

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 921**

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2012 PCT/GB2012/052886**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13076487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2012 E 12794753 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2782563**

54 Título: **Tetrahidrocannabivarina para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales**

30 Prioridad:

21.11.2011 GB 201120067

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

11.09.2018

73 Titular/es:

**GW PHARMA LIMITED (100.0%)
Sovereign House
Histon, Cambridge CB24 9BZ, GB**

72 Inventor/es:

**IZZO, ANGELO ANTONIO;
BORELLI, FRANCESCA y
WRIGHT, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 680 921 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

Tetrahidrocannabivarina para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales

5 La presente invención se refiere a tetrahidrocannabivarina (THCV) para uso en el tratamiento curativo de enfermedades inflamatorias intestinales. Preferiblemente, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

Definiciones

En esta memoria descriptiva, se usan los siguientes términos y se pretende que tengan los siguientes significados/definiciones:

10 Los "cannabinoides" son un grupo de compuestos que incluyen los endocannabinoides, los fitocannabinoides y los que no son ni endocannabinoides ni fitocannabinoides, en lo sucesivo "sintocannabinoides".

Los "endocannabinoides" son cannabinoides endógenos, que son ligandos de alta afinidad de los receptores CB1 y CB2.

15 Los "fitocannabinoides" son cannabinoides que se originan en la naturaleza y se pueden encontrar en la planta de cannabis. Los fitocannabinoides pueden estar presentes en un extracto que incluye una sustancia farmacológica botánica, aislada o reproducida sintéticamente.

Los "sintocannabinoides" son aquellos compuestos capaces de interactuar con los receptores cannabinoides (CB1 y/o CB2) pero no se encuentran endógenamente o en la planta de cannabis. Los ejemplos incluyen WIN 55212 y rimonabant.

20 Un "fitocannabinoides aislado" es uno que se ha extraído de la planta de cannabis y se ha purificado hasta tal punto que se han eliminado todos los componentes adicionales tales como los cannabinoides secundarios y menores y la fracción no cannabinoide.

Un "cannabinoides sintético" es uno que se ha producido por síntesis química. Este término incluye modificar un fitocannabinoides aislado, por ejemplo, formando una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 Una "sustancia farmacéutica botánica" o "BDS" se define en la Orientación para la Guía sobre la Dosificación de Productos Farmacéuticos de la Industria Botánica, agosto de 2000, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Centro para la Administración de Alimentos y Medicamentos para Evaluación e Investigación de Medicamentos como: "Un medicamento 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. Por lo tanto, en el caso del cannabis, las BDS derivadas de plantas de cannabis no incluyen cannabinoides de grado farmacológico altamente purificados.

30 En la presente invención, se considera que una BDS tiene dos componentes: el componente que contiene fitocannabinoides y el componente que no contiene fitocannabinoides. Preferiblemente, el componente que contiene fitocannabinoides es el componente mayor que comprende más del 50% (p/p) del total de BDS y el componente que no contiene fitocannabinoides es el componente más pequeño que comprende menos del 50% (p/p) del total de BDS.

La cantidad del componente que contiene fitocannabinoides en la BDS puede ser mayor al 55%, hasta el 60%, 65%, 70%, 75%, 80% a 85% o más del extracto total. Es probable que la cantidad real dependa del material de partida utilizado y del método de extracción utilizado.

40 El "fitocannabinoides principal" en una BDS es el fitocannabinoides que está presente en una cantidad que es más alta que la de los otros fitocannabinoides. Preferentemente, el principio fitocannabinoides está presente en una cantidad superior al 40% (p/p) del extracto total. Más preferiblemente, el principio fitocannabinoides está presente en una cantidad superior al 50% (p/p) del extracto total. Más preferiblemente aún, el principio fitocannabinoides está presente en una cantidad mayor al 60% (p/p) del extracto total.

45 La cantidad del fitocannabinoides principal en la BDS es preferiblemente mayor al 50% de la fracción que contiene fitocannabinoides, más preferiblemente aún mayor al 55% de la fracción que contiene fitocannabinoides, y más preferiblemente aún mayor al 60% hasta el 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% y 95% de la fracción que contiene fitocannabinoides.

50 El (Los) "fitocannabinoides secundario(s)" en una BDS son el(los) fitocannabinoides que está(n) presente(s) en proporciones significativas. Preferiblemente, el fitocannabinoides secundario está presente en una cantidad mayor al 5% (p/p) del extracto total, más preferiblemente mayor al 10% (p/p) del extracto total, más preferiblemente aún mayor al 15% (p/p) del extracto total. Algunas BDS tendrán dos o más fitocannabinoides secundarios que están presentes en cantidades significativas. Sin embargo, no todas las BDS tendrán un fitocannabinoides secundario.

El(Los) "fitocannabinoides menor(es)" en una BDS se puede(n) describir como el resto de todos los componentes fitocannabinoides una vez que se tienen en cuenta los fitocannabinoides principal y secundarios. Preferiblemente los fitocannabinoides menores están presentes en total en una cantidad de menos del 5% (p/p) del extracto total, y más preferiblemente el fitocannabinoides menor está presente en una cantidad menor al 2% (p/p) del extracto total.

5 El término "que consiste esencialmente en" está limitado a los fitocannabinoides que se especifican, no excluye los componentes no cannabinoides que también pueden estar presentes.

Típicamente, el componente que no contiene fitocannabinoides de la BDS comprende terpenos, esteroides, triglicéridos, alcanos, escualenos, tocoferoles y carotenoides.

10 Estos compuestos pueden jugar un papel importante en la farmacología de las BDS, solos o en combinación con el fitocannabinoides.

La "fracción de terpeno" puede ser significativa y puede desglosarse por el tipo de terpeno: monoterpeno o sesquiterpeno. Estos componentes terpénicos pueden definirse adicionalmente de una manera similar a los cannabinoides.

15 La cantidad de componente que no contiene fitocannabinoides en la BDS puede ser inferior a 45%, a 40%, 35%, 30%, 25%, 20% a 15% o menos del extracto total. Es probable que la cantidad real dependa del material de partida utilizado y del método de extracción utilizado.

20 El(Los) "monoterpeno/s principal(es)" en una BDS es el monoterpeno que está presente en una cantidad que es más alta que la de los otros monoterpenos. Preferentemente, el(los) monoterpeno/s principal(es) están presentes en una cantidad superior al 20% (p/p) del contenido total de terpeno. Más preferiblemente, el principio monoterpeno está presente en una cantidad mayor al 30% (p/p) del contenido total de terpeno, más preferiblemente aún mayor al 40% (p/p) del contenido total de terpeno, y más preferiblemente aún mayor al 50 % (p/p) del contenido total de terpeno. El principio monoterpeno es preferiblemente un mirceno o pineno. En algunos casos, puede haber dos monoterpenos principales. Cuando este es el caso, los monoterpenos principales son preferiblemente un pineno y/o un mirceno.

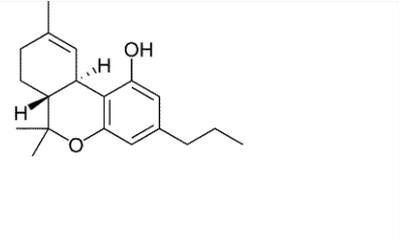
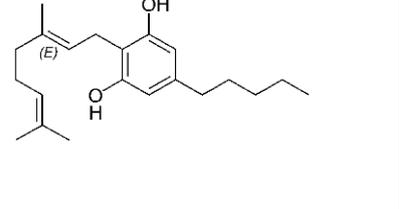
25 El "sesquiterpeno principal" en una BDS es el sesquiterpeno que está presente en una cantidad que es más alta que todos los otros sesquiterpenos. Preferiblemente, el sesquiterpeno principal está presente en una cantidad mayor al 20% (p/p) del contenido total de terpeno, más preferiblemente aún mayor al 30% (p/p) del contenido total de terpeno. El sesquiterpeno principal es preferiblemente un cariofileno y/o un humuleno.

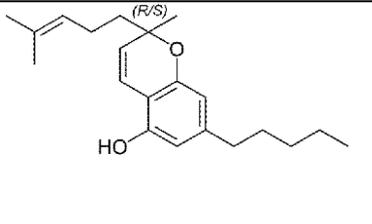
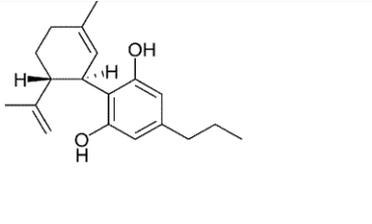
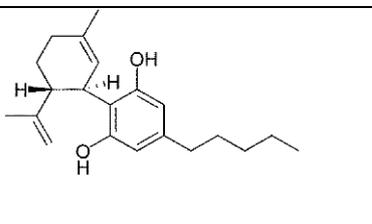
30 Los componentes sesquiterpénicos pueden tener un "sesquiterpeno secundario". El sesquiterpeno secundario es preferiblemente un pineno, que está presente preferiblemente en una cantidad mayor al 5% (p/p) del contenido total de terpeno, más preferiblemente el sesquiterpeno secundario está presente en una cantidad mayor al 10% (p/p) del contenido total de terpeno.

El sesquiterpeno secundario es preferiblemente un humuleno que está presente preferiblemente en una cantidad mayor al 5% (p/p) del contenido total de terpeno, más preferiblemente el sesquiterpeno secundario está presente en una cantidad mayor al 10% (p/p) del contenido total de terpeno.

35 Alternativamente, los extractos botánicos se pueden preparar introduciendo fitocannabinoides aislados o su equivalente sintético en una fracción de planta no cannabinoides como se puede obtener a partir de una planta cannabinoides cero o uno o más componentes no cannabinoides encontrados en la planta de cannabis tales como terpenos.

La estructura de los fitocannabinoides THCV, CBG, CBC y CBDV se muestran a continuación, la estructura de CBD se muestra para comparación:

THCV	Tetrahidrocannabivarina	
CBG	Cannabigerol	

CBC	Cannabicromeno	
BDV	Cannabidivarina	
CBD	Cannabidiol	

5

Los fitocannabinoides se pueden encontrar como forma neutra (forma descarboxilada) o en forma de ácido carboxílico dependiendo del método utilizado para extraer los cannabinoides. Por ejemplo, se sabe que el calentamiento de la forma de ácido carboxílico provocará que la mayor parte de la forma de ácido carboxílico se descarboxile en la forma neutra.

Cuando se usa un fitocannabinoides sintético, el término pretende incluir compuestos, metabolitos o derivados de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

10

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales o ésteres preparados a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que incluyen bases o ácidos inorgánicos y bases o ácidos orgánicos, como sería bien conocido por los expertos en la técnica. Muchas bases inorgánicas y orgánicas adecuadas son conocidas en la técnica.

Para el propósito de esta invención, el término "tratamiento" se refiere a reducir o prevenir la inflamación en el intestino y una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad que logra este objetivo.

15

El término "tratamiento preventivo" pretende referirse al pretratamiento con un agente que es capaz de prevenir una respuesta inflamatoria en los intestinos en sujetos que son susceptibles a enfermedades asociadas con la inflamación de los intestinos. Tal tratamiento preventivo se asocia con un efecto protector que puede deberse a la inmunomodulación.

20

El término "tratamiento curativo" pretende referirse al tratamiento con un agente que puede detener o ralentizar sustancialmente la respuesta inflamatoria en los intestinos en sujetos que padecen enfermedades asociadas con la inflamación de los intestinos. Cuando se observa un efecto curativo, los fitocannabinoides están trabajando para atacar directamente la inflamación y producir un efecto antiinflamatorio.

Antecedentes de la invención

25

La enfermedad inflamatoria intestinal es el término usado para describir enfermedades crónicas que causan inflamación de los intestinos. Las enfermedades como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn son ejemplos de enfermedad inflamatoria intestinal. Otras enfermedades que afectan los intestinos como la enfermedad del intestino irritable pueden ser causadas por la inflamación en parte de los intestinos.

30

La colitis ulcerativa es una enfermedad inflamatoria del colon. En la colitis ulcerativa, el revestimiento de la pared intestinal se enrojece y se hincha y desarrolla úlceras. La afección a menudo es más grave en el área rectal, lo que puede causar diarrea frecuente. Además, puede aparecer moco y sangre en las heces si se daña el revestimiento del colon.

La enfermedad de Crohn puede afectar cualquier parte del sistema digestivo, desde la boca hasta el ano, pero es más común en la parte inferior del intestino delgado o en la primera parte del intestino grueso. A menudo afecta más de una

parte del intestino dejando áreas normales, no afectadas en el medio.

La enfermedad de Crohn es un trastorno inflamatorio recidivante crónico del tracto gastrointestinal (GI) que se produce en todo el mundo, especialmente en América del Norte y Europa con una incidencia de 2-6 por 100.000 por año y una prevalencia de 60-80 por 100.000. El inicio de la enfermedad puede ocurrir en cualquier grupo de edad, pero es más común en adultos jóvenes. La enfermedad de Crohn se caracteriza por una inflamación de la membrana mucosa que afecta a cualquier parte del tracto gastrointestinal, con el íleon terminal (35%), la región ileocecal (40%) y el colon (20%) como las áreas más afectadas.

Los pacientes con enfermedad de Crohn tienen un flujo sanguíneo aumentado en la pared del intestino; esto causa inflamación y ulceración, que se extiende a las capas más profundas del intestino.

Se desconoce la causa exacta de la enfermedad de Crohn, pero se cree que el sistema inmunitario del cuerpo reacciona de forma exagerada a un virus o bacteria, lo que causa una inflamación continua en el intestino. La enfermedad a menudo tiende a ser hereditaria.

La enfermedad de Crohn es generalmente una afección de por vida, con brotes alternados de síntomas y períodos de remisión. Los síntomas incluyen: diarrea, hasta 10 o 20 veces al día; dolor, en cualquier parte del abdomen, y a menudo se describe como calambres o cólicos. El abdomen puede estar adolorido e hinchado; pérdida de apetito; pérdida de peso; fiebre; sangrado rectal; anemia; fisuras y abscesos en el área anal.

Durante un ataque de síntomas, también pueden aparecer problemas en otras áreas del cuerpo, tales como úlceras en la boca, dolor en las articulaciones, inflamación de los ojos, erupciones cutáneas y úlceras en la piel.

Con la enfermedad de Crohn crónica, la inflamación severa puede causar el desarrollo de complicaciones. Esto incluye una fístula, que es una conexión anormal entre el intestino y una parte vecina del cuerpo, como la vejiga, la vagina u otro asa del intestino. Las fístulas pueden provocar infecciones recurrentes de los tractos urinario o genital. Otras complicaciones incluyen un absceso (acumulación de pus) dentro del abdomen o una estenosis, un estrechamiento del intestino causado por tejido cicatricial que puede obstruir el paso del material a través del intestino. También se sabe que los pacientes que han tenido la enfermedad de Crohn durante 8 a 10 años tienen un mayor riesgo de cáncer de intestino.

No existe cura para la enfermedad de Crohn. Los síntomas se pueden mejorar con cambios en la dieta, medicamentos o cirugía, o una combinación de estos.

Los medicamentos para reducir la inflamación tales como los corticosteroides se usan a menudo en la enfermedad de Crohn junto con medicamentos que suprimen el sistema inmune. Los medicamentos contra la diarrea, los antibióticos y los analgésicos también se pueden usar durante los brotes.

Las terapias existentes actualmente disponibles para uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn activa aguda, particularmente corticosteroides, no son universalmente efectivas o bien toleradas por todos los pacientes y/o pueden no ser rentables a largo plazo. Además, aproximadamente el 45% de los pacientes no puede suspender el tratamiento con corticosteroides sin una exacerbación de su enfermedad y, en consecuencia, muchos pacientes pueden ser tolerantes a dichos fármacos, aunque esto es más evidente en la enfermedad moderada a grave.

Muchas personas con enfermedad de Crohn requieren tratamiento quirúrgico en algún momento para tratar complicaciones tales como abscesos anales, o fístulas, para eliminar áreas estrechas del intestino no funcionales, o cuando los medicamentos no controlan la enfermedad.

El fitocannabinoide CBD ha sido atribuido como un agente antiinflamatorio (Fride et al., (2005) y Di Carlo e Izzo (2003).

Massa y Monory (2006) describen el uso de endocannabinoides como protectores naturales en trastornos inflamatorios y gastrointestinales.

Se demostró que el cannabidiol (CBD) ejerce un efecto antiinflamatorio en el modelo de DNBS de la enfermedad intestinal en ratones (Borrelli et al., 2009).

Además, el documento EP1071417 describe el uso de cannabidiol puro. Se cree que el CBD puro es útil como agente antiinflamatorio y se proporcionan muchos datos para su uso como tratamiento para la artritis reumatoide.

Las solicitudes EP1361864 y EP1542657 sugieren que el uso de un producto de relación amplia CBD:THC (19:1) podría ser útil en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

La solicitud WO 2009/004302 describe una combinación de los cannabinoides tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) que puede ser útil en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino. La relación de THC a CBD utilizada está entre 1:1 a 1:2.

La enfermedad inflamatoria intestinal afecta a millones de individuos y, aunque se han realizado avances importantes con respecto al tratamiento, muchos pacientes todavía reciben un tratamiento por debajo del óptimo (Colombel et al.,

2008).

La solicitud WO 2009/004302 describe un extracto de CBD para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios intestinales, y la solicitud continúa divulgando que el extracto de CBD comprende cantidades menores de otros cannabinoides que incluyen CBG, CBC y CBDV.

5 La patente EP 2.044.935 describe un extracto de cannabis que podría ser útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias gastrointestinales. El extracto puede comprender CBG o CBD.

La solicitud WO 02/064109 describe que los extractos de THC y CBD pueden comprender cantidades menores de otros cannabinoides.

La patente EP 1.559.423 describe el uso de cannabinoides ácidos en enfermedades inflamatorias.

10 La solicitud GB 2450493 describe el uso de CBG en el tratamiento de muchas enfermedades diferentes o afecciones que dependen de la capacidad de CBG para agonizar los receptores CB1 y CB2.

La solicitud WO 2004/016246 divulga combinaciones de THC y CBD en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

15 Es un objeto de la presente invención proporcionar una nueva opción de tratamiento para enfermedades inflamatorias intestinales, ya que existe claramente una necesidad insatisfecha por nuevos medicamentos que sean capaces de controlar con éxito estas enfermedades.

20 Se ha observado que los fitocannabinoides tetrahidrocannabivarina (THCV); cannabigerol (CBG); cannabicromeno (CBC); y la cannabidivarina (CBDV) son agentes efectivos para reducir la inflamación intestinal. Dichos compuestos podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino, como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn.

Breve resumen de la divulgación

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de tetrahidrocannabivarina (THCV) para uso en el tratamiento curativo de enfermedades inflamatorias intestinales.

25 En una realización, la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerativa. En una realización adicional, la enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn.

En una realización, el THCV está en una forma sintética o aislada.

En una realización alternativa, el THCV está presente como un extracto de una planta de cannabis. Preferiblemente, el extracto de una planta de cannabis es una sustancia farmacéutica botánica (BDS).

Una BDS de THCV típica es como se describe en las tablas 1.1 y 1.2 a continuación:

30 Tabla 1.1 Cantidad de la BDS tetrahidrocannabivarina en total y un intervalo

BDS THCV	Cantidad (% p/p)	Intervalo ($\pm 10\%$)	Intervalo ($\pm 25\%$)	Intervalo ($\pm 50\%$)
CBGV	0,15	0,14 - 0,17	0,11 - 0,19	0,07 - 0,23
CBNV	1,30	1,20 - 1,40	1,00 - 1,60	0,65 - 1,95
THCV	64,49	58,04 - 70,94	48,37 - 80,61	32,25 - 96,74
CBCV	0,65	0,59 - 0,72	0,49 - 0,81	0,33 - 0,98
THC-C4	0,82	0,74 - 0,90	0,62 - 1,03	0,41 - 1,23
CBN	0,15	0,14 - 0,17	0,11 - 0,19	0,07 - 0,23
THCVA	0,36	0,32 - 0,40	0,27 - 0,45	0,18 - 0,54
THC	13,43	12,09 - 14,77	10,07 - 16,79	7,72 - 20,15
desconocidos	0,58	0,52 - 0,64	0,44 - 0,73	0,29 - 0,87
Total cannabinoides	81,93			
Total no cannabinoides	18,07			

La fracción que contiene fitocannabinoide total de BDS THCV comprende aproximadamente 74-90% (p/p) del total de BDS.

Tabla 1.2 BDS tetrahidrocannabinavina por porcentaje de cannabinoides

BDS THCV	Cantidad (% de cannabinoides totales)
CBGV	0,18
CBNV	1,59
THCV	78,71
CBCV	0,79
THC-C4	1,00
CBN	0,18
THCVA	0,44
THC	16,39
Desconocidos	0,71

5

La cantidad del fitocannabinoide principal en la BDS THCV como un porcentaje de la fracción que contiene fitocannabinoide es aproximadamente del 71-87% (p/p). La BDS THCV también tiene un THC cannabinoide secundario que está presente en aproximadamente 14.8-18% (p/p) de la fracción que contiene fitocannabinoides.

Preferiblemente, la dosis terapéuticamente efectiva de THCV está entre 1 mg y 2000 mg.

10 El equivalente de dosis humana (HED) se puede estimar usando la siguiente fórmula:

$$\text{HED} = \text{Dosis animal mg/kg multiplicada por } K_m \text{ Animal} / K_m \text{ Humana}$$

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

Breve descripción de los dibujos

15 Las formas de realización de la invención se describen con más detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra el efecto de cannabidivarina (CBDV), cannabicromeno (CBC), cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabinavina (THCV) aisladas sobre la viabilidad de macrófagos peritoneales en ratones;

20 La Figura 2 muestra el efecto de las sustancias farmacéuticas botánicas (BDS) cannabidivarina (CBDV), cannabicromeno (CBC), cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabinavina (THCV) en la viabilidad de macrófagos peritoneales del ratón;

La Figura 3 muestra el efecto de cannabidivarina (CBDV), cannabicromeno (CBC), cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabinavina (THCV) aisladas sobre los niveles de nitrito en los macrófagos peritoneales de ratón;

25 La Figura 4 muestra el efecto de las sustancias farmacéuticas botánicas (BDS) cannabidivarina (CBDV), cannabicromeno (CBC), cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabinavina (THCV) sobre los niveles de nitrito en los macrófagos peritoneales de ratón;

La Figura 5 muestra el efecto del cannabigerol (CBG) sobre el peso corporal en ratones con colitis inducida por DNBS;

La Figura 6 muestra el efecto del cannabigerol (CBG) en la relación peso/longitud del colon en ratones con colitis inducida por DNBS;

30 La Figura 7 muestra el efecto del cannabicromeno (CBC) sobre el peso corporal en ratones con colitis inducida por DNBS;

La Figura 8 muestra el efecto del cannabicromeno (CBC) sobre la relación peso/longitud del colon en ratones con colitis inducida por DNBS; y

La Figura 9 muestra el efecto de tetrahidrocannabivarina (THCV) sobre el peso corporal en ratones con colitis inducida por DNBS;

La Figura 10 muestra el efecto de la tetrahidrocannabivarina (THCV) en la relación peso/longitud del colon en ratones con colitis inducida por DNBS; y

- 5 La Figura 11 muestra el efecto del cannabigerol (CBG), cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabivarina (THCV) en la expresión de iNOS en ratones con colitis inducida por DNBS.

Descripción detallada

10 Los siguientes ejemplos se diseñaron para examinar si el fitocannabinoide tetrahidrocannabivarina (THCV) era capaz de reducir la inflamación en modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad inflamatoria intestinal. Los datos relacionados con los fitocannabinoides cannabigerol (CBG), cannabigerol (CBC) y cannabidivarina (CBDV) se incluyen solo a título informativo.

15 Está bien establecido que los macrófagos están profundamente implicados en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y regulan negativamente el exceso de respuestas inmunes provocadas por agresiones externas (Schenk y Mueller, 2007). Los estudios han sugerido que el tratamiento dirigido a los macrófagos mejora la inflamación colónica en modelos de colitis experimentales (Nakase et al., 2000; Kanai et al., 2006). Por lo tanto, la regulación de las respuestas anormales de los macrófagos parece ser un enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

El ejemplo 1 evalúa el potencial de los fitocannabinoides THCV, CBG, CBC y CBDV en la enfermedad inflamatoria intestinal por su efecto sobre los macrófagos peritoneales de ratón.

- 20 El ejemplo 2 investiga el efecto de CBG, CBC y THCV en un modelo *in vivo* de colitis.

Ejemplo 1: efecto de la tetrahidrocannabivarina (THCV), cannabigerol (CBG), cannabigerol (CBC) y cannabidivarina (CBDV) en macrófagos peritoneales de ratón

Materiales y métodos

Productos de prueba:

- 25 Se evaluaron los siguientes fitocannabinoides aislados y sus sustancias farmacológicas botánicas (BDS) correspondientes: THCV, CBG, CBC y CBDV. Estos compuestos se disolvieron en DMSO o etanol, que, a la concentración utilizada (0,01%), no tuvieron ningún efecto sobre las respuestas en estudio.

Aislamiento de macrófagos peritoneales de ratón:

30 Se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones como se describió previamente por Rossiet et al., (Rossiet et al., 2010). Brevemente, para provocar la producción de exudados peritoneales ricos en macrófagos, se inyectaron ratones por vía intraperitoneal (i.p.) con 1 mL de tioglicolato estéril al 10% (Sigma, Milán, Italia). Después de 4 días, los ratones se sacrificaron y los macrófagos peritoneales se recogieron y se sembraron en placas apropiadas para realizar experimentos *in vitro*.

Cultivo de células:

- 35 Se cultivaron macrófagos peritoneales en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal. La respuesta inflamatoria en los macrófagos peritoneales fue inducida por lipopolisacáridos (LPS) del serotipo 0111:B4 de *Escherichia coli* (1 µg/mL). La respuesta en macrófagos se midió después de 18 h de incubación con LPS.

Ensayos de citotoxicidad:

- 40 La viabilidad celular se midió evaluando la respiración celular, así como la absorción de rojo neutro (NR). La respiración celular se evaluó mediante la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) dependiente de mitocondrias hasta formazano. Después de la incubación con uno de los fitocannabinoides durante 24 horas, los macrófagos (1 x 10⁵ células por pozo sembradas en una placa de 96 pozos) se incubaron con MTT (250 µg/mL) durante 1 h.

- 45 El grado de reducción de MTT a formazano se cuantificó midiendo la densidad óptica a 490 nm (lector de absorbancia de microplacas iMark^{MR}, BioRad).

50 Para el ensayo de absorción de rojo neutro (NR), después de incubación con el producto de ensayo durante 24 horas, se incubaron macrófagos (1 x 10⁵ células por pozo sembradas en una placa de 96 pozos) con solución colorante rojo neutro (NR) (50 µg/mL) durante 3 horas, y luego se lisaron mediante la adición de ácido acético al 1%. La absorbancia se leyó a 532 nm (lector de absorbancia de microplacas iMark^{MR}, BioRad).

Medición de nitritos:

5 Se midieron nitritos, metabolitos estables de NO, en medio de macrófagos como se describió previamente [19]. Se incubaron macrófagos (5×10^5 células por pozo sembradas en una placa de 24 pozos) con un producto de prueba (0,1 - 10 μ M) durante 30 min, y posteriormente con LPS (1 μ g/mL) durante 18 horas. Después de la reducción de nitratos a nitritos por cadmio, los sobrenadantes celulares se incubaron con DAN (50 μ g/mL) durante 7 min y la reacción se detuvo con NaOH 2,8 N, los niveles de nitritos se midieron usando un lector de microplacas fluorescente (LS55 Luminescence Spectrometer, Perkin-Elmer Instrumentos, longitudes de onda de excitación-emisión de 365-450 nm).

Análisis estadístico:

10 Los resultados se expresan como la media \pm SEM y se analizaron con la prueba t de Student o ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples Turkey-Kramer. Un valor de P menor que 0,05 se consideró significativo.

Resultados

Citotoxicidad:

15 Los resultados sobre la citotoxicidad de los fitocannabinoides aislados se muestran en la Figura 1. Se puede observar que el CBDV aislado no era citotóxico hasta 10 μ M. Por el contrario, el THCv, CBG y CBC aislados redujeron significativamente la viabilidad celular a la concentración más alta de 10 μ M.

La Figura 2 describe la citotoxicidad de la BDS fitocannabinoide examinada. Se puede observar que todos las BDS fitocannabinoides redujeron la viabilidad de los macrófagos en el intervalo de 0,1-10 μ M.

20 Específicamente, la BDS CBDV era citotóxica a las concentraciones de 1 y 10 μ M, BDS CBC y BDS THCv a la concentración más alta ensayada (10 μ M), mientras que BDS CBG redujo significativamente la viabilidad de los macrófagos partiendo de la concentración de 0,1 μ M.

Niveles de nitrito:

25 Los niveles de nitritos, los metabolitos estables de NO, se incrementaron significativamente (en comparación con el control) en el medio de los macrófagos estimulados con LPS (1 μ g/mL) durante 18 horas con ambos fitocannabinoides aislados, como se muestra en la Figura 3, o la BDS fitocannabinoide, como se muestra en la Figura 4.

Los productos de prueba se usaron a concentraciones no citotóxicas como un tratamiento previo durante 30 min antes de la estimulación con LPS.

30 Todos los productos de prueba dieron como resultado una reducción significativa de los niveles de nitrito estimulados por LPS; sin embargo, el THCv y el CBG redujeron significativamente los niveles de nitrito estimulados por LPS. Se usó dexametasona (1 μ M), que es un potente glucocorticoide como control positivo.

Conclusión

Estos datos muestran que el THCv, CBG, CBC y CBDV aislados, así como sus BDS correspondientes, a concentraciones que se demostró que no son citotóxicas, reducen la producción de nitrito estimulada por LPS en los macrófagos.

35 Esto sugiere una posible acción antiinflamatoria en la enfermedad inflamatoria intestinal.

Ejemplo 2: efecto del cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC) y tetrahidrocannabivarina (THCV) en un modelo experimental murino de colitis ulcerativa

Materiales y métodos

Productos de prueba:

40 Se disolvieron cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC) y tetrahidrocannabivarina (THCV) en etanol/Tween20/solución salina. Los animales se colocaron en grupos y se les administró producto de prueba (60 μ L por ratón) por vía IP una vez al día. El tratamiento comenzó 3 días antes de la administración de DNBS para los experimentos de tratamiento preventivo o 1 día después de la administración de DNBS para los tratamientos curativos. El producto de prueba se administró diariamente hasta el sacrificio de los animales, 3 días después del tratamiento con DNBS. THCv solo fue probado para un efecto curativo.

45

Inducción de colitis:

La colitis se indujo en ratones mediante la administración intracolónica de DNBS. Brevemente, los ratones se anestesiaron y se les insertó DNBS (8 mg/ratón) en el colon usando un catéter de polietileno (1 mm de diámetro) a través del recto (a 4,5 cm del ano). Tres días después de la administración de DNBS, todos los animales se sacrificaron

mediante asfixia con CO₂. Se abrió el abdomen mediante una incisión en la línea media y se extrajo el colon, se aisló de los tejidos circundantes, se abrió a lo largo del borde antimesentérico, se enjuagó, se pesó, se midió la longitud y se procesó para las evaluaciones.

5 La actividad de la relación de peso del colon/longitud del colon se determinó como índice de inflamación. El peso corporal también fue evaluado.

Expresión de iNOS:

Se midió la expresión de iNOS en colonos de espesor completo de ratones tratados con control y DNBS mediante análisis de transferencia Western.

Análisis estadístico:

10 Los resultados se expresan como la media \pm SEM y se analizaron con la prueba t de Student o ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples Turkey-Kramer. Un valor de P menor que 0,05 se consideró significativo.

Resultados

Cannabigerol (CBG):

15 La Figura 5 demuestra que el pretratamiento con CBG dio como resultado una prevención estadísticamente altamente significativa ($p < 0,001$) de la disminución en el peso corporal que se asocia con la respuesta inflamatoria. El tratamiento después de la inducción de la colitis, sin embargo, no dio como resultado una disminución en el peso corporal.

20 La Figura 6 ilustra que tanto el pretratamiento con CBG como el post-tratamiento con CBG dieron como resultado una reducción significativa ($p < 0,05$) de la relación de peso del colon:longitud del colon, que es un índice de inflamación intestinal, lo que sugiere un efecto preventivo y curativo intestinal antiinflamatorio.

Cannabicromeno (CBC):

La Figura 7 demuestra que el pretratamiento con CBC dio como resultado una prevención significativa ($p < 0,05$) de la disminución en el peso corporal que está asociada con la respuesta inflamatoria. Sin embargo, el tratamiento con CBC después de la inducción de colitis no produjo una disminución en el peso corporal.

25 La Figura 8 ilustra que el pretratamiento con CBC dio como resultado una reducción significativa ($p < 0,05$) de la relación de peso del colon:longitud del colon, que es un índice de inflamación intestinal, lo que sugiere un efecto antiinflamatorio intestinal preventivo. El post-tratamiento con CBC todavía resultó en una disminución la relación de peso del colon:longitud del colon, sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo.

Tetrahidrocannabivarina (THCV):

30 La Figura 9 demuestra que el tratamiento con THCV dio como resultado una prevención de la disminución del peso corporal que está asociada con la respuesta inflamatoria, sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa.

35 La Figura 10 ilustra el tratamiento posterior con THCV en una reducción significativa ($p < 0,05$) de la relación del peso del colon:longitud del colon, que es un índice de inflamación intestinal, lo que sugiere un efecto antiinflamatorio intestinal curativo.

Expresión de iNOS:

La Figura 11 demuestra que el nivel de expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en tejidos colónicos fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$) menor en los animales tratados con THCV. Esto infiere que el THCV fue capaz de subregular la expresión de esta enzima de respuesta inflamatoria.

40 El nivel de expresión de iNOS en tejidos de colon también fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) menor en los animales tratados con CBG. Esto infiere que el CBG también fue capaz de subregular la expresión de esta enzima de respuesta inflamatoria.

Los animales tratados con CBC no mostraron una reducción de la expresión de iNOS.

Conclusión

45 Se ha demostrado que Cannabigerol (CBG) ejerce ambos efectos preventivos y curativos en un modelo experimental murino de colitis ulcerativa y tetrahidrocannabivarina (THCV) que ejerce un efecto curativo en un modelo experimental murino de colitis ulcerativa.

Estos efectos de CBG y THCV probablemente estén asociados con una subregulación de la expresión de la enzima

inflamatoria iNOS que ambos muestran.

Se ha demostrado que el fitocannabinoide cannabícromeno (CBC) ejerce un efecto preventivo sobre la inflamación.

Como tales, estos fitocannabinoides son objetivos clínicos relevantes para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un fitocannabinoide que consiste esencialmente en tetrahidrocannabivarina (THCV) para uso en el tratamiento curativo de enfermedades inflamatorias intestinales.
- 5 2. Una cantidad terapéuticamente eficaz de THCV de acuerdo con la reivindicación 1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerativa.
3. Una cantidad terapéuticamente eficaz de THCV de acuerdo con la reivindicación 1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn.
4. Una cantidad terapéuticamente eficaz de THCV de acuerdo con la reivindicación 1 para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que THCV está en una forma sintética o aislada.
- 10 5. Una cantidad terapéuticamente eficaz de THCV de acuerdo con la reivindicación 1 para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la dosis terapéuticamente eficaz de THCV está entre 1 y 2000 mg.

Figura 1

Efecto de cannabidivarina (CBDV), cannabicromeno (CBC), cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabinol aislados sobre la viabilidad de macrófagos peritoneales de ratón

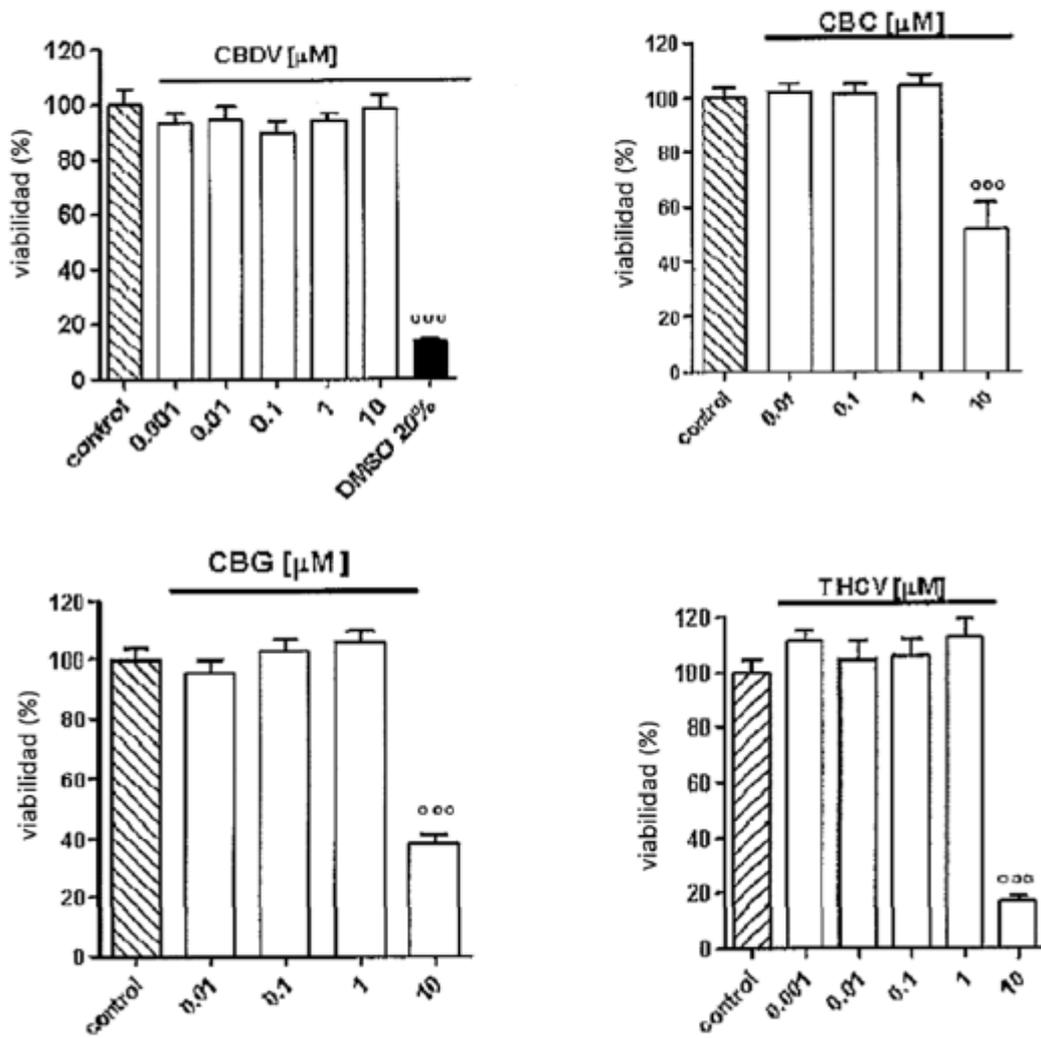


Figura 2

Efecto de las sustancias farmacéuticas botánicas (BDS) cannabidivarina (CBDV), cannabicromeno (CBC), cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabivarina (THCV) sobre la viabilidad de macrófagos peritoneales de ratón

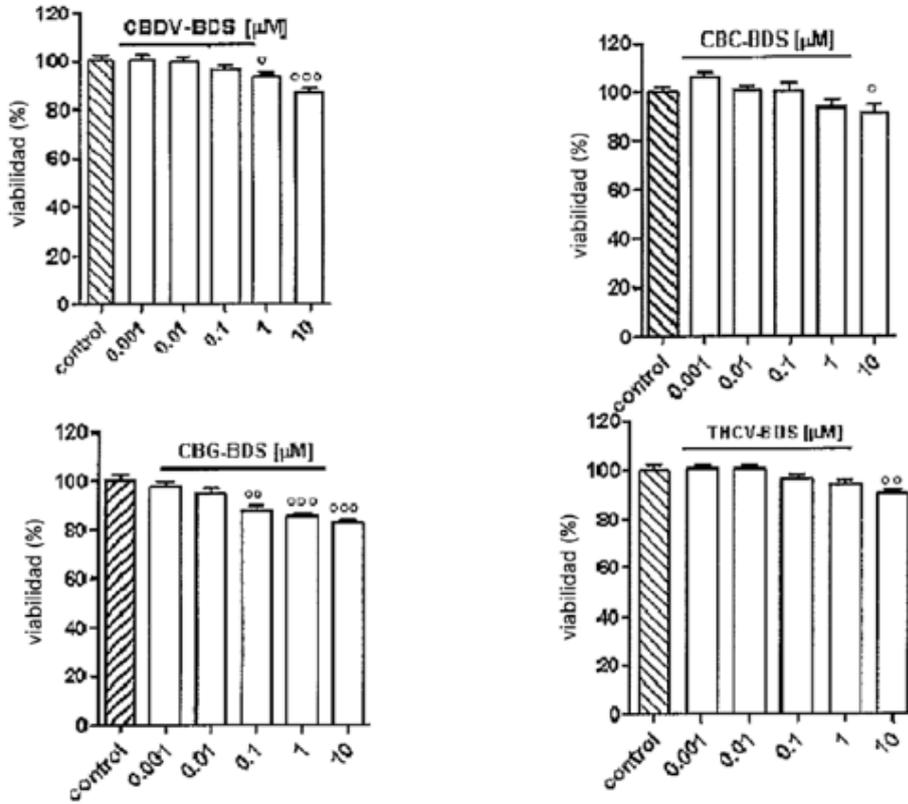


Figura 3

Efecto de cannabidivarina (CBDV), cannabicromeno (CBC), cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabivarina (THCV) aisladas sobre los niveles de nitritos en macrófagos peritoneales de ratón

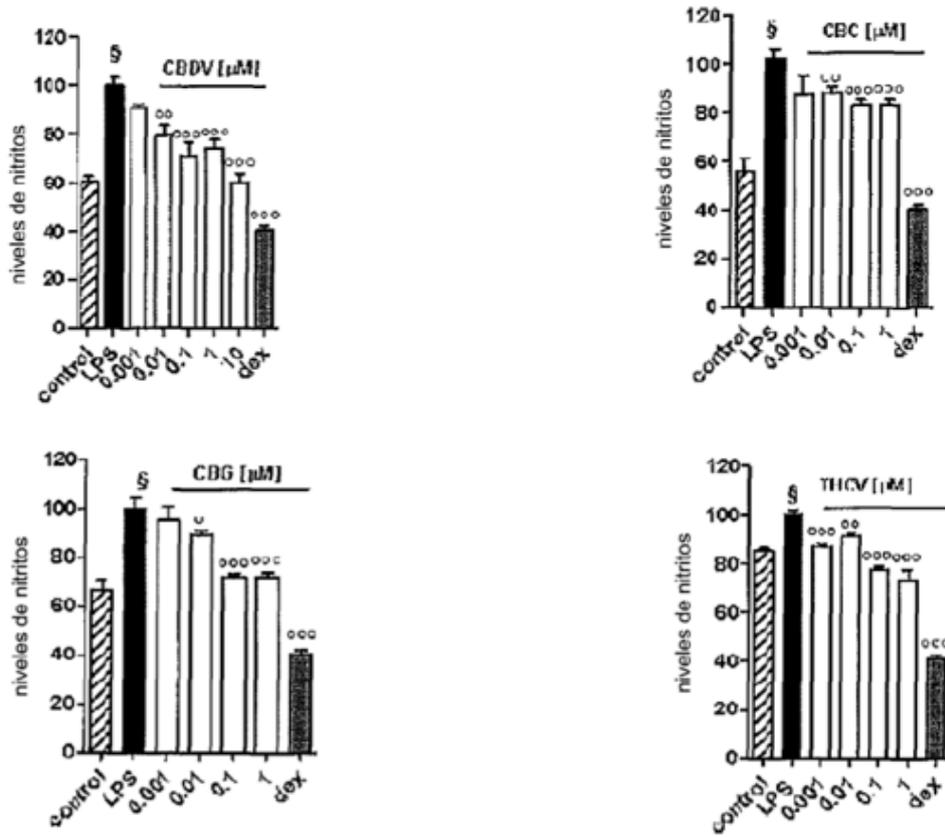


Figura 4

Efecto de las sustancias farmacéuticas botánicas (BDS) cannabidivarina (CBDV), cannabicromeno (CBC), cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabivarina (THCV) sobre los niveles de nitritos en macrófagos peritoneales de ratón

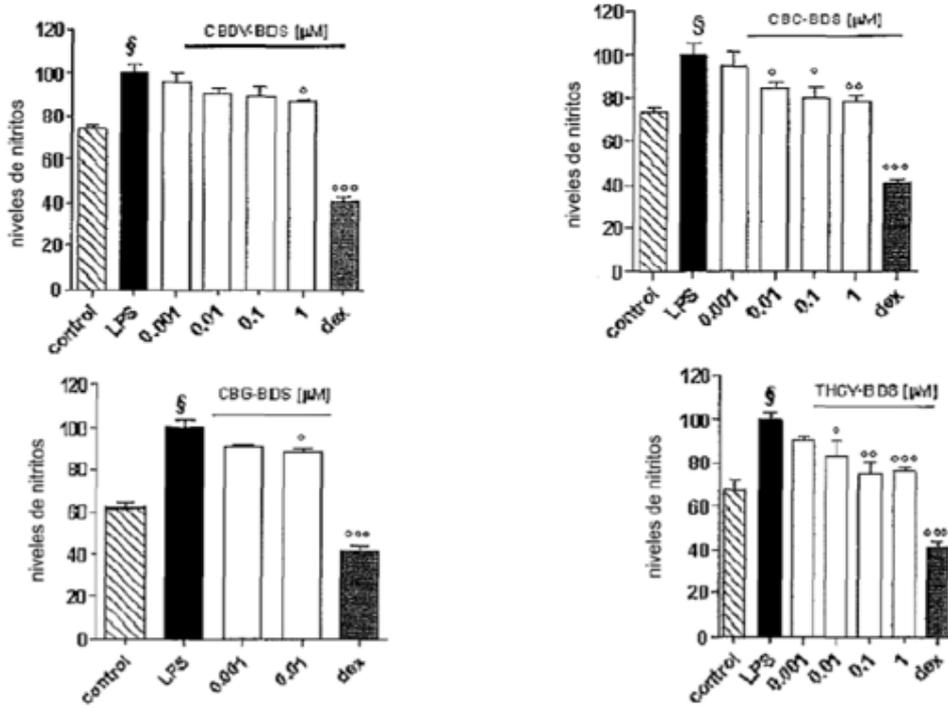
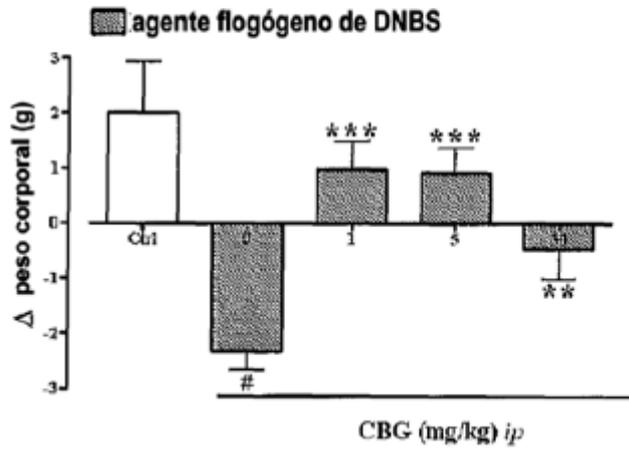


Figura 5

Efecto del cannabigerol (CBG) sobre el peso corporal en ratones con colitis inducida por DNBS

A (tratamiento preventivo)



B (tratamiento curativo)

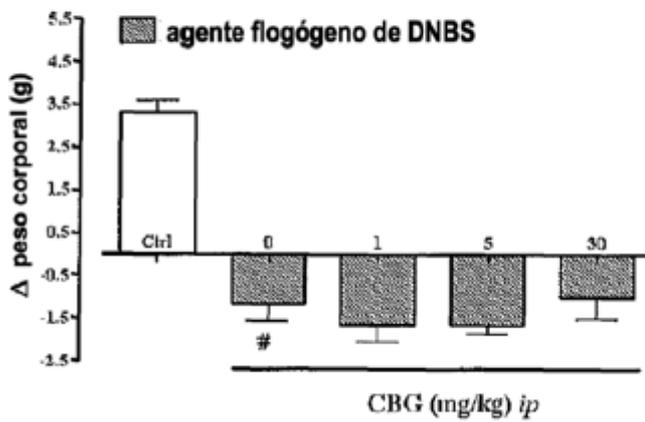
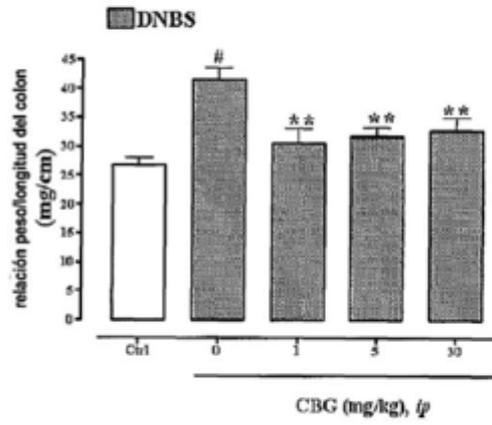


Figura 6

Efecto del cannabigerol (CBG) en la relación peso: longitud del colon en ratones con colitis inducida por DNBS

A (tratamiento preventivo)



B (tratamiento curativo)

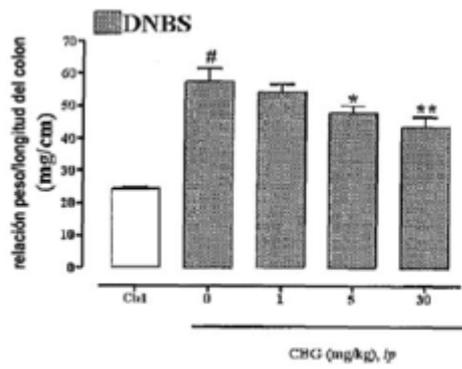
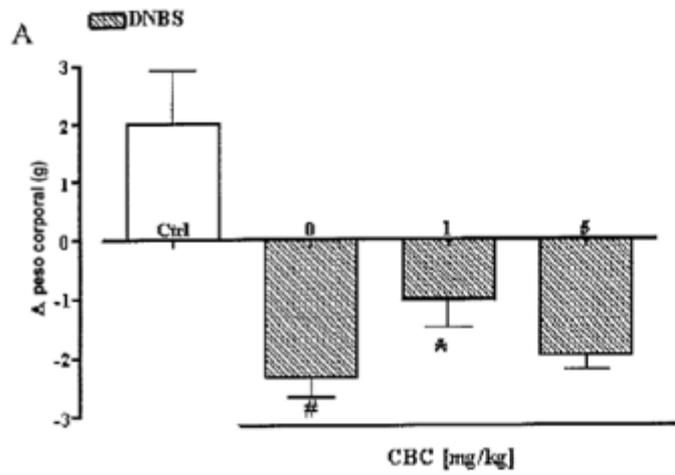


Figura 7

Efecto del cannabicromeno (CBC) sobre el peso corporal en ratones con colitis inducida por DNBS

A (tratamiento preventivo)



B (tratamiento curativo)

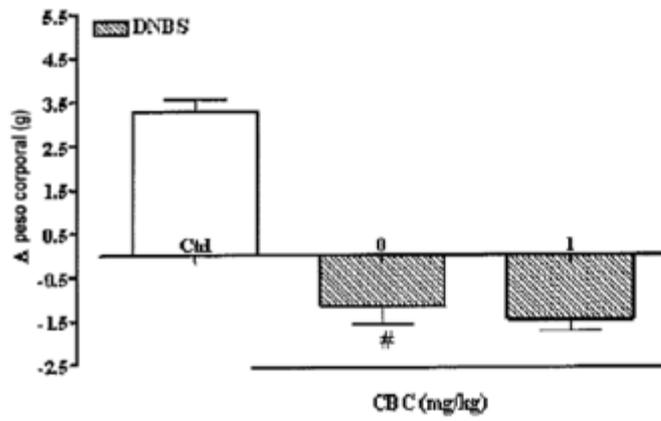
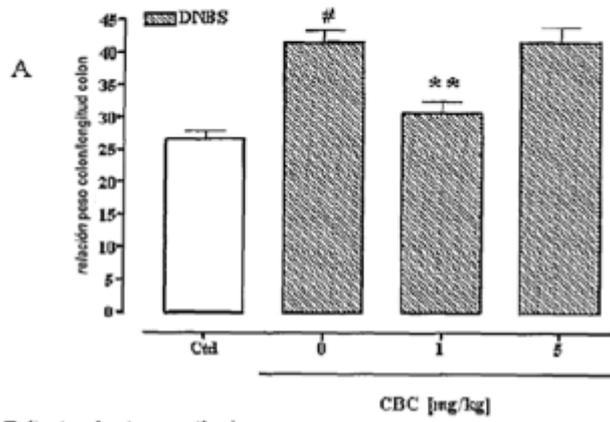


Figura 8

Efecto del cannabicromeno (CBC) sobre la relación peso: longitud del colon en ratones con colitis inducida por DNBS

A (tratamiento preventivo)



B (tratamiento curativo)

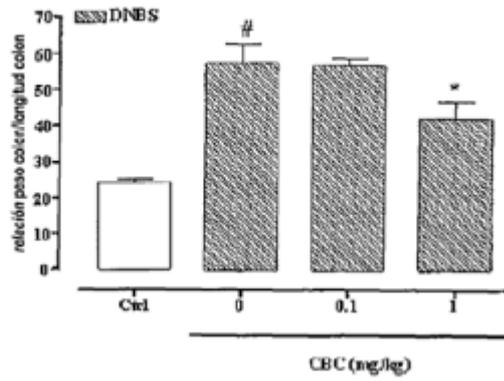


Figura 9

Efecto del tetrahidrocannabivarina (THCV) sobre el peso corporal en ratones con colitis inducida por DNBS

Tratamiento curativo

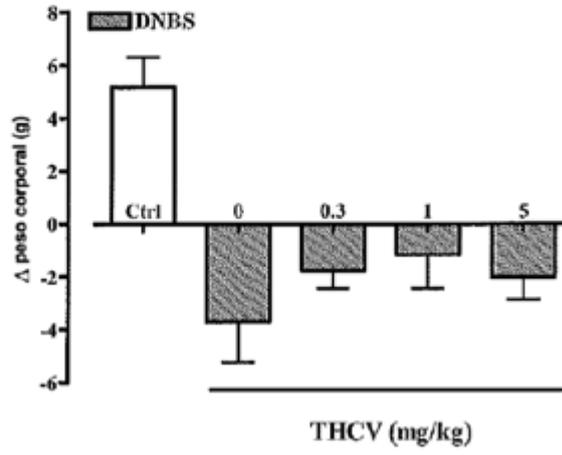


Figura 10

Efecto del tetrahidrocannabivarina (THCV) sobre la relación peso: longitud del colon en ratones con colitis inducida por DNBS

Tratamiento curativo

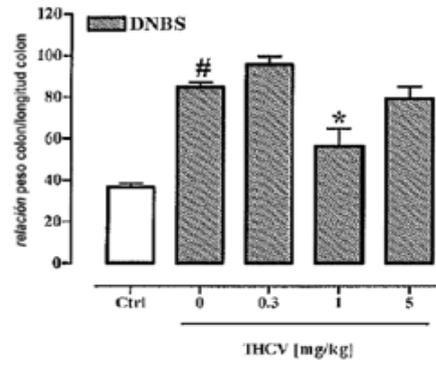


Figura 11

Efecto de cannabicromeno (CBC), cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabivarina (THCV) sobre la expresión de iNOS en ratones con colitis inducida por DNBS

