

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 062**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61K 36/185** (2006.01)  
**A61P 21/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/015** (2006.01)  
**A61K 31/047** (2006.01)  
**A61K 31/05** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2015 PCT/GB2015/053044**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16059411**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2015 E 15784121 (4)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3206681**

54 Título: **Uso de cannabinoides en el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas degenerativas**

30 Prioridad:  
**14.10.2014 GB 201418172**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.11.2019**

73 Titular/es:  
**GW RESEARCH LIMITED (100.0%)  
Sovereign House, Vision Park, Histon  
Cambridge, CB24 9BZ, GB**

72 Inventor/es:  
**DI MARZO, VINCENZO;  
STOTT, COLIN;  
FOSTER, KEITH y  
IANNOTTI, FABIO**

74 Agente/Representante:  
**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 732 062 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**

Uso de cannabinoides en el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas degenerativas

5 La presente invención se refiere al uso de cannabidiol (CBD) en el tratamiento de la enfermedad muscular esquelética degenerativa. En particular la enfermedad muscular esquelética degenerativa es distrofia muscular de Duchenne (DMD).

Antecedentes de la invención

10 La miogénesis esquelética es un procedimiento herméticamente regulado que requiere cambios coordinados en la expresión de un gran número de genes que permitan la proliferación de mioblastos para diferenciarse en miotubos (Shieh, 2013). Este procedimiento es alterado en diferentes miopatías; entre ellas, la distrofia muscular de Duchenne (DMD) donde se pierde la capacidad regenerativa de las células precursoras (satélite) del músculo esquelético. Su disminuida capacidad para diferenciarse en miotubos maduros y funcionales conduce a una progresiva debilidad muscular con degeneración crónica.

15 Aunque hay un gran número de funciones atribuidas al sistema endocannabinoide, se sabe muy poco acerca de su función en la regeneración y diferenciación celular del músculo esquelético. Recientemente, fue encontrado que el endocannabinoide 2-AG inhibe la diferenciación de mioblastos de ratón y humanos mediante un mecanismo dependiente CB1 (Iannotti *et al.* 2013).

20 El desarrollo del músculo esquelético es un procedimiento multifactorial, altamente controlado, que implica la regulación coordinada de un gran número de genes que resultan en la proliferación de células de mioblastos que abandonan el ciclo celular, y posteriormente se fusionan en matrices ordenadas de grandes miotubos multinucleados que se diferencian aún más en fibras musculares maduras. (Iannotti *et al.* 2010).

Los cambios en la expresión y activación funcional de diversas clases de canales iónicos parecen estar asociada con la transición del mioblasto a miotubo (Cooper, 2001).

25 Las células de ratón C2C12 se pueden usar en un modelo experimental *in vitro* para la miogénesis esquelética, este método puede ser usado para determinar los efectos potenciales de los compuestos en los procedimientos de diferenciación de células musculares esqueléticas.

Un modelo adicional que usa células humanas satélite puede también ser usado como una prueba *in vitro* para estudiar la diferenciación celular. Las células satélites son precursores de las células musculares esqueléticas, capaces de dar lugar a células musculoesqueléticas diferenciadas. Tras la activación, las células satélites pueden volver a entrar al ciclo celular para proliferar y diferenciarse en mioblastos.

30 Un miocito es el tipo de célula encontrada en el tejido muscular, es el tipo de célula encontrada en el tejido muscular estas son células tubulares que se desarrollan a partir de mioblastos para formar músculos en un procedimiento conocido como miogénesis. Hay diversas formas especializadas de miocitos: células cardíacas, esqueléticas, y de músculo liso con diversas propiedades.

35 Hay varios tipos diferentes de enfermedades musculoesqueléticas degenerativas de las cuales la distrofia muscular de Duchenne (DMD) es por mucho la más común. Otros tipos de enfermedad muscular esquelética incluyen: distrofia muscular de Becker (BMD); distrofia muscular congénita; distrofia muscular distal; distrofia muscular de Emery-Dreifuss; distrofia muscular Facioscapulohumeral (FSHD); distrofia muscular de la cintura y extremidades (LGMD); distrofia muscular miotónica; y distrofia muscular orofaríngea.

40 La DMD en general afecta solamente a niños (con extremadamente raras excepciones), y se hace clínicamente evidente cuando un niño comienza a caminar. A los 10 años, el niño puede necesitar los brazos para caminar y a los 12 años, la mayoría de los pacientes son incapaces de caminar.

45 La esperanza de vida de los pacientes con DMD oscila entre los 15 a 51 años. A principios de la década de 1990, los investigadores identificaron el gen para la proteína distrofina la cual, cuando está ausente, causa DMD. La cantidad de distrofina se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (esto es, a menos distrofina presente, más severo es el fenotipo).

Dado que el gen está en el cromosoma X, éste trastorno afecta principalmente a los hombres, y las mujeres quienes son portadores que presentan síntomas más leves. Mutaciones esporádicas en este gen ocurren frecuentemente, representando un tercio de los casos. Los dos tercios restantes de los casos se heredan en un patrón recesivo.

50 La distrofina es parte de una estructura compleja que implica otros varios componentes de proteínas. El complejo "distrofina-glicoproteína" ayuda a anclar el esqueleto estructural (citoesqueleto) dentro de las células musculares, a través de la membrana externa (sarcolema) de cada célula, a la estructura del tejido (matriz extracelular) que rodea

a cada célula. Debido a defectos en este ensamblaje, la contracción de los músculos conduce a la ruptura de la membrana externa de las células musculares y al eventual debilitamiento y desgaste del músculo.

5 Los glucocorticoides, más precisamente prednisona y deflazacort, son los principales fármacos para el tratamiento de DMD. Ellos han sido usados durante más de dos décadas y son los únicos medicamentos que han demostrado aumentar la fuerza muscular.

10 Como los glucocorticoides son antiinflamatorios e inmunosupresores a largo plazo el uso de estos compuestos puede resultar en muchos efectos secundarios perjudiciales. La inmunosupresión es un problema mayor en los usuarios de glucocorticoides lo cual a su vez puede significar que el sistema inmune de un paciente sea menos funcional lo que los deja a ellos propensos a graves infecciones. Además la curación de heridas requiere una cierta cantidad de inflamación y esta puede retrasarse durante la terapia con glucocorticoides.

Los glucocorticoides también pueden elevar el azúcar en la sangre, lo que a su vez puede resultar en diabetes mellitus. La absorción del calcio puede ser suprimida y puede resultar la osteoporosis. La atrofia muscular también puede ocurrir con terapia con glucocorticoides a largo plazo.

15 Con el fin de tratar las enfermedades musculoesqueléticas degenerativas tales como la DMD es importante para un medicamento que permita la diferenciación de células satélite en mioblastos y la diferenciación de mioblastos en miotubos. Es conocido que la activación CB1 también estimula la proliferación de mioblastos y por lo tanto los endocannabinoides, dependiendo de "cuando" y "donde" ellos actúan, puedan tanto inhibir como estimular la formación del músculo afectando el ciclo celular y la plasticidad.

20 Los fitocannabinoides pueden actuar directa o indirectamente en el receptor CB1 para contrarrestar los efectos de su activación. Los fitocannabinoides pueden también contrarrestar las respuestas inflamatorias tales como aquellas que ocurren en la DMD. Estas respuestas inflamatorias empeoran significativamente las consecuencias de la diferenciación muscular alterada, reduciendo de este modo la esperanza de vida de los pacientes con DMD. Adicionalmente, los fitocannabinoides pueden inhibir la inactivación de endocanabinoide.

25 Ha sido encontrado que los fitocannabinoides, en particular los fitocannabinoides CBD y CBDV son efectivos para habilitar la diferenciación de células satélite en mioblastos y la diferenciación de mioblastos en miotubos. Esto fue sorprendente dado que estos compuestos no son compuestos activos CB1.

Breve resumen de la divulgación

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona el cannabidiol (CBD) para uso en el tratamiento de la enfermedad muscular esquelética degenerativa.

30 Preferiblemente la enfermedad muscular esquelética degenerativa es distrofia muscular de Duchenne (DMD).

Preferiblemente la dosis de los fitocannabinoides está entre 1 y 1000 mg/kg por día.

Preferiblemente el CBD comprende uno o más excipientes.

Breve descripción de los dibujos

35 Las realizaciones de la invención se describen adicionalmente a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra el efecto de CBDA, CBG y THCV 1 y 3  $\mu$ M en diferenciación de células C2C12;

La figura 2 muestra el efecto de CBD y CBDV 1 y 3  $\mu$ M en diferenciación de células C2C12;

La figura 3 muestra el efecto de una exposición a corto plazo a CBD en mioblastos C2C12;

La figura 4 muestra el efecto de CBD, CBDV y THCV en diferenciación de células satélites;

40 La figura 5 muestra imágenes representativas de contraste de fases de células satélite tratadas con CBD, CBDV y THCV en 4 días;

La figura 6 muestra imágenes representativas de contraste de fases de células satélites tratadas con CBD, CBDV y THCV en 4 días;

La figura 7 muestra los cambios en masa corporal en ratones MDX después de 16 semanas;

45 La figura 8 muestra la expresión de PCR en tiempo real de los marcadores de genes DMD; y

La figura 9 muestra el número de células inflamatorias CD8.

Las leyendas de las figuras se describen con más detalle a continuación:

Figura 1. Los niveles de expresión del ARNm para miogenina (Myog) y troponina (Tnnt-1) fueron cuantificados mediante qPCR después de 24h de la exposición de las células C2C12 expuestas a DM + CBDA (A), CBG (B) o THCv (C) en las concentraciones indicadas. Cada barra representa el promedio  $\pm$  S.E.M. en al menos cuatro experimentos separados. \* $p \leq 0.05$  vs. grupo vehículo respectivo (columna blanca).

5 Figura 2. El nivel de expresión del ARNm para miogenina (Myog) y troponina (Tnnt-1) fue cuantificado mediante qPCR después de 24h de la exposición de los mioblastos C2C12 expuestos a DM + CBD (A), y CBDV (B) en las concentraciones indicadas. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. en al menos cuatro experimentos separados. \* $p \leq 0.05$  vs. grupo vehículo respectivo (columna blanca). (C) El análisis de transferencia Western de los niveles de proteína MyHC en células C2C12 diferenciadas tratadas con CBD 1  $\mu$ M. Las manchas representativas muestran la masa molecular aproximada de la proteína MyHC (expresada en kDa) (parte superior) y la cuantificación de los valores OD promediados para MyHC normalizada a los de  $\alpha$ -tubulina (abajo) son mostrados. \* $p \leq 0.05$  vs. grupo vehículo respectivo (GM). Cada punto de datos es de al menos cuatro determinaciones independientes.

Figura 3. El nivel de expresión de ARNm para miogenina (Myog) y troponina (Tnnt-1) fue cuantificado en mioblastos expuestos a DM + CBD 1  $\mu$ M durante 10 min y luego mantenidos en DM sin CBD por las posteriores 3 y 24 h.

15 Figura 4. Efecto de CBD, CBDV y THCv en la diferenciación de célula satélite: el nivel de expresión de ARNm de miogenina (Myog), troponina (Tnnt- 1) y miosina de cadena pesada (MyHC) fue cuantificado por qPCR después de 5 días de exposición de SC a DM + CBD (columnas de color gris claro), CBDV (columnas de color gris oscuro) y THCv (columnas blancas). Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos separados. \* $p \leq 0.05$  vs. grupo vehículo respectivo (columna blanca).

20 Figura 5. Se muestran imágenes representativas de contraste de fases de células satélites tratadas con CBD (1  $\mu$ M), CBDV y THCv (3  $\mu$ M). Las imágenes fueron tomadas a los 4 días de exposición de la célula a DM en presencia o no de fitocannabinoide.

Figura 6. Se muestran imágenes representativas de contraste de fases de células satélites tratadas con CBD (1  $\mu$ M), CBDV and THCv (3  $\mu$ M). Las imágenes fueron tomadas a los 5 días de exposición de la célula a DM en presencia o no de fitocannabinoide.

Figura 7. Después de la semana 4, la masa corporal total de la cohorte del vehículo solo fue significativamente mayor que la de los ratones mdx tratados con CBD y tanto el vehículo como el CBD fueron significativamente mayores que la de los ratones mdx tratados con DFZ (en semana 15, vehículo=31.17g, CBD=29.42g, DFZ=26.26; diferencias 5.6% y 15.8%,  $p < 0.05$ ).

30 Figura 8. Los músculos gastrocnemios fueron recuperados en la semana 4 y se determinaron las expresiones genéticas relativas (a) Sirtuin-1 (Sirt1) tiene aumento significativamente regulado en la cohorte del CBD solo (84.9%;  $n=9$   $p < 0.05$ ). (b) PGC1a tiene aumento significativamente regulado en la cohorte del CBD solo (125.8%;  $n=9$   $p < 0.001$ ). (c) NADH deshidrogenasa 2 codificada mitocondrialmente (MT-ND2) tiene aumento significativamente regulado en la cohorte del CBD solo (253.2%;  $n=4$   $p < 0.05$ ).

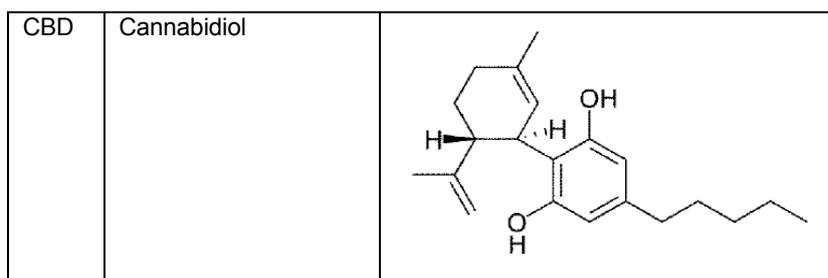
35 Figura 9. Los bazos fueron recuperados en la semana 4 y las células positivas CD8 fueron analizadas. El porcentaje total de población de CD8 fue inafectado por DFZ, sin embargo el porcentaje total de población de CD8 significativamente se redujo del 10.9% (vehículo) al 8.7% (CBD); diferencia 19.7% ( $n=9$ ;  $p < 0.001$ ).

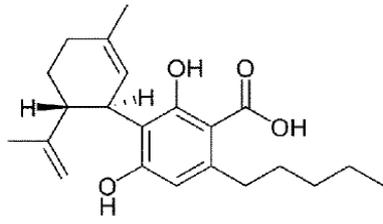
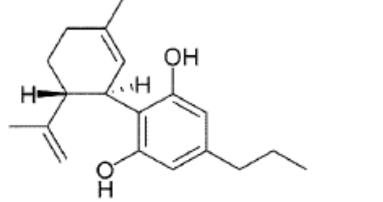
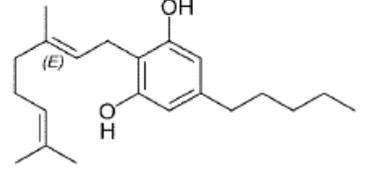
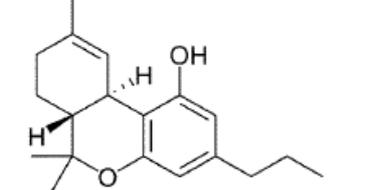
La referencia a los cannabinoides CBDV, CBDA, CBG y THCv se incluyen solo como referencia y no forman parte de la invención.

40 Definiciones

Las definiciones de algunos de los términos usados para describir la invención son detalladas a continuación:

Los cannabinoides descritos en la presente aplicación se enumeran a continuación junto con sus abreviaturas estándar.



CBDA	Ácido Cannabidiólico	
CBDV	Cannabidivarina	
CBG	Cannabigerol	
THCV	Tetrahidrocannabivarina	

5 La tabla anterior no es exhaustiva y simplemente detalla los cannabinoides que se identifican en la presente solicitud para referencia. Hasta ahora 60 cannabinoides diferentes han sido identificados y estos cannabinoides pueden ser divididos en diferentes grupos como sigue: fitocannabinoides; endocannabinoides y cannabinoides sintéticos (los cuales pueden ser nuevos cannabinoides o fitocannabinoides o endocannabinoides producidos sintéticamente).

Los "fitocannabinoides" son cannabinoides que se originan en la naturaleza y se pueden encontrar en la planta de cannabis. Los fitocannabinoides se pueden aislar de plantas para producir un extracto altamente purificado o pueden ser reproducidos sintéticamente.

10 Los "cannabinoides altamente purificados" son definidos como cannabinoides que han sido extraídos a partir de la planta de cannabis y purificados en la medida que se hayan eliminado otros cannabinoides y componentes no cannabinoides que son coextraídos con los cannabinoides que han sido removidos, de tal manera que el cannabinoide altamente purificado sea más grande o igual al 98 % (p/p) puro.

Los "cannabinoides sintéticos" son compuestos que presentan una estructura cannabinoide o similar a cannabinoide y son fabricados usando medios químicos en lugar de los de la planta.

15 Los fitocannabinoides pueden ser obtenidos tanto de la forma neutra (forma descarboxilada) o de la forma de ácido carboxílico dependiendo del método usado para extraer los cannabinoides. Por ejemplo es conocido que calentando la forma de ácido carboxílico causara que la mayor parte de la forma de ácido carboxílico sea descarboxilada a la forma neutra.

Descripción detallada

20 El ejemplo 1 a continuación describe el uso de los fitocannabinoides CBD, CBDV; CBDA; THCV y CBG en un modelo de ratón de diferenciación de mioblasto.

El ejemplo 2 continúa describiendo el uso de CBD, CBDV y THCV en un modelo de células satélites humanas.

El ejemplo 3 describe el uso de CBD en un estudio *in vivo* en un modelo mamífero de DMD.

Los datos presentados en este documento sorprendentemente demuestran que los fitocannabinoides CBD, CBDV y THCV, pero no CBDA y CBG, pueden ofrecer una nueva oportunidad farmacológica para tratar enfermedades musculoesqueléticas degenerativas irreversibles, tales como DMD. Dado que los primeros son capaces de estimular la diferenciación de tres marcadores diferentes.

- 5 La referencia a los cannabinoides CBDV, CBDA, CBG y THCV se incluyen solo como referencia y no forman parte de la invención.

Ejemplo 1: efecto de los fitocannabinoides en la diferenciación de mioblastos C2C12 de ratón

Materiales y métodos

Cultivo celular y reactivos

- 10 Los mioblastos C2C12 de ratón fueron propagados en un medio de cultivo (GM) compuesto por medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS), penicilina 50 U/ml más estreptomina 50 µg/ml, y L glutamina al 1% (Invitrogen, Milan, Italia), en una atmosfera humidificada de 95% de aire/CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C.

- 15 C2C12 es una línea celular de mioblasto de ratón. Estas células son capaces de la diferenciación y son una herramienta útil para estudiar la diferenciación de mioblastos y osteoblastos, para expresar diversas proteínas, y para explorar vías mecánicas.

La exposición de proliferación de células C2C12 por 24 a 72h a una baja concentración de FBS (desde 10% a 0.1%), más la adición de insulina 5 µg/ml y transferrina 5 µg/ml (medio de diferenciación, DM), indujo su diferenciación en miotubos.

- 20 Viabilidad celular

Las células C2C12 fueron sembradas a una densidad de 2x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> en placas plásticas de 24 pocillos. Un día después de la siembra en placas, fueron adicionadas estatinas (solas o en presencia de fitocannabinoides) al medio de cultivo 24h. La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo de reducción con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; 5 mg/ml; Sigma-Aldrich), y se detectó la formación de formazano tras la reducción del MTT por mitocondrias de células vivientes espectrofotométricamente a 595 nm.

- 25

Análisis de transferencia Western

Las células fueron lavadas dos veces en PBS frio y lisadas con solución de lisis (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4, Tris-HCl 10 mM, pH 8, 1% SDS, e inhibidores de proteasa). Los lisados (50-60 ug) fueron hervidos 5 min en solución reguladora de carga SDS Laemmli y separados mediante electroforesis en gel al 8% SDS-poliacrilamida. Los filtros se incubaron durante la noche a 4°C con un anti-MyHC de ratón (dilución, 1:1000; Millipore).

- 30

Un anticuerpo antitubulina (dilución, 1:5000; Sigma-Aldrich) fue usado para verificar la carga igual de proteína. Las bandas reactivas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia (ECL-plus; GE Healthcare). Las imágenes fueron analizadas en una estación ChemiDoc con el software Quantity one (Bio-Rad, Segrate, Italia).

Extracción de ARNm y análisis cuantitativo PCR (qPCR)

- 35 El ARN total fue aislado de los tejidos nativos mediante el uso del reactivo TRI (Life Technology, Milan, Italia), reaccionado con DNasa-I (1U/µl; Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante y luego cuantificando por análisis espectrofotométrico.

Ambos lados de los hipocampos fueron analizados. La preparación final de ARN fue considerada libre de ADN y proteínas si la proporción entre las lecturas a 260/280 nm era > a 1.7. El ARNm purificado fue transcrito de forma inversa mediante el uso de transcriptasa reversa (enzima-VILO) (Life Technology, Milan, Italia). La PCR cuantitativa en tiempo real fue llevada a cabo en CFX384 en tiempo real.

- 40

Sistema de detección de la PCR (Bio-Rad, Segrate MI, Italia) con cebadores específicos mediante el uso de la detección SYBR Green (Bio-Rad, Segrate MI, Italia). Las muestras fueron amplificadas simultáneamente en cuadruplicado en un solo ensayo realizado con un blanco de control sin plantilla para cada par de cebadores para controlar la contaminación o formación de dímeros de cebadores, y se determinó el valor ct (umbral de ciclo) para cada grupo experimental

- 45

Los genes constitutivos (proteína ribosomal S16) han sido usados como un control interno para normalizar los valores ct, usando la fórmula 2-dCt; las diferencias en el contenido de ARNm entre los grupos fueron expresados como 2-ddct, como se describe previamente (Iannotti *et al.* 2013)

- 50 Materiales

Los fitocannabinoides altamente purificados CBD; CBDV; CBDA; THCV y CBG fueron probados en este ejemplo.

#### Estadística

Los datos se expresan como la media  $\pm$  S.E.M. del número dado de experimentos (n). Los conjuntos de datos fueron comparados mediante el uso de pruebas t de Student o, si era necesario, con un análisis de varianza de una vía, seguido de la prueba Newman-Keul. Las diferencias estadísticamente significativas fueron aceptadas cuando p fue < 0.05.

#### Resultados

Con el fin de obtener información sobre los efectos potenciales de los fitocannabinoides en la diferenciación del mioblasto, las células C2C12 fueron inducidas a diferenciarse durante 24-48h en DM en presencia o ausencia de diversos fitocannabinoides.

Luego se usó el análisis qPCR para evaluar el nivel de desarrollo de expresión de los marcadores esqueléticos canónicos regulados Myog y Tnnt-1.

Como se muestra en la figura 1A y la figura 1B, los mioblastos diferenciados en presencia del CBDA (1 y 3  $\mu$ M) o CBG (3  $\mu$ M) han reducido significativamente los niveles de expresión de ARNm para Myog y Tnnt-1. Mientras que, THCV (1 y 3  $\mu$ M) no produjo efectos significativos (Figura 1C).

En contraste, CBD (1  $\mu$ M) y CBDV (1 y 3  $\mu$ M) promovieron la diferenciación de mioblasto, como es revelado por el aumento significativo de expresión de ARNm de Myog y Tnnt-1 (Figura 2A y Figura 2B).

El efecto de CBD 1  $\mu$ M en la formación de miotubo fue confirmado mediante análisis de transferencia Western. La exposición durante 72h de la célula a DM + CBD 1  $\mu$ M, se aumentó significativamente la expresión de la proteína de miosina de cadena pesada (MyHC) en proporción a las condiciones de control (Figura 2C).

También se probó el efecto potencial de exposición a CBD a corto plazo a 1  $\mu$ M en células de diferenciación C2C12.

El día después de la siembra en placa, los mioblastos C2C12 fueron expuestos a DM en presencia o no de CBD 1  $\mu$ M, durante 10 min. Después de este tiempo, la DM fue refrescada y las células se lavaron antes de su exposición a la DM (sin fármacos) por las siguientes 3 y 24 h. Los análisis qPCR revelaron que después de 3 y 24 h, las células C2C12 expuestas a CBD 1  $\mu$ M tuvieron niveles de transcripción significativamente más altos tanto para Myog como Tnnt-1 (Figura 3). Estos resultados indican que una corta exposición al CBD es suficiente para promover los procedimientos de diferenciación de los mioblastos.

#### Conclusiones

Estos datos muestran por vez primera que los fitocannabinoides CBD, CBDV, y THCV pueden regular la diferenciación de células musculares esqueléticas.

En particular los fitocannabinoides CBD y CBDV producen un aumento estadísticamente significativo en la diferenciación de mioblastos (en contraste a los otros cannabinoides) como se muestra en las figuras 2A y 2B.

Esto significa que estos particulares fitocannabinoides o combinaciones de los mismos pueden probar ser útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades crónicas o musculoesqueléticas degenerativas las cuales son causadas por alteración de los procedimientos de diferenciación y posterior degeneración del tejido muscular esquelético, tales como distrofias, incluyendo la distrofia muscular de Duchenne.

#### Ejemplo 2: efecto de fitocannabinoides en diferenciación de células satélites humanas

##### Materiales y métodos

##### Cultivo celular y reactivos

Las células satélite humanas primarias (SC) fueron adquiridas de Innoprot Inc (Bizkaia-España) y propagadas en un medio de crecimiento (GM) el cual contenía aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, compuestos orgánicos e inorgánicos, hormonas, factores de crecimiento, minerales traza y una baja concentración de suero fetal bovino (5%) (Innoprot Inc/Bizkaia- España) en una atmosfera humidificada de 95% aire/CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C.

La exposición de células satélite proliferativas 4-5 días a una menor concentración de FBS (desde 10% a 0.1%), más la adición de insulina 5  $\mu$ g/ml y transferrina 5  $\mu$ g/ml (medio de diferenciación, DM), indujo sus diferenciaciones en miotubos.

##### Extracción de ARNm y análisis cuantitativo PCR (qPCR)

Como se describe en el ejemplo 1.

## Materiales

Los fitocannabinoides altamente purificados CBD; CBDV y THCV fueron probados en este ejemplo.

## Estadística

Como se describe en el ejemplo 1.

## 5 Resultados

Para investigar más a fondo los efectos de los cannabinoides CBD, CBDV y THCV en la diferenciación de precursores de células musculoesqueléticas se usó el análisis qPCR.

10 En particular, la diferenciación de células musculoesqueléticas fue cuantificada por medición de los niveles transcritos de miogenina (Myog), troponina (Tnnt-1) y miosina de cadena pesada (MyHC). Todos los cuales son ampliamente considerados marcadores específicos de músculos, requeridos para la formación de miotubo.

El análisis QPCR reveló que después de 5 días de exposición a SC a medios de diferenciación en presencia de CBD 1  $\mu$ M, CBDV o THCV 3  $\mu$ M, los niveles transcritos de marcadores esqueléticos canónicos de diferenciación tales como Myog, Tnnt-1 y MyHC se aumentaron significativamente (Fig. 4).

15 Las células satélite humanas de diferenciación también fueron examinadas en modo contraste de fase mediante microscopía de luz convencional. Como se muestra en las figuras 5 y 6 respectivamente, después de 4 y 5 días de exposición a la DM en presencia de CBD 1  $\mu$ M, CBDV y THCV 3  $\mu$ M que diferencian SC muestran claras diferencias morfológicas con respecto al grupo control tratado con vehículo (DMSO). En particular, después de 5 días de incubación en presencia de fitocannabinoides, las células aparecían más fusionadas y siendo los miotubos maduros más grandes en tamaño.

20 Esta última diferencia fue más apreciable en células tratadas con THCV (Fig. 6).

Estos efectos encontrados en células precursoras primarias del músculo esquelético humano fueron mucho más prominentes que aquellas observadas en células de ratón C2C12 (Ejemplo 1).

## Conclusiones

25 Los datos muestran que la exposición a CBD, CBDV o THCV contribuyen a una mayor diferenciación de células precursoras en miotubos.

30 En trastornos degenerativos del músculo esquelético, tales como distrofia muscular de Duchenne (DMD), la pérdida de la capacidad regenerativa de las células precursoras (satélite) del músculo esquelético y la capacidad reducida para diferenciarse en miotubos maduros y funcionales conducen a una debilidad muscular progresiva con degeneración crónica. Parece que los fitocannabinoides CBD, CBDV, y THCV (en contraste a los cannabinoides CBDA y CBG) son todos efectivos para mejorar la diferenciación de las células precursoras del músculo esquelético humano y como tal deberían ser consideradas una opción de tratamiento para los pacientes con dicha condición.

Ejemplo 3: efecto de cannabidiol (CBD) en un modelo mamífero de DMD

## Materiales y métodos

### Animales:

35 Los ratones Mdx fueron alimentados y alojados según Home Office regulations. A las 6 semanas de edad grupos de ratones hembra mdx (control n=18, deflazcort n=18, CBD n=19) fueron aclimatados con Kolliphor al 3.5%/agua (v/v) en agua potable.

40 Los grupos Control fueron mantenidos con Kolliphor al 3.5% durante la duración del estudio. Los grupos Deflazacort (DFZ) fueron mantenidos con Kolliphor al 3.5% durante 2 semanas y luego mantenidos con DFZ 1.2mg/kg/día en Kolliphor al 3.5% durante 16 semanas (n=8).

Los grupos CBD fueron aclimatados con Kolliphor al 3.5%, durante 7 días. En el día 7, el Kolliphor al 3.5% fue suplementado con CBD a 75mg/kg/día durante 3 días; luego se aumentó el CBD a 120mg/kg/día durante 16 semanas (n=8).

45 Los ratones y las botellas se pesaron dos veces por semana para controlar la masa corporal y el consumo. Los ratones se alojaron en grupos, por lo tanto se calcula el consumo promedio.

### PCR en tiempo real:

El músculo gastrocnemio fue recuperado en la semana 4 y las expresiones de genes relativos fueron determinadas.

El ARN fue extraído de las células siguiendo tratamiento con CBD. El ARN control fue extraído del grupo control (RNeasy kit, Qiagen). 2µg de ARN de cada muestra fue transcrito de forma reversa usando cebadores oligo dT (rt nanoscript 2, Diseño cebador).

5 Los genes endógenos de control estable (Pak1lip1, Htatsf1) fueron identificados usando el software GeNorm Kit qbase+ de ratón (Diseño cebador).

La PCR en tiempo real fue conducida usando SYBR green (Life Technologies) en un termociclador AB Biosystems. Todos los experimentos de la PCR en tiempo real fueron conducidos con las siguientes condiciones de reacción. Inicial 95°C 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C, durante 15 segundos, 60°C, durante 1 min, seguido de análisis de curva de fusión.

10 Los niveles relativos de expresión de genes fueron determinados usando el método de la curva estándar y se expresan en proporción con el promedio de los controles endógenos.

Marcadores inflamatorios:

Los bazos fueron recuperados en la semana 4 y se analizaron las células positivas CD8.

Resultados:

15 La figura 7 detalla los pesos corporales de los ratones durante las 16 semanas del estudio. Como se puede ver la masa corporal total entre los grupos de vehículo y CBD no difirieron hasta la semana 4; sin embargo el grupo de deflazacort fue significativamente más ligero (8.9%,  $p<0.05$ ).

20 Después de la semana 4, la masa corporal total de la cohorte de vehículo solo fue significativamente mayor que los ratones mdx tratados con CBD y tanto vehículo como CBD fueron significativamente mayores que los ratones tratados con deflazacort (en la semana 15, vehículo=31.17g, CBD=29.42g, DFX=26.26; 5.6% y diferencias de 15.8%,  $p<0.05$ ).

La figura 8 detalla la PCR en tiempo real del musculo gastrocnemio en la semana 4 y las expresiones relativas de los genes. La figura 8 (a) muestra que Sirtuin-1 (Sirt1) tiene aumento significativamente regulado en la cohorte de CBD solo (84.9%;  $n=9$   $p<0.05$ ).

25 La figura 8 (b) muestra que la PGC1  $\alpha$  tiene aumento significativamente regulado en la cohorte de CBD (125.8%;  $n=9$   $p<0.001$ ).

La figura 8(c) muestra que NADH deshidrogenasa 2 codificada mitocondrialmente (MT-ND2) tiene aumento significativamente regulado en la cohorte de CBD sola (253.2%;  $n=4$   $p<0.05$ ).

30 La figura 9 demuestra los niveles de células positivas CD8 en los bazos de los animales. Esto se puede ver como el porcentaje total de población de CD8 que fue inafectada por deflazacort, sin embargo, el porcentaje total de población de CD8 se reduce significativamente del 10.9% (vehículo) al 8.7% (CBD); 19.7% de diferencia ( $n=9$ ;  $p<0.001$ ).

Conclusiones:

Los datos *in vivo* anteriores demuestran que CBD es capaz de tratar DMD.

35 Los datos de la PCR en tiempo real del modelo de ratón de DMD demuestra que los tres genes Sirt-1; PGC1  $\alpha$  y ND2 estaban regulados al alza. Estos genes son importantes marcadores en la DMD de la siguiente manera;

Sirtuin-1 (Sirt-1) es un gen encontrado en humanos y otros mamíferos que ayuda a promover la supervivencia mediante protección de las células durante tiempos en los que la comida y la energía escasean.

40 El receptor gamma activado con proliferador de Peroxisoma, coactivador 1 alfa (PGC1 $\alpha$ ), es un coactivador transcripcional que regula los genes implicados en el metabolismo energético demostrando por primera vez que el CBD promueve un metabolismo oxidativo y fenotipo angiogénico en células musculares esqueléticas.

NADH deshidrogenasa 2 codificada mitocondrialmente (MT-ND2) es un gen asociado con el metabolismo.

45 El aumento estadísticamente significativo de todos estos genes en los ratones con DMD tratados con CBD sugiere que la CBD es capaz de promover la regulación positiva de los genes lo cual resultara en un aumento del musculo y como tal sugiere un tratamiento útil para la DMD.

Además la reducción de los marcadores inflamatorios con CBD adicionalmente sugiere que el tratamiento adicionalmente produce un efecto antiinflamatorio el cual será de utilidad en el tratamiento de enfermedades tales como DMD.

Referencias:

Cooper E (2001) A new role for ion channels in myoblast fusion. *J Cell Biol* 153:F9-F12. Shieh, *Neurol Clin.* 2013; Muscular dystrophies and other genetic myopathies.;31(4):1009-29.

5 Iannotti FA, Barrese V, Formisano L, Miceli F, Tagliatela M (2013) Specification of skeletal muscle differentiation by repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-regulated Kv7.4 potassium channels. *Mol Biol Cell* 24(3):274-284.

Iannotti FA, et al. (2010) Expression, localization, and pharmacological role of Kv7 potassium channels in skeletal muscle proliferation, differentiation, and survival after myotoxic insults. *J Pharmacol Exp Ther* 332(3):811-820.

**REIVINDICACIONES**

1. Cannabidiol (CBD) para uso en el tratamiento de enfermedad muscular esquelética degenerativa.
2. CBD para uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad muscular esquelética degenerativa es la distrofia muscular de Duchenne (DMD).
- 5 3. CBD para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la dosis de CBD está entre 1 y 1000 mg/kg día.
4. CBD para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además uno o más excipientes.

Efecto de CBDA, CBG y THCV 1 y 3  $\mu\text{M}$  en diferenciación de células C2C12

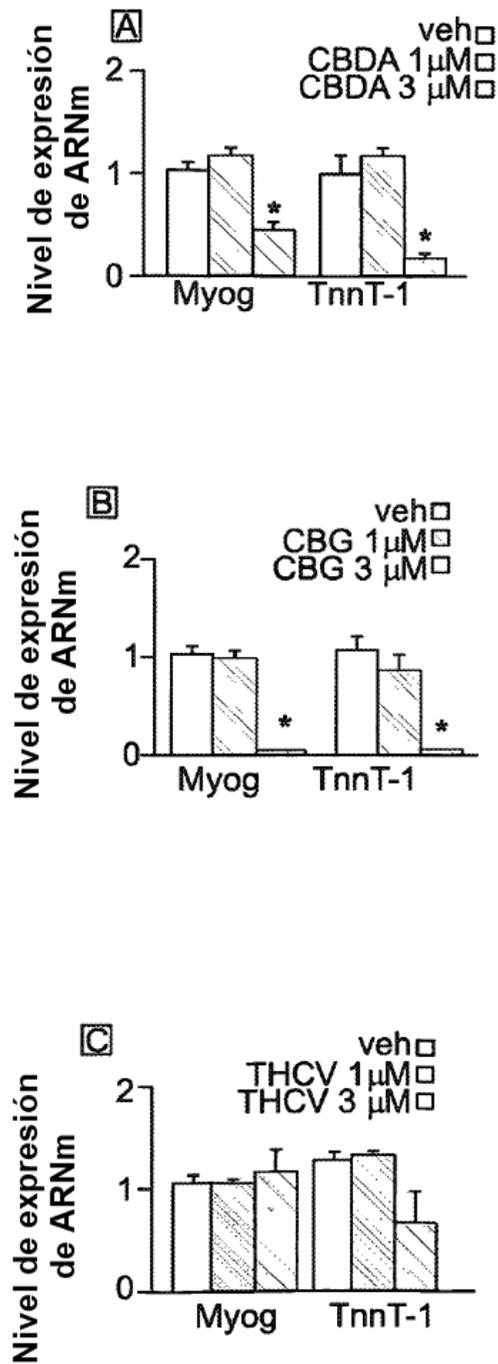


Fig. 1

Efecto de CBD y CBDV 1 y 3  $\mu\text{M}$  en diferenciación de células C2C12

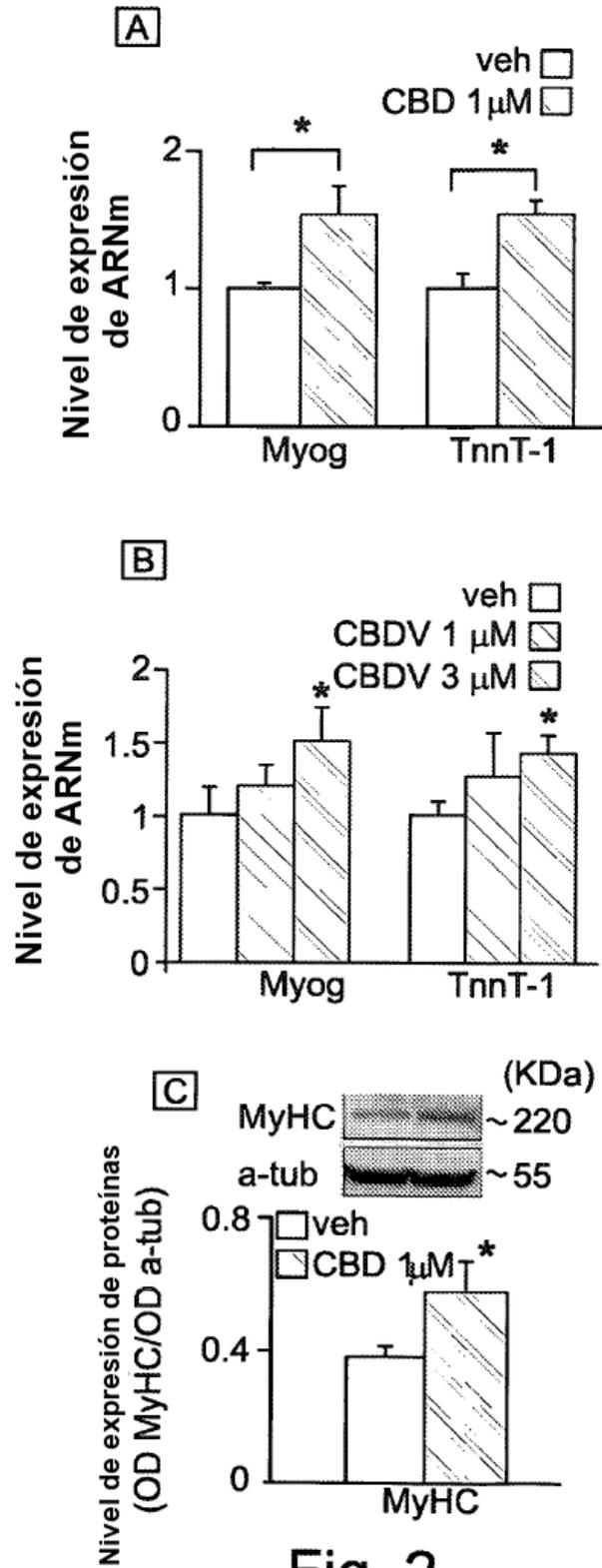
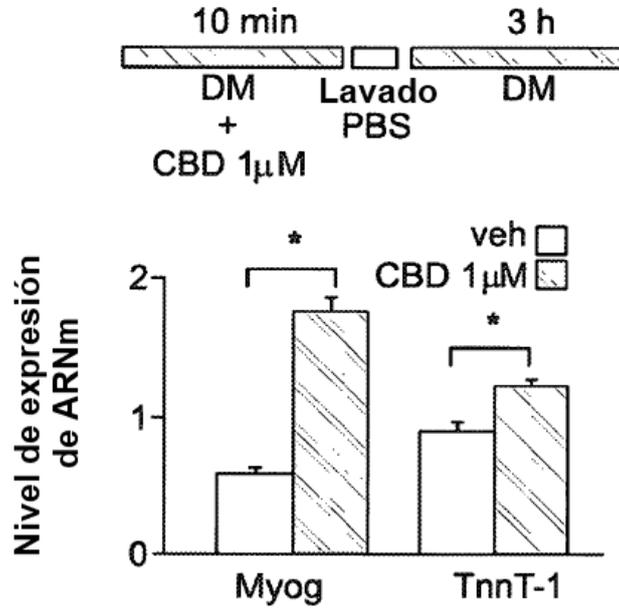


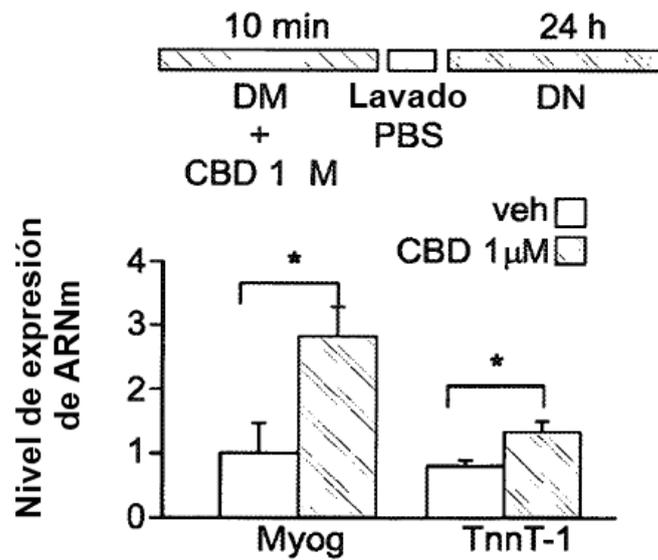
Fig. 2

**Efecto de una exposición a corto plazo a CBD en mioblastos C2C12**

**A**



**B**



**Fig. 3**

Efecto de CBD, CBDV y THCV en diferenciación de células satélites

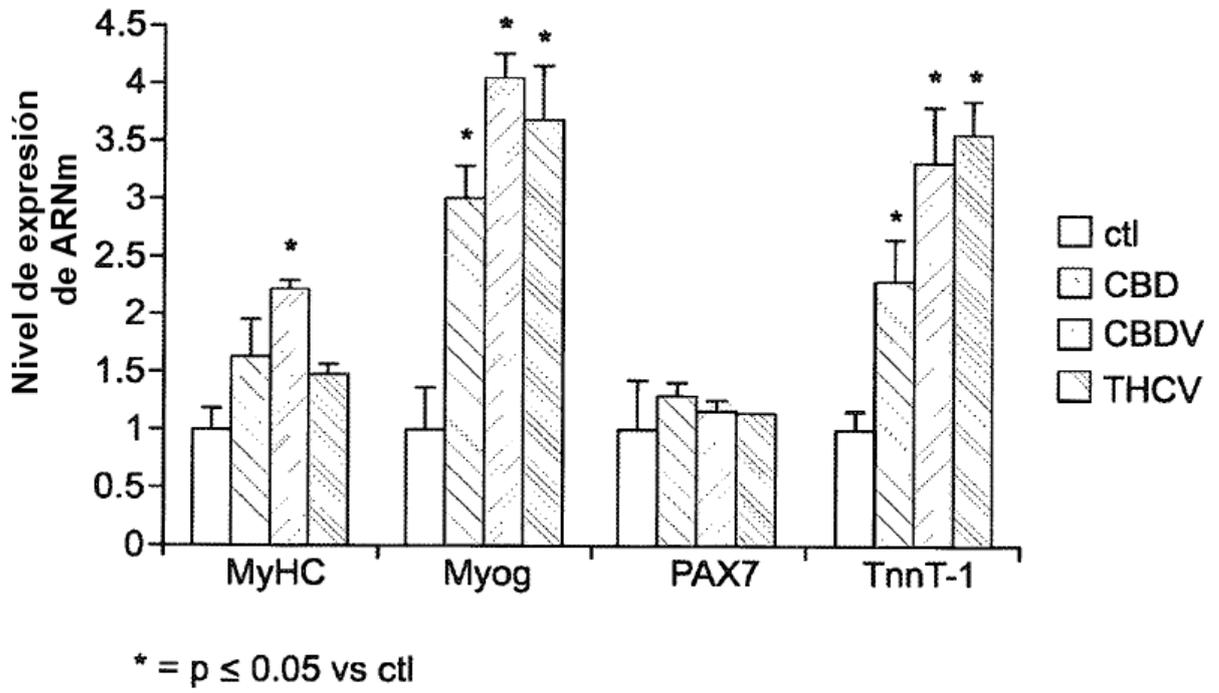
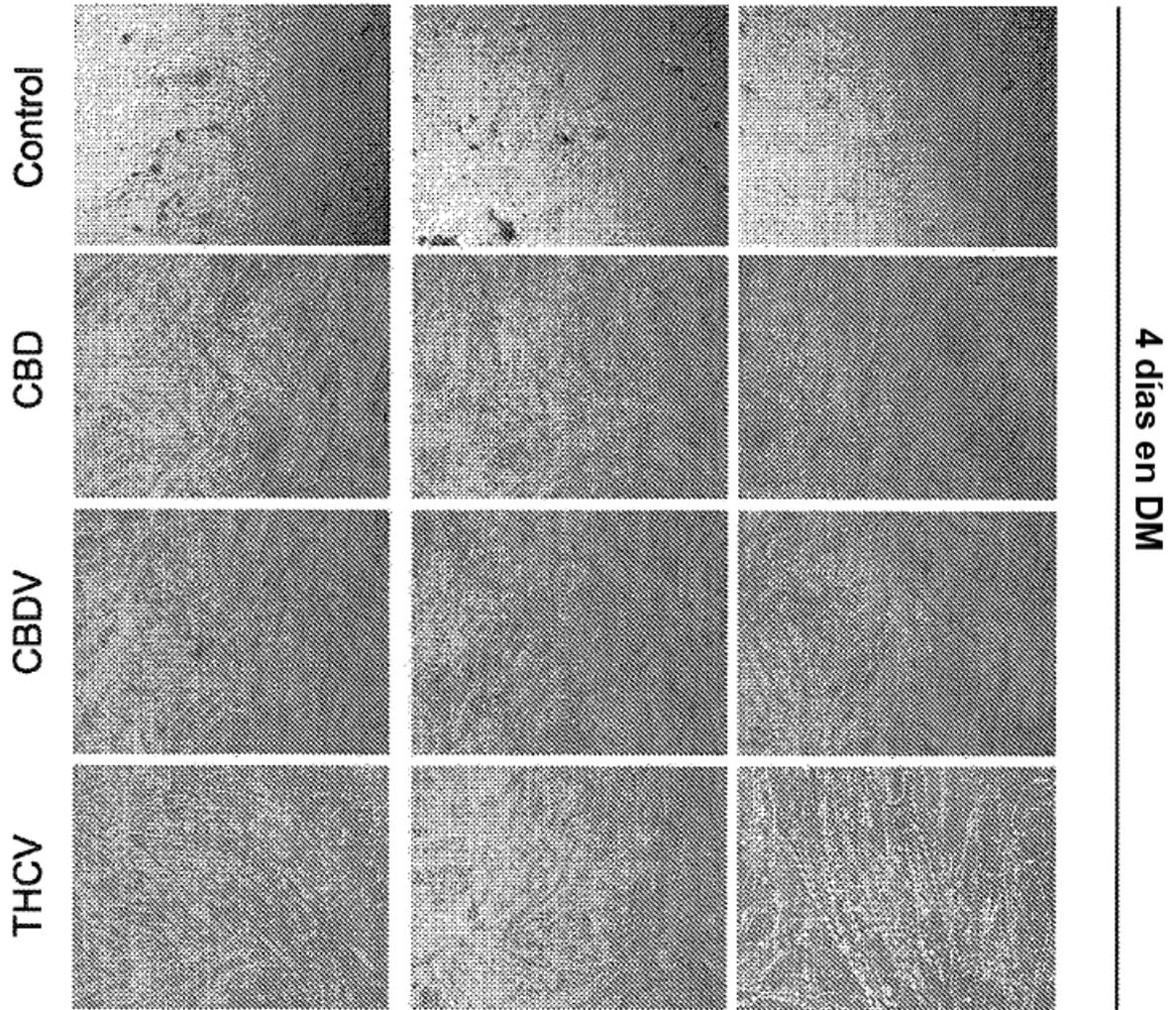


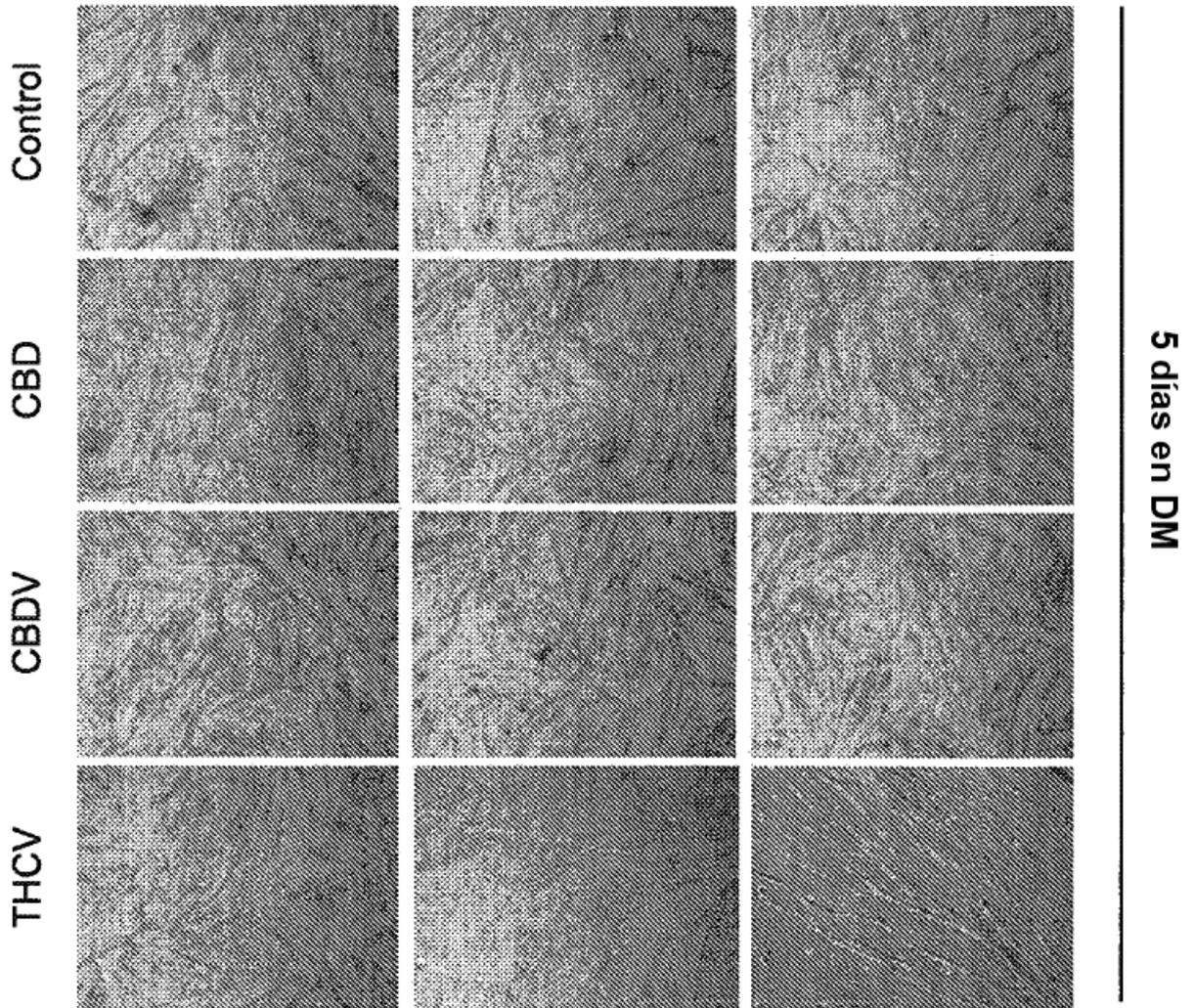
Fig. 4

**Imágenes de contraste de fases de fases de células satélite tratadas con CBD, CBDV y THCV en 4 días**



**Fig. 5**

**Imágenes de contraste de fases de fases de células satélites tratadas con CBD, CBDV y THCV en 5 días**



**Fig. 6**

Cambios en masa corporal en ratones MDX después de 16 semanas

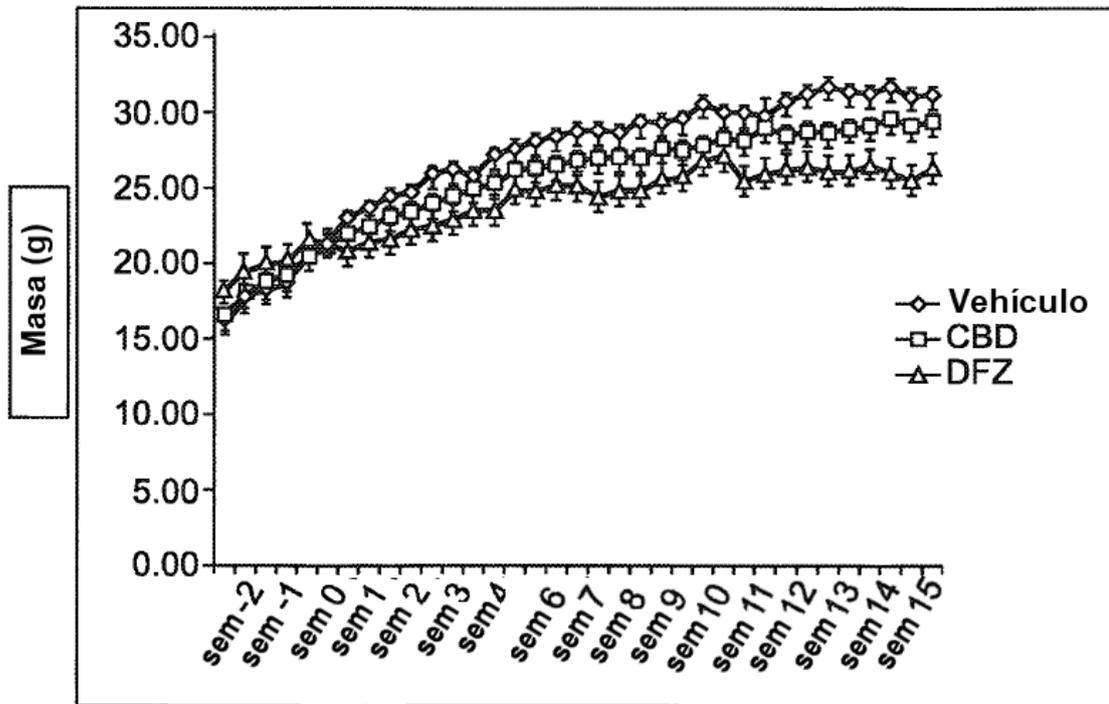


Fig. 7

Expresión de PCR en tiempo real de los marcadores de genes DMD

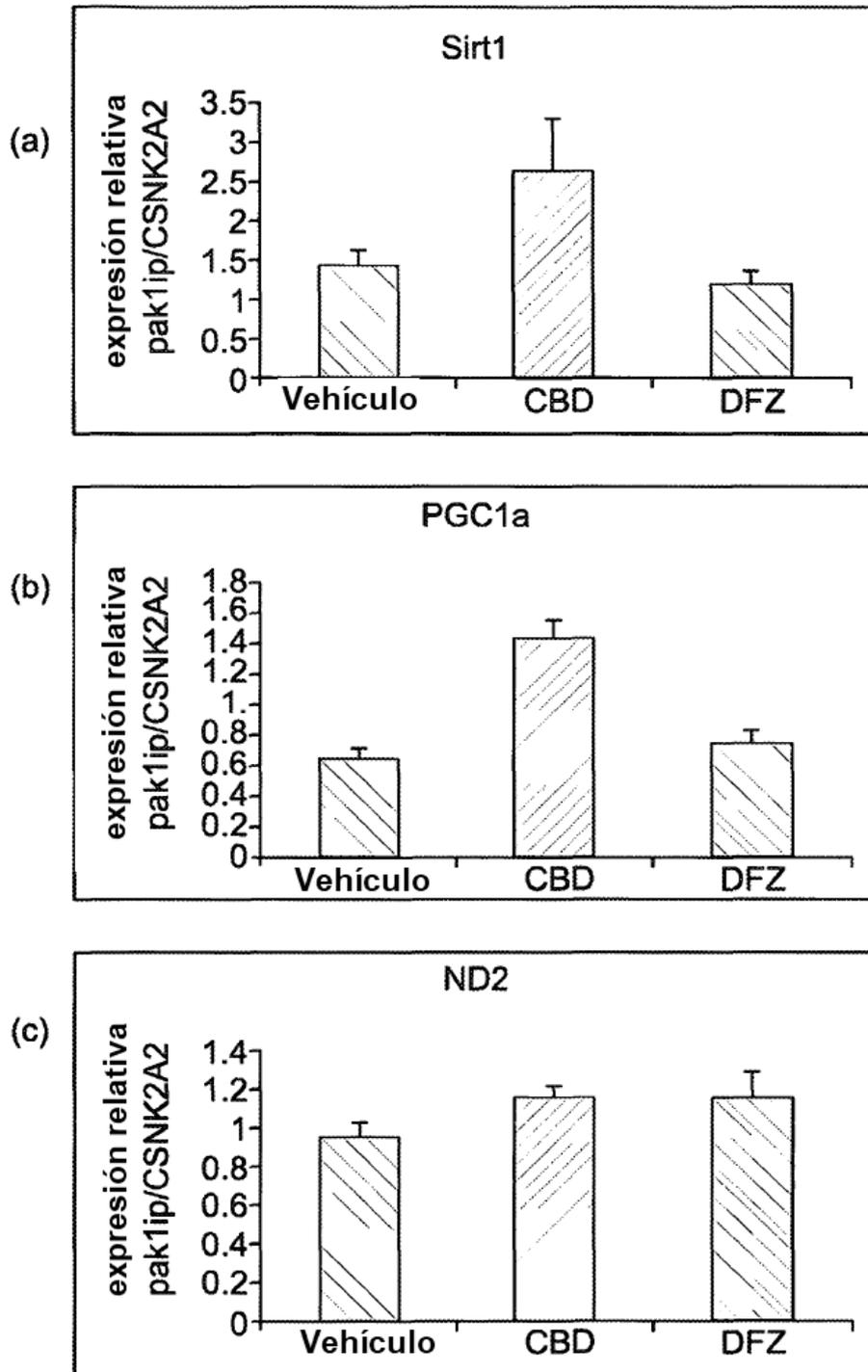
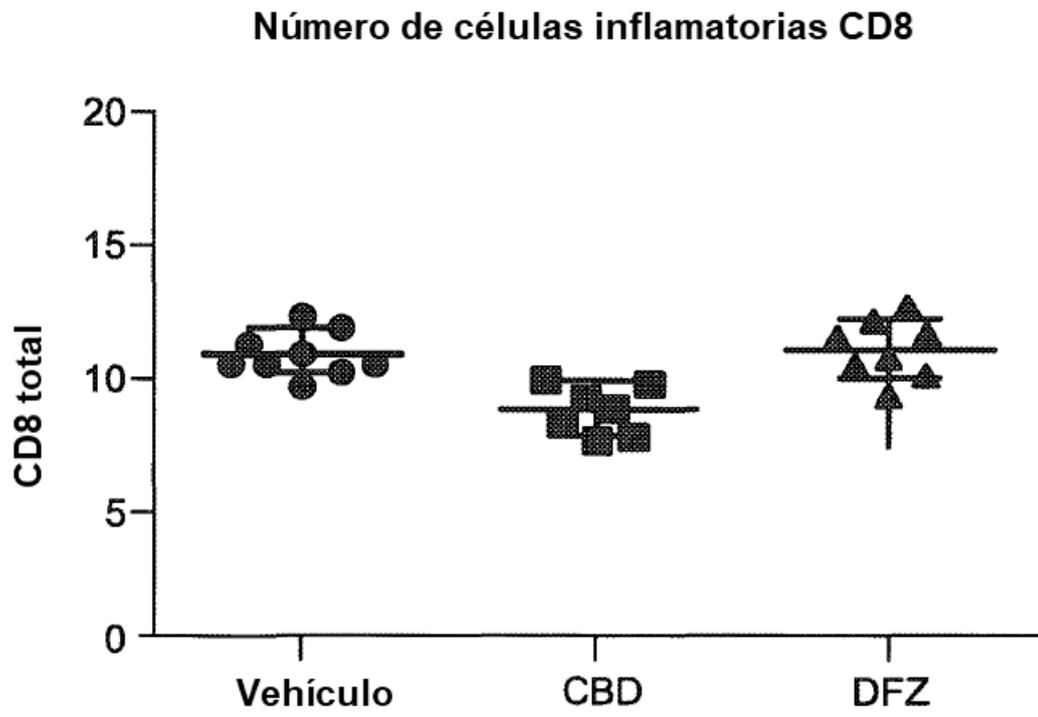


Fig. 8



**Fig. 9**