores en adipocitos (PPAR y LPL) y osteoblastos (Runx2 y LPL), Este resultado indica que CBG-Q se podría utilizar como agonista de PPAR sin efectos adicionales en el desarrollo de osteoporosis.

Ejemplo 7. Prueba de citotoxicidad MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Se dispensaron alícuotas de suspensiones celulares en volúmenes de 100 µl en pocillos de placas de 96 pocillos para cultivo de tejidos a una densidad de 10^4 células/pocillo. Se añadieron varias concentraciones de cannabinoides, y se sometió a ensayo su eficacia tras 24 horas con el uso del ensayo MTT (Carmichael *et al*., 1987). En cada ensayo MTT, se evaluó cada concentración de la sustancia analizada en tres réplicas. El efecto inhibitorio de varios compuestos se calculó como el porcentaje de inhibición relativo a las células tratadas con el vehículo (0,5 % de DMSO).

La **Tabla 2** muestra los valores de CI_{50} del ensayo de citotoxicidad MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en varias estirpes celulares tras 24 horas de tratamiento con CBD, CBD-Q, CBG y CBG-Q. En un ensayo de citotoxicidad (24 horas de tratamiento) MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol) en varias estirpes celulares, CBG-Q mostró un efecto citotóxico similar comparado con CBG y valores reducidos comparado con CBD y CBD-Q. El mayor efecto citotóxico se observó con CBD-Q. Las estirpes celulares

se derivan de: AGS, adenocarcinoma gástrico humano; HCT116, carcinoma de colon humano; HeLa, carcinoma de cérvix humano; MDA, cáncer de mama humano; T47D, adenocarcinoma de mama humano; 3T3-L1, fibroblastos de embriocitos de ratón similares a tejido adiposo.

Tabla 2

	COMPUESTO			
Estirpe celular	**CBD**	**CBD-Q**	**CBG**	**CBG-Q**
AGS	25,0	7,44	> 50,0	48,0
HCT116	> 50,0	9,8	> 50,0	47,0
HeLa	> 50,0	40,5	> 50,0	> 50,0
MDA	> 50,0	10,1	> 50,0	49,0
T47D	35,0	20,0	47,0	44,0
3T3-L1	30,0	12,0	42,2	49,0

La **Tabla 3** muestra los valores de CI_{50} del ensayo de citotoxicidad MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol) en varias estirpes celulares tras 24 horas de tratamiento con derivados de CBD-Q. En un ensayo de citotoxicidad (24 horas de tratamiento) MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en varias estirpes celulares, todos los derivados de CBG-Q mostraron un efecto citotóxico reducido comparado con CBD-Q. Las estirpes celulares se derivan de: AGS, adenocarcinoma gástrico humano; HCT116, carcinoma de colon humano; HeLa, carcinoma de cérvix humano; MDA, cáncer de mama humano; T47D, adenocarcinoma de mama humano; 3T3-L1, fibroblastos de embriocitos de ratón similares a tejido adiposo.

Tabla 3

	COMPUESTO			
Estirpe celular	**CBD-Q**	**Hidroxi CBD-Q**	**Formil-metoxi CBD-Q**	**Metil CBD-Q**
AGS	7,44	> 50,0	> 50,0	> 50,0
UCT116	9,8	> 50,0	> 50,0	> 50,0
HeLa	40,5	> 50,0	> 50,0	> 50,0
MDA	10,1	> 50,0	> 50,0	> 50,0
T47D	17,1	> 50,0	> 50,0	> 50,0
3T3-L1	12,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0

Ejemplo 8. Transfecciones transitorias y ensayos con luciferasa.

7×10^3 células 293T se sembraron en placas BD Falcon™ blancas de 96 pocillos de fondo transparente Microtest™ Optilux™ durante 24 horas. Posteriormente, las células se transfectaron con los plásmidos indicados utilizando reactivos Rottifect (ROTH, Karlsruhe, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Después de 24 h de post-transfección, las células se pre-trataron con dosis crecientes de cannabinoides durante 6 horas. A continuación, las células se lisaron en Tris-fosfato 25 mM pH 7,8, $MgCl_2$ 8 mM, DTT 1 mM, 1 % de Triton X-100 y 7 % de glicerol. Se midió la actividad de la luciferasa en el lisado celular utilizando un lector de microplacas multimodo TriStar LB 941 (Berthold) y siguiendo las instrucciones del kit de ensayo de luciferasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se midió la concentración de proteínas mediante el ensayo Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA, EE.UU.). Los antecedentes obtenidos con el tampón de lisis se restaron de cada valor experimental y se expresó la transactivación específica como el múltiplo de inducción sobre las células no tratadas. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los plásmidos utilizados fueron Gal4-hPPARgamma (nombre del plásmido: pCMV-BD-hPPARg, fabricado en Sinal Laboratory, Dept. de Farmacología, Universidad de Dalhousie) y el plásmido indicador Gal4 luc que incluye cinco sitios de unión a ADN de Gal4 fusionados al gen luciferasa. El ensayo anterior se ilustra en la **Figura 3** que muestra el efecto de CBD y CBD-Q (**Figura 3A**) o CBG y CBG-Q (**Figura 3B**), en la actividad de PPARg, por medio de un ensayo de transactivación realizado en células 293T que sobreexpresan transitoriamente PPARg en combinación con un gen indicador de la luciferasa (PPARg-GAL4/GAL4-LUC) y tratadas con cannabinoides durante 6 horas. Los datos se proporcionan como medias con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. Un aumento significativo en la actividad de la luciferasa se apreció con derivados de quinona en comparación con las células no tratadas. Este resultado confirma que el compuesto CBG-Q es capaz de inducir la activación de PPARg con mayor eficacia que CBG. Además, la **Figura 8A** muestra un ensayo de transactivación realizado en células 293T que sobreexpresan de forma transitoria PPARg en combinación con un gen indicador de la luciferasa (PPARg-GAL4/GAL4-LUC) y tratadas con cannabinoides durante 6 horas. Los datos se proporcionan como media con desviación estándar mediante barras de error de las tres réplicas. En comparación con las células no tratadas (indicadas con valor 1 como referencia), se apreció un aumento significativo en la actividad de la luciferasa con derivados de CBD-Q en comparación con CBD-Q. Este resultado indica que los derivados de CBD-Q son capaces de inducir la activación de PPARg con mayor eficacia que CBD-Q. FM-CBD-Q mostró los mayores valores de activación de PPARg. Asimismo, la **Figura 8B** ilustra un ensayo de unión a PPARg que demuestra que los derivados de CBD-Q desplazaron el ligando fluorescente Fluormone™ PPAR Green del complejo PPAR-LBD/Fluormone™ PPAR Green, resultando en una reducción del valor de polarización. Este resultado indica que las modificaciones químicas de CBD-Q mantuvieron o incluso aumentaron (FM-CBD-Q) la afinidad a PPARg.

Ejemplo 9. Cuantificación total de triglicéridos.

Se lavaron adipocitos 3T3-L1 totalmente diferenciados en TFS y se sometieron a ultrasonidos tres veces durante 5 segundos en un tampón que contiene NaCl 2 M, EDTA 2 mM y fosfato sódico 50 mM a pH 7,4 para liberar el contenido celular. Se cuantificó el contenido total de triglicéridos liberado utilizando el kit comercial Triglyceride Assay (Applied BioSystem, España) basado en una reacción colorimétrica y medido mediante absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro. La **Figura 8C** confirma que los derivados de CBD-Q son ligandos de PPARg en cultivos celulares, mediante el examen de la capacidad para estimular la diferenciación de adipocitos en fibroblastos 3T3 L1. En todas las concentraciones sometidas a ensayo, se halló que los derivados de CBD-Q estimulan la diferenciación de fibroblastos a adipocitos de una forma más potente que CBD y CBD-Q, y sin el efecto citotóxico observado para CBD-Q a una concentración superior a 1 µM (observe la falta de barras).

Ejemplo 10. PCR y PCR cuantitativa en tiempo real utilizadas en la invención (ejemplos 4 y 6).

La reacción de PCR consistió en 25 µl de una mezcla que contiene: 1 x tampón de PCR, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 0.2 µM de cada cebador específico de secuencia, 1 µl de ADNc transcrito y 0,5 U de *Taq* polimerasa (Biotools). Para la QRT-PCR se utilizó un instrumento Bio-Rad iCycler iQ Real Time PCR e iQ SYBR™ Green Supermix (Bio-Rad, Richmond, CA, EE.UU.). La amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl con 1 µl de ADNc, 25 µl de 2x SYBR Green Supermix (KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM a pH 8,4, dNTP 0,4 mM cada uno, 50u/ml iTaq polimerasa, $MgCl_2$ 6 mM, SYBR Green I y 20 nM de fluoresceína) y 2 µl de cebadores 2 µM. Las secuencias específicas de los cebadores se muestran en la **Tabla 4**. Las condiciones térmicas de ciclación fueron: 94 ºC durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 94 ºC durante 15 s, 60 ºC durante 30 s, y 72 ºC durante 1 min. Se incluyó también una etapa final de extensión a 72 ºC durante 5 min. Para valorar la correcta amplificación se incluyó también un programa de fusión [70 ºC, 10 s (+0,5 ºC x 60)]. Los productos amplificados se analizaron adicionalmente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % que contiene 0,5 ug/ml de bromuro de etidio. Los valores de expresión relativa se calcularon de acuerdo con Pedersen (2001).

Tabla 4. Secuencias de los cebadores oligonucleótidos por PCR.

PPARg-alto	SEQ ID NO:1
PPARg-bajo	SEQ ID NO:2
Adiponectina-alto	SEQ ID NO:3
Adiponectina-bajo	SEQ ID NO:4
IL-6-alto	SEQ ID NO:5
IL-6-bajo	SEQ ID NO:6
Resistina-alto	SEQ ID NO:7
Resistina-bajo	SEQ ID NO:8
aP2-alto	SEQ ID NO:9
aP2-bajo	SEQ ID NO:10
GAPDH-alto	SEQ ID NO:11
GAPDH-bajo	SEQ ID NO:12
ADN nuclear ribosomal (ARNr)-alto	SEQ ID NO:13
ADN nuclear ribosomal (ARNr)-bajo	SEQ ID NO:14
Fosfatasa alcalina (alp)-alto	SEQ ID NO:15
Fosfatasa alcalina (alp)-bajo	SEQ ID NO:16
Factor de transcripción 2 relacionado con Runt (runx2)-alto	SEQ ID NO:17
Factor de transcripción 2 relacionado con Runt (runx2)-alto	SEQ ID NO:18
PPAR-g2-alto	SEQ ID NO:19
PPAR-g2-bajo	SEQ ID NO:20
Lipoproteína lipasa (lpl)-alto	SEQ ID NO:21
Lipoproteína lipasa (lpl)-bajo	SEQ ID NO:22

Ejemplo 11. Oxidación de CBG a CBG hidroxiquinona (CBG-Q).

A una solución enfriada (baño de hielo) de CBG (200 mg, 0,64 mmol) en HMPA (5 ml), se añadió gota a gota nBuLi en hexano (0,66 ml, 2,5 M, 1,65 mmol, 2,5 mol. equiv.). La adición se hizo bajo condiciones aeróbicas normales. Posteriormente, se eliminó el baño refrigerante y la solución se calentó a 50 ºC (baño de aceite). La reacción se controló mediante CCF (éter de petróleo-EtOAc 9:1, Rf. CBG = 0,32; Rf CBGquinona = 0,46) y, después de dos horas, se activó mediante la adición de H2SO4 2N y la extracción con EtOAc. La fase orgánica se secó (Na2SO4), se evaporó y se purificó mediante cromatografía en columna por gravedad (éter de petróleo-EtOAc 95:5 como eluyente), proporcionando 130 mg (62 %) de CBG-hidroxiquinona.

Referencias

- Bernardo, A., Minghetti, L., 2008. *Regulation of Glial Cell Functions by PPAR-gamma natural and Synthetic Agonists. PPAR Res*. 2008, 864140.

- Bishop-Bailey, D., 2000. *Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. Br. J. Pharmacol*. 129, 823-834.
- Bouaboula M, Hilairet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P (2005). *Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. Eur J Pharmacol* 517:174-181.
- Burstein S. *PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids. Life Sci*. 19 de agosto de 2005; 77(14):1674-84.
- Delerive P, Fruchart JC, Staels B, 2001. *Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. J. Endocrinol*. 169, 453-459.
- Fievet C, Fruchart JC, Staels B, 2006. *PPAR alpha and PPAR gamma dual agonists for the treatment of type2 diabetes and the metabolicsyndrome. Curr. Opin. Pharmacol*. 6, 606-614.
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F *et al*. (2003). *Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. Nature* 425: 90-93
- Gelman, L., Feige, J.N., Desvergne, B., 2007. *Molecular basis of selective PPARgamma modulation for the treatment of type 2 diabetes. Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1094-1107.
- Hsueh, W.A., Bruemmer, D., 2004. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. Hypertension* 43, 297-305.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). J Biol Chem*. 2 de junio de 1995; 270(22):12953-6.
- Liu J, Li H, Burstein SH, Zurier RB, Chen JD, 2003. *Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. Mol. Pharmacol*. 63, 983-992.
- Lottenberg SA, Glezer A, Turatti LA. *Metabolic syndrome: identifying the risk factors. J Pediatr* (Rio J) 2007;83(5 Supl.):S204-8.
- LoVerme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattace-Raso G *et al*. (2006). *Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. J Pharmacol Exp Ther* 319: 1051-1061.
- Murphy GJ, Holder JC. PPAR-*gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. Trends Pharmacol Sci* 2000;21(12):469-74.
- O'Sullivan SE, Kendall DA. *Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease. Immunobiology*. 13 de octubre de 2009.
- O'Sullivan SE, Sun Y, Bennett AJ, Randall MD, Kendall DA. *Time-dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. Eur J Pharmacol*. 10 de junio de 2009;612(1-3):61-8.
- O'Sullivan SE. *Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. Br J Pharmacol*. Noviembre de 2007; 152(5):576-82.
- Rosen ED, MacDougald OA. *Adipocyte differentiation from the inside out. Nat Rev Mol Cell Biol*. Diciembre de 2006;7(12):885-96.
- Stienstra R, Duval C, Muller M, Kersten S, 2007. *PPARs, obesity, and inflammation. PPAR Res*. 2007, 95974.
- Sun Y, Bennett A. *Cannabinoids: A New Group of Agonists of PPARs. PPAR Res*. 2007; 2007:23513.
- Széles, L., Töröcsik, D., Nagy, L., 2007. *PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. Biochim. Biophys. Acta* 1771, 1014-1030.
- Tachibana K, Yamasaki D, Ishimoto K, Doi T. *The Role of PPARs in Cancer. PPAR Res*. 2008;2008:102737.
- Tontonoz P, Spiegelman BM. *Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. Annu Rev Biochem*. 2008;77: 289-312. Revisión.

- Vanden Berghe W, Vermeulen L, Delerive P, DeBosscher K Staels B, Haegeman G. 2003. *A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kB and PPAR. Adv.Exp.Med.Biol*.544,181-196.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Vivacell Biotechnology España S.L

<120> DERIVADOS DE QUININA DE CANNABINOIDES

<130> PCT-03494

<160> 22
<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> PPARg-alto

<400> 1
ccagagtctg ctgatctgcg 20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> PPARg-bajo

<400> 2
gccacctctt tgctctgctc 20

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Adiponectina-alto

<400> 3
ggctctgtgc tgctccatct 20

<210> 4
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Adiponectina-bajo

<400> 4
agagtcgttg acgttatctg catag 25

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> IL-6-alto

<400> 5
acaaccacgg ccttccctac tt 22

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> IL-6-bajo

<400> 6
caggatttcc cagcgaacat gtg 23

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Resistina-alto

<400> 7
gtacccacgg gatgaagaac c 21

<210> 8
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Resistina-bajo

<400> 8
gcagagccac aggagcag 18

<210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> aP2-alto

<400> 9
aagtgggagt gggctttgc 19

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> aP2-bajo

<400> 10
tccccattta cgctgatgat c 21

<210> 11
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> GAPDH-alto

<400> 11
tggcaaagtg gagattgttg cc 22

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> GAPDH-bajo

<400> 12
aagatggtga tgggcttccc g 21

<210> 13
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN nuclear ribosomal (ARNr)-alto

<400> 13
tacctggttg atcctgccag tagcatatgc ttg 33

<210> 14
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN nuclear ribosomal (ARNr)-bajo

<400> 14
tttaatgagc cattcgcagt ttcactgtac cg 32

<210> 15
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Fosfatasa alcalina (alp)-alto

<400> 15
ccaacgtggc taagaatgtc atc 23

<210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Fosfatasa alcalina (alp)-bajo

<400> 16
tgggcattgg tgttgtacgt c 21

<210> 17
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Factor de transcripción 2 relacionado con Runt (runx2)-alto

<400> 17
tggttaatct ccgcaggtca c 21

<210> 18
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Factor de transcripción 2 relacionado con Runt (runx2)-bajo

<400> 18
actgtgctga agaggctgtt tg 22

<210> 19
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> PPAR-g2-alto

<400> 19
gcgattcctt cactgataca ctg 23

<210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> PPAR-g2-bajo

<400> 20
gagtgggagt ggtcttccat tac 23

<210> 21
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Lipoproteína lipasa (lpl)-alto

<400> 21
aagaagcagc aaaatgtacc tgaag 25

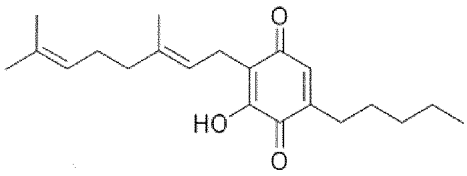
<210> 22
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Lipoproteína lipasa (lpl)-bajo

<400> 22
cctgattggt atgggtttca ctc 23

REIVINDICACIONES

1. Compuesto **caracterizado por** tener la fórmula (VI):



(VI)

2. Compuesto, de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como medicamento.

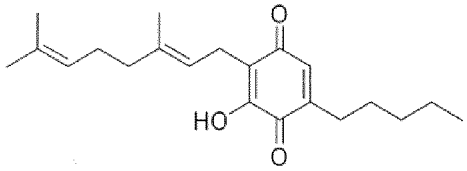
3. Compuesto, de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como agonista de PPARg.

4. Compuesto, de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso como agonista de PPARg en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas y diabetes tipo II.

5. Compuesto, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, para su uso como agonista de PPARg en el tratamiento de enfermedades metabólicas seleccionadas entre: hipertensión, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia (HDL-C) u obesidad.

6. Compuesto, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, para su uso como agonista de PPARg en el tratamiento de enfermedades inflamatorias seleccionadas entre: aterosclerosis, enfermedades intestinales inflamatorias, artritis reumatoide, fibrosis hepática, nefropatía, psoriasis, cicatrización cutánea, regeneración de la piel, pancreatitis, gastritis, trastornos neurodegenerativos o cáncer.

7. Uso de un compuesto de Fórmula (VI):



(VI)

para la preparación de una composición para el tratamiento de enfermedades relacionadas con PPARg.

8. Uso, de acuerdo con la reivindicación 7, para la preparación de una composición para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas y diabetes tipo II.

9. Uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para la preparación de una composición para el tratamiento de enfermedades metabólicas seleccionadas entre: hipertensión, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia (HDL-C) u obesidad.

10. Uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para la preparación de una composición para el tratamiento de enfermedades inflamatorias seleccionadas entre: aterosclerosis, enfermedades intestinales inflamatorias, artritis reumatoide, fibrosis hepática, nefropatía, psoriasis, cicatrización cutánea, regeneración de la piel, pancreatitis, gastritis, trastornos neurodegenerativos o cáncer.

11. Composición farmacéutica que comprende al menos el compuesto de la reivindicación 1 y cualquier excipiente o portador aceptables adecuados.

Fig. 1

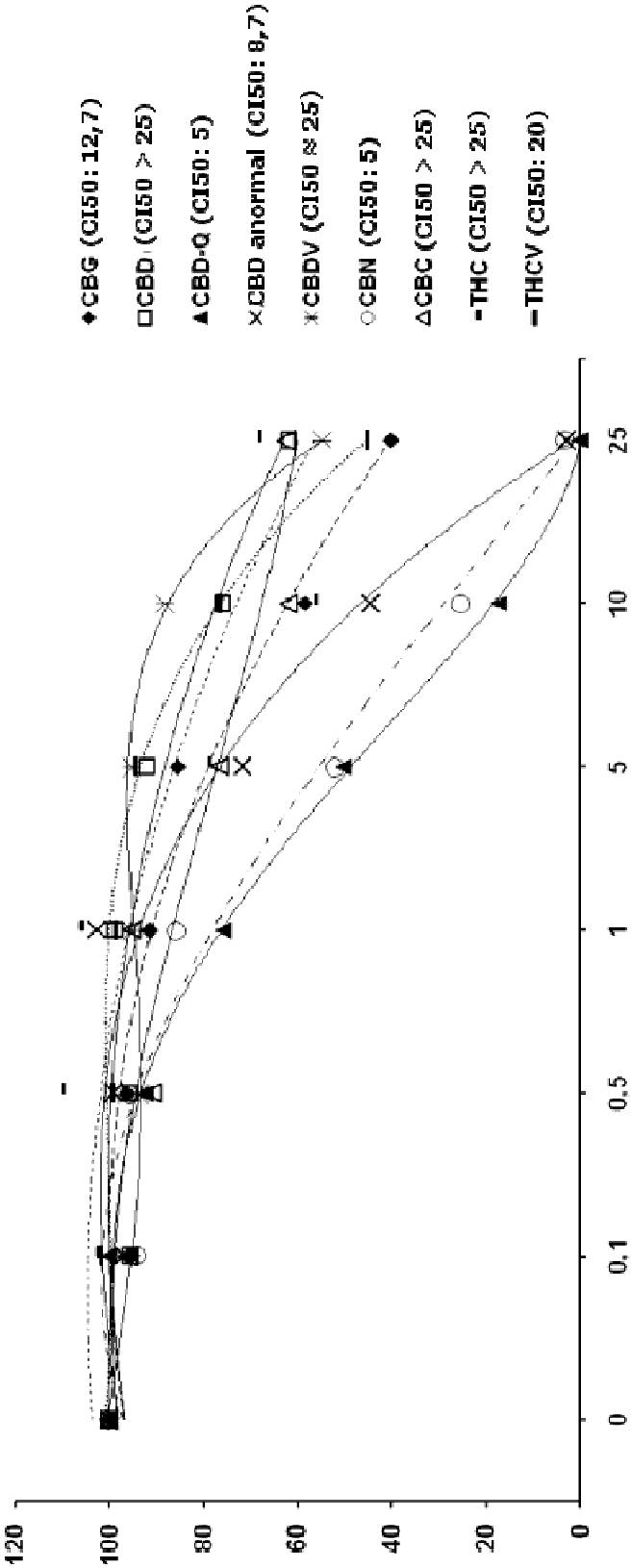

CBG (CI50: 12,7)
CBD (CI50 > 25)
CBD-Q (CI50: 5)
CBD anormal (CI50: 8,7)
CBDV (CI50 ≈ 25)
CBN (CI50: 5)
CBC (CI50 > 25)
THC (CI50 > 25)
THCV (CI50: 20)
120
100
80
60
40
20
0
0
0,1
0,5
1
5
10
25

Fig. 2

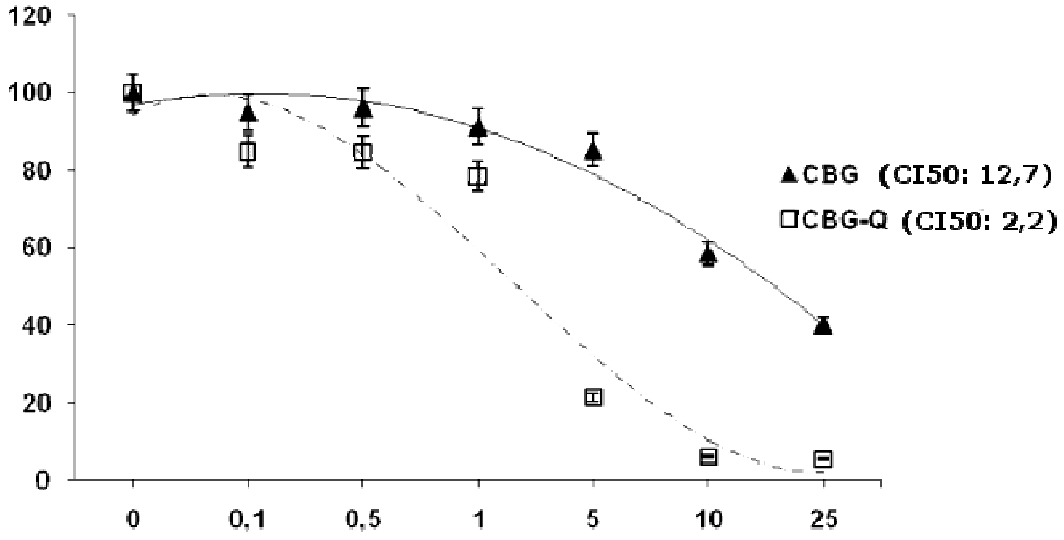


Fig. 3A

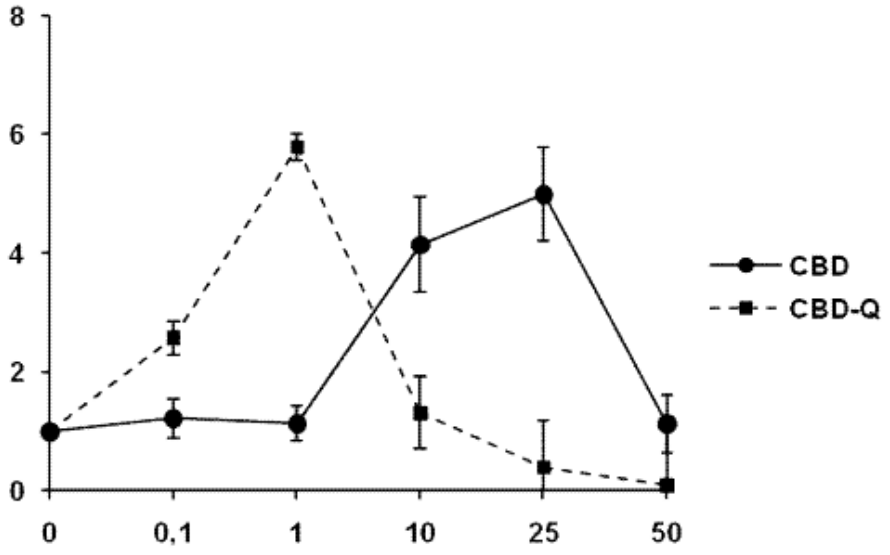


Fig. 3B

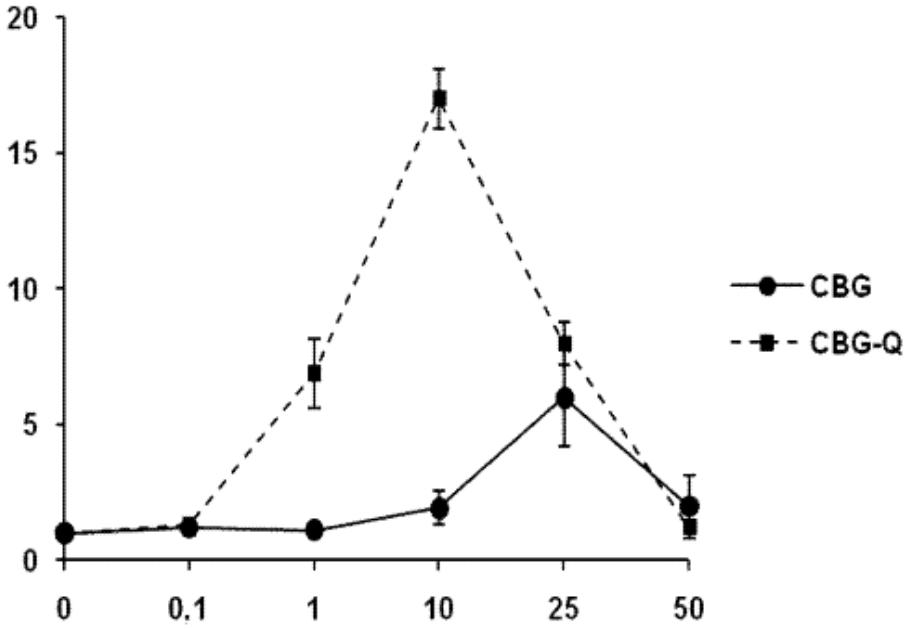


Fig. 4

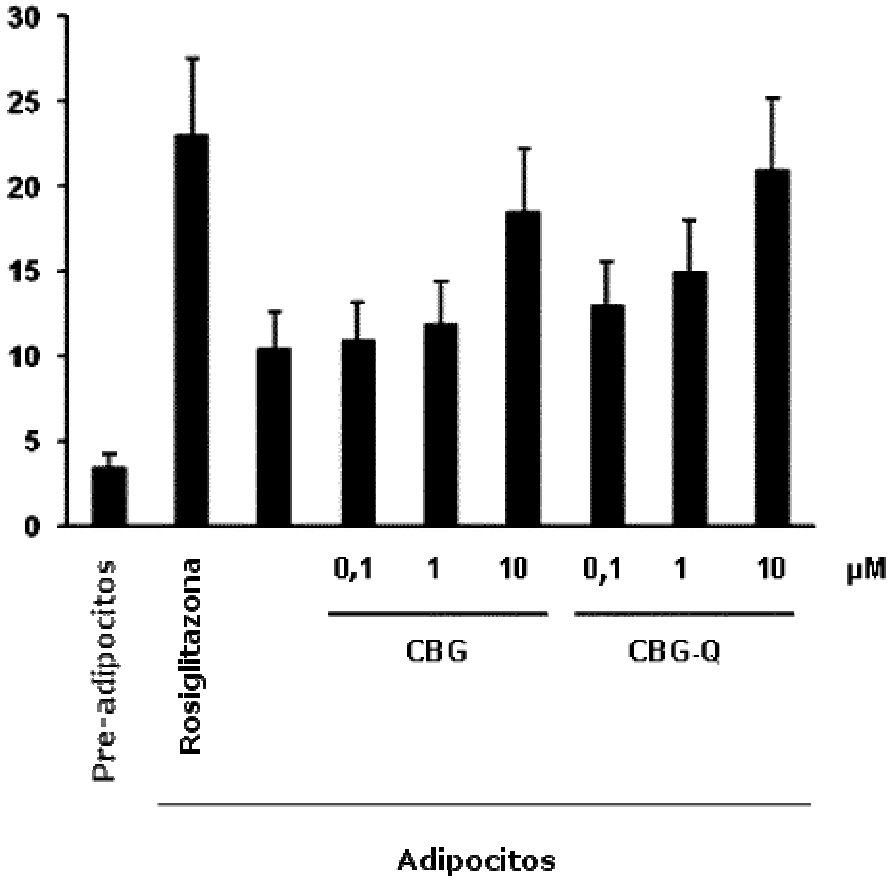

30
25
20
15
10
5
0
Pre-adipocitos
Rosiglitazona
0,1
1
10
0,1
1
10
µM
CBG
CBG-Q
Adipocitos

Fig. 5

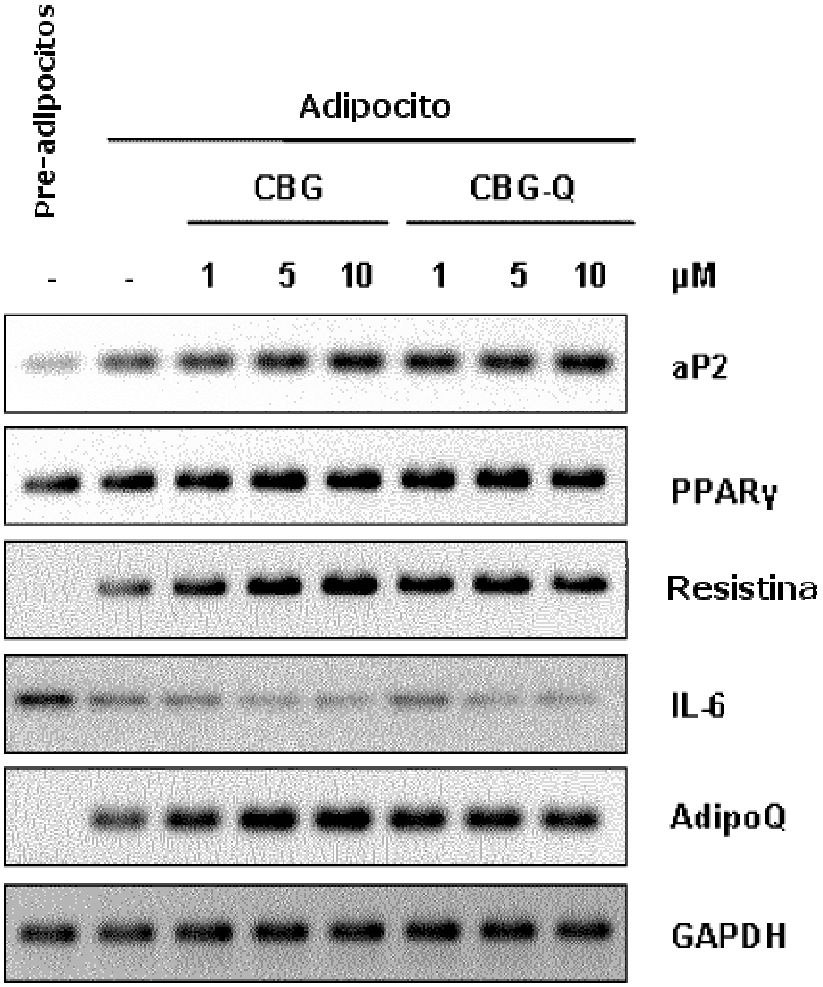

Pre-adipocitos
Adipocito
CBG
CBG-Q
- - 1 5 10 1 5 10 μM
aP2
PPARγ
Resistina
IL-6
AdipoQ
GAPDH

Fig. 6

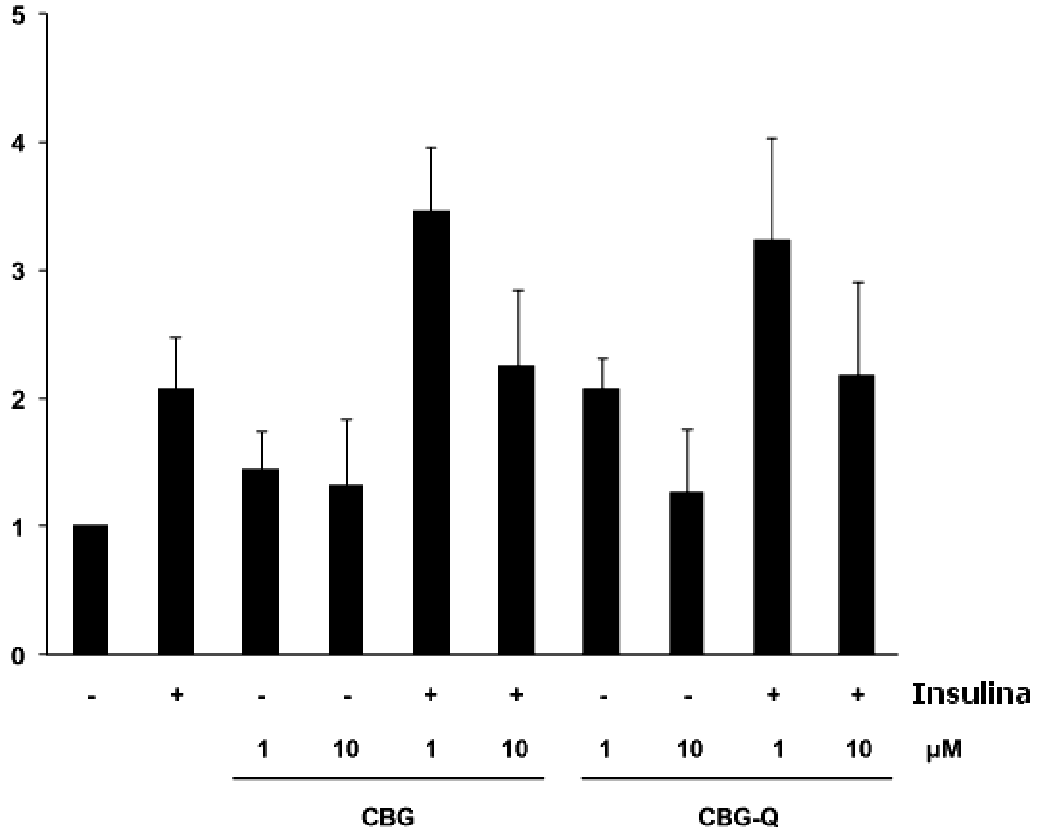


Fig.7A

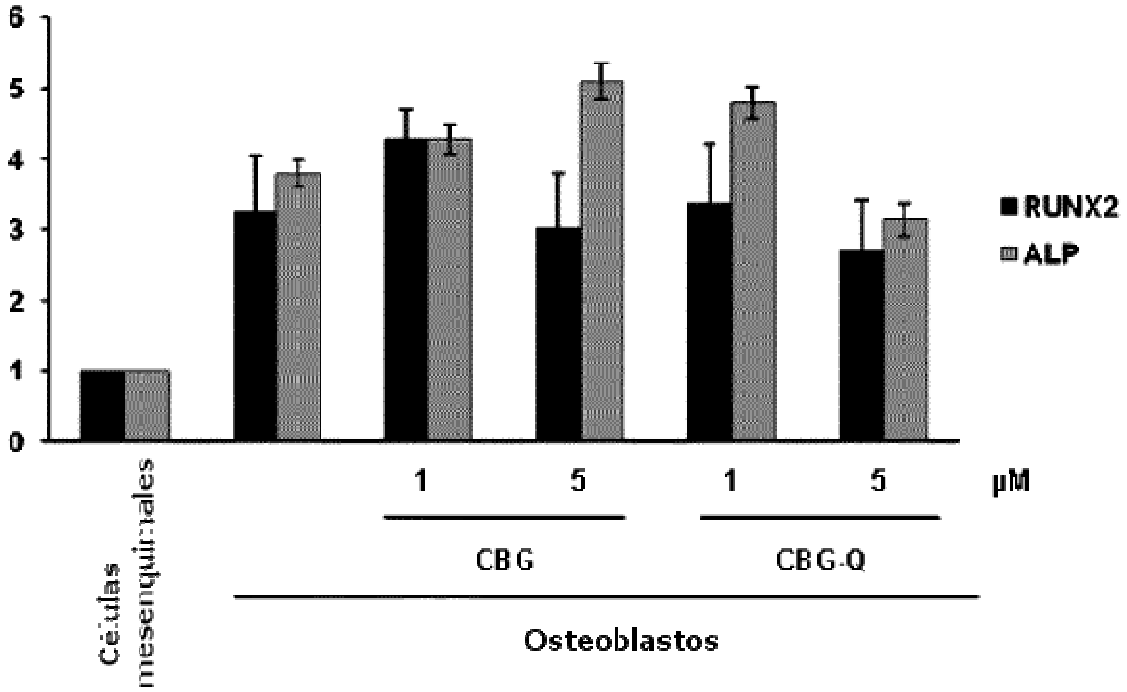

6
5
4
3
2
1
0
RUNX2
ALP
1
5
1
5
µM
CBG
CBG-Q
Osteoblastos
Células mesenquimales

Fig.7B

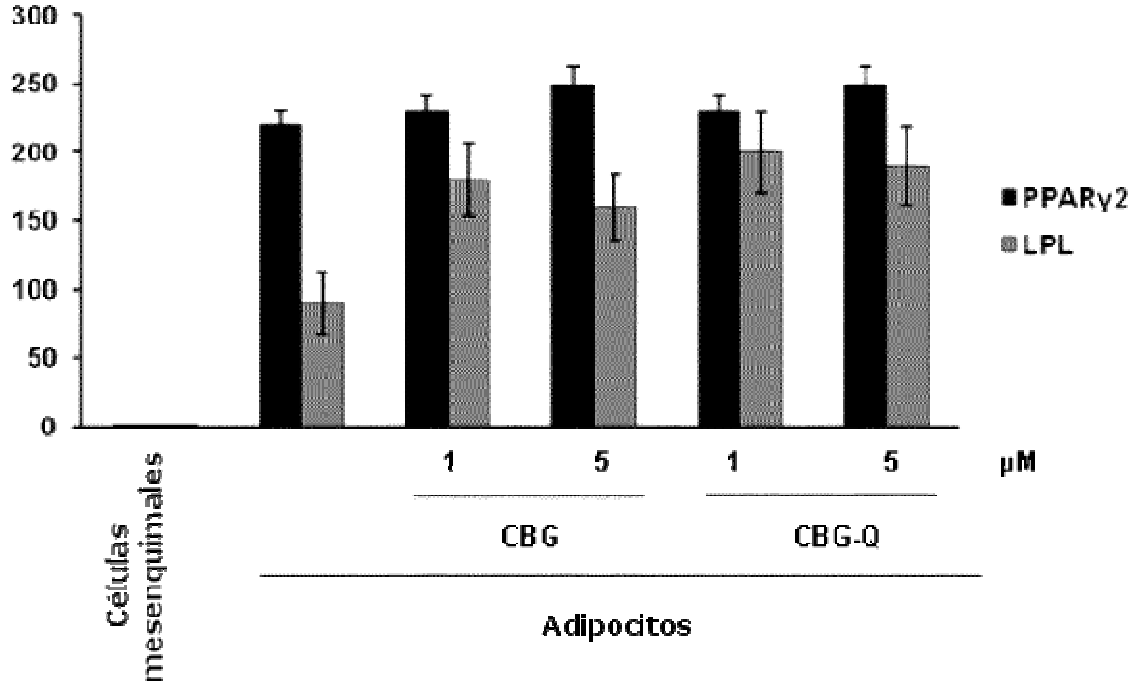

300
250
200
150
100
50
0
PPARγ2
LPL
1
5
1
5
µM
CBG
CBG-Q
Adipocitos
Células mesenquimales

Fig .8A

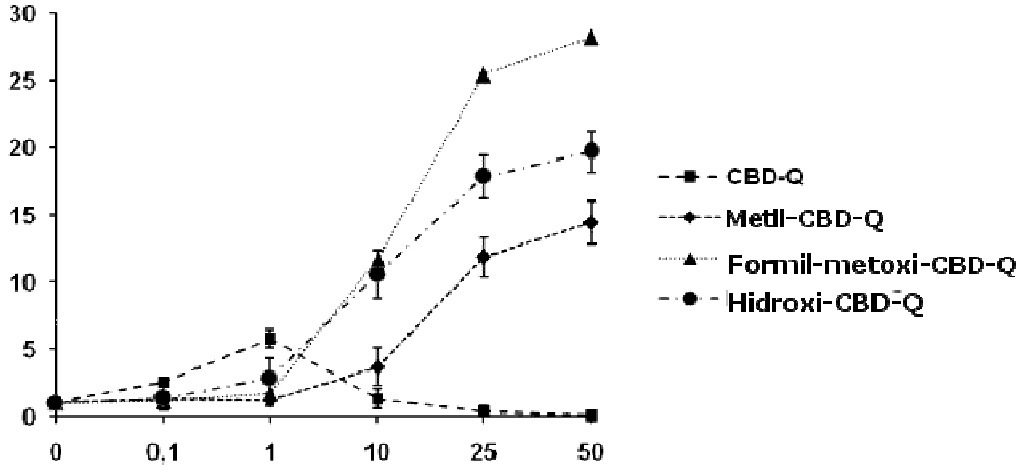
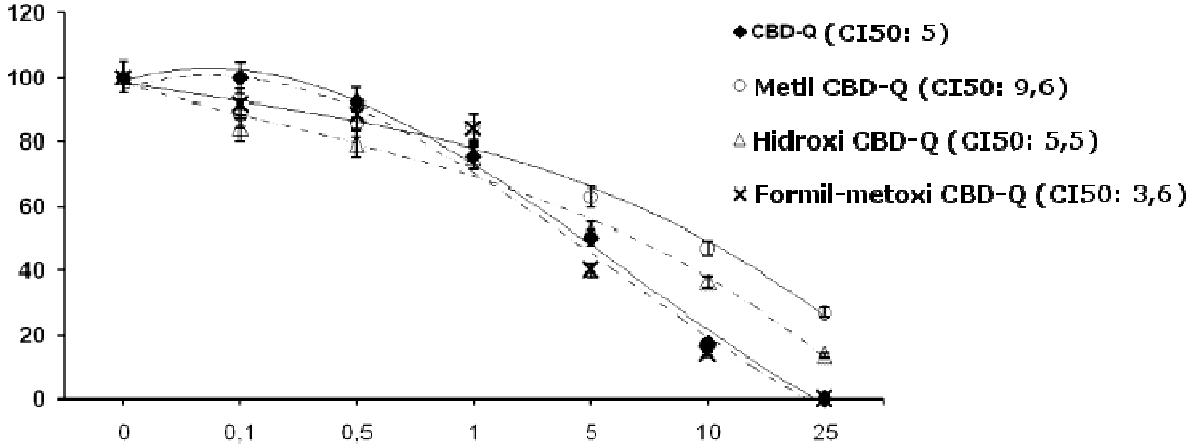

30
25
20
15
10
5
0
0
0,1
1
10
25
50
CBD-Q
Metil-CBD-Q
Formil-metoxi-CBD-Q
Hidroxi-CBD-Q

Fig. 8B


120
100
80
60
40
20
0
0
0,1
0,5
1
5
10
25
CBD-Q (CI50: 5)
Metil CBD-Q (CI50: 9,6)
Hidroxi CBD-Q (CI50: 5,5)
Formil-metoxi CBD-Q (CI50: 3,6)

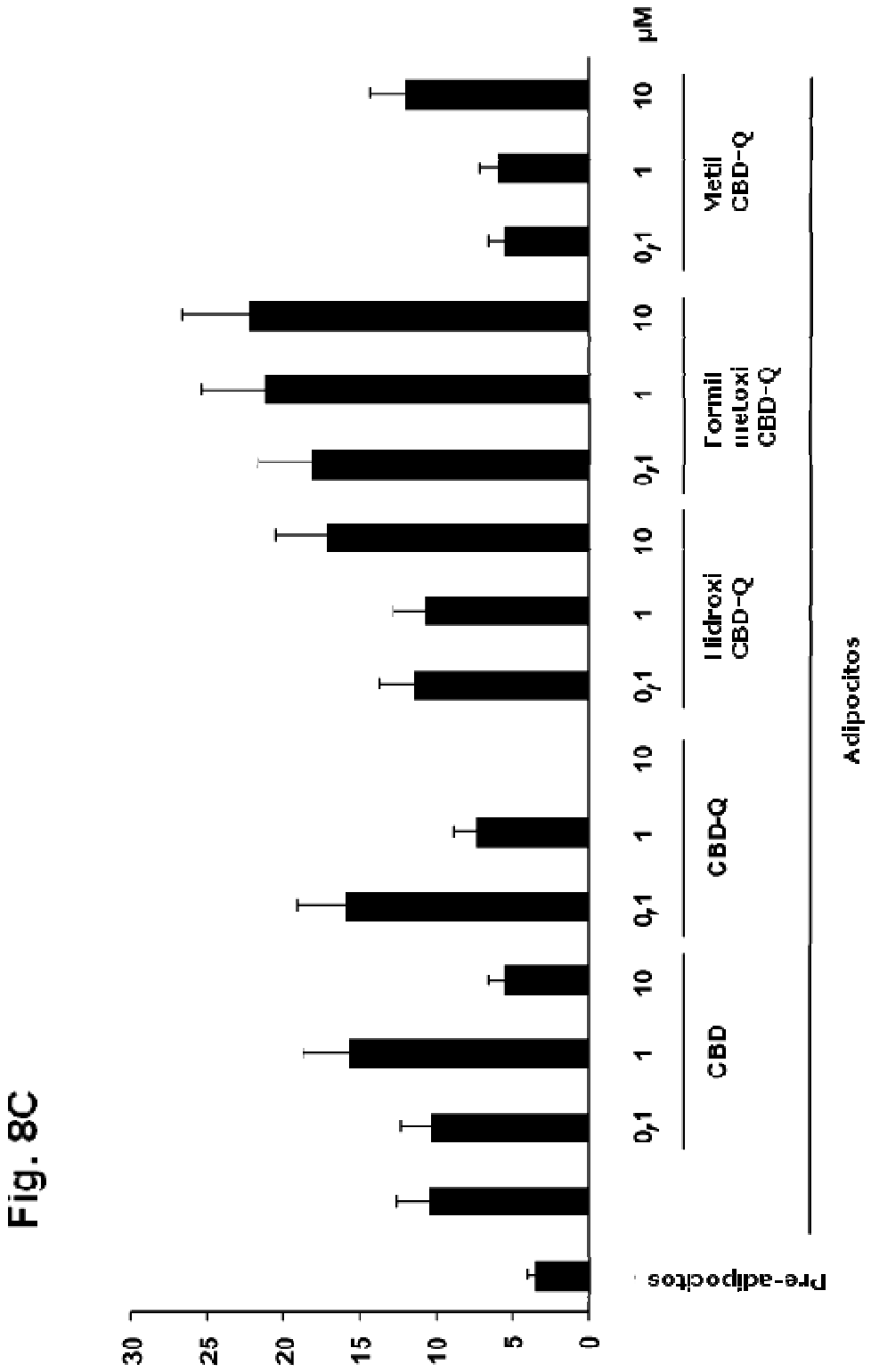
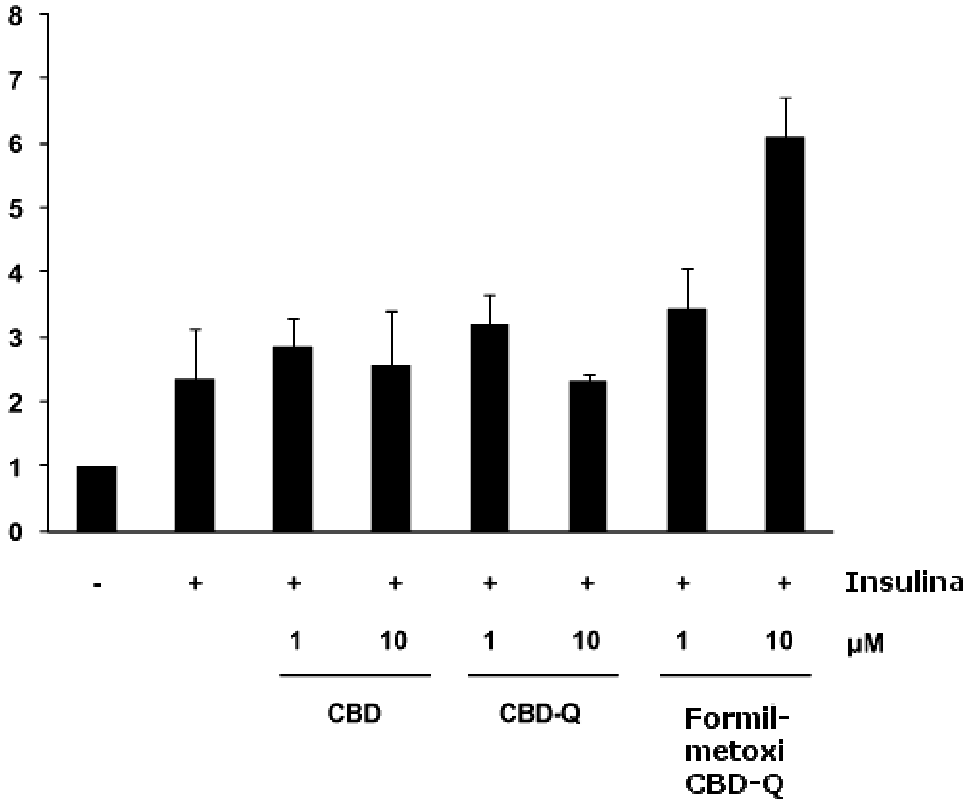


Fig. 8C
30
25
20
15
10
5
0
Pre-adipocitos
0,1
1
10
CBD
0,1
1
10
CBD-Q
0,1
1
10
Hidroxi CBD-Q
0,1
1
10
Formil metoxi CBD-Q
0,1
1
10
Metil CBD-Q
µM
Adipocitos

Fig. 9


8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
+
+
+
+
+
+
+
Insulina
1
10
1
10
1
10
µM
CBD
CBD-Q
Formil-
metoxi
CBD-Q