

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 340**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61K 31/352** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2012 PCT/GB2012/052565**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2012 E 12780523 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2768493**

54 Título: **Fitocannabinoides para su uso en el tratamiento del cáncer de mama**

30 Prioridad:

**18.10.2011 GB 201117956**  
**21.10.2011 US 201161550069 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.03.2020**

73 Titular/es:

**GW PHARMA LIMITED (100.0%)**  
**Porton Down Science Park**  
**Salisbury, Wiltshire SP4 0JQ , GB**

72 Inventor/es:

**SANCHEZ, CRISTINA;**  
**GUZMAN, MANUEL;**  
**WRIGHT, STEPHEN;**  
**STOTT, COLIN;**  
**MUNOZ CAFFAREL, MARIA;**  
**ANDRADAS, CLARA y**  
**PEREZ GOMEZ, EDUARDO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 751 340 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Fitocannabinoides para su uso en el tratamiento del cáncer de mama

La presente invención se refiere al cannabidiol fitocannabinoide (CBD) para su uso en el tratamiento del cáncer de mama agresivo caracterizado por la sobreexpresión del gen Her2.

5 Antecedentes de la invención.

El cáncer de mama se produce debido a mutaciones en los genes responsables de regular el crecimiento de las células de la mama que hace que las células crezcan de manera no regulada. Por lo general, el cáncer de mama comienza en las células de las glándulas productoras de leche, conocidas como lobulillos, o en los conductos. Con menos frecuencia, el cáncer de mama puede comenzar en los tejidos del estroma. Estos incluyen los tejidos conectivos grasos y fibrosos de la mama.

10 Con el tiempo, las células de cáncer de mama pueden invadir tejidos cercanos tales como los ganglios linfáticos de las axilas o los pulmones en un proceso conocido como metástasis.

La etapa del cáncer de mama, el tamaño del tumor y su tasa de crecimiento son factores que determinan el tipo de tratamiento que se ofrece. Las opciones de tratamiento incluyen cirugía para extirpar el tumor, tratamiento farmacológico que incluye quimioterapia y terapia hormonal, radioterapia e inmunoterapia.

15 El pronóstico y la tasa de supervivencia varían ampliamente; las tasas de supervivencia relativa a cinco años varían desde 98% a 23% dependiendo del tipo de cáncer de mama que ocurra. El cáncer de mama en todo el mundo constituye el 23% de todos los cánceres con la mayoría de los cánceres de mama que ocurren en mujeres.

20 Una forma particularmente agresiva de cáncer de mama se caracteriza por la amplificación del gen Her2 que da como resultado una sobreexpresión de su producto proteico. Her2 significa "receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano" y también se conoce como ErbB-2.

Aproximadamente del 15 al 20% de los cánceres de mama tienen amplificación del gen Her2. Este receptor es estimulado por un factor de crecimiento que hace que la célula se divida; en ausencia del factor de crecimiento, la célula normalmente dejará de crecer. La sobreexpresión de este receptor en el cáncer de mama se asocia con una mayor resistencia del tumor de mama al tratamiento y la recurrencia de la enfermedad.

25 El compuesto trastuzumab es un anticuerpo monoclonal contra Her2 y ha mejorado las tasas de supervivencia relativa a 5 años de los cánceres de mama positivos para Her2 de etapa 1 a 3 a aproximadamente el 87%, sin embargo, trastuzumab es muy costoso, un curso completo cuesta aproximadamente \$ 70,000, además, aproximadamente el 2% de los pacientes sufren daños cardíacos significativos por su uso.

30 Aunque el uso de esta terapia ha mejorado claramente el resultado de pacientes con tumores Her2 positivos, la resistencia innata y adquirida al trastuzumab sigue siendo un desafío clínico. De hecho, solo el 25% de los tumores Her2 positivos responden al trastuzumab y la mayoría de los respondedores eventualmente recaen.

35 Se ha demostrado que los cannabinoides tienen un efecto antiproliferativo en diferentes líneas celulares de cáncer. Los cannabinoides THC, THCA, CBD, CBDA, CBG y CBC y los cannabinoides BDS THC y CBD se probaron en ocho líneas celulares diferentes, incluyendo DU-145 (cáncer de próstata sensible a las hormonas), MDA-MB-231 (cáncer de mama), CaCo-2 (cáncer colorrectal) y C6 (células de glioma). Adicionalmente, también los cannabinoides puros, se usaron una sustancia farmacológica botánica de THC (BDS) y un CBD BDS que contenía aproximadamente el 95% (p/p) del cannabinoide primario respectivo (Ligresti, 2006).

40 También se demostró que el CBD inhibe la expresión del gen id-1 en algunas formas agresivas de cáncer de mama. Las líneas celulares usadas fueron MDA-MB231 y MDA-MB436, (McAllister *et al.* 2007).

45 En la solicitud WO 2008/144475, McAllister también describe el uso de una combinación de los cannabinoides THC y CBD en el tratamiento del glioma. Adicionalmente, el CBD se describe para su uso en el tratamiento del cáncer de mama como se ejemplifica en las líneas celulares MDA-MB231 y MDA-MB436, pero no en las líneas celulares caracterizadas por la sobreexpresión del gen Her2. En el glioma, la combinación consistió en una alta proporción de THC a una baja proporción de CBD (THC:CBD 4:1). El problema con dicha composición es que la alta proporción de THC conduce a efectos secundarios tales como la psicosis y la ansiedad. Este trabajo se describe más detalladamente en McAllister *et al.* 2010.

50 Los presentes solicitantes en la solicitud WO 2009/147439 describen el uso de una combinación de cannabinoides, particularmente tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD), en el tratamiento del cáncer. En particular, el cáncer que se va a tratar es un tumor cerebral, más particularmente un glioma; más particularmente todavía un glioblastoma multiforme (GBM).

Caffarel *et al.* (2006, 2008) describe el mecanismo por el cual el THC inhibe la proliferación del ciclo celular y describe el uso de THC en un modelo animal de cáncer de mama.

5 Más recientemente, Caffarel *et al.* 2010 documentó la acción antitumoral del THC en diferentes modelos de cáncer de mama, incluyendo los cultivos celulares, los ratones xenoinjertados y, más recientemente, un modelo de ratón genéticamente modificado de cáncer de mama positivo para ErbB2, el THC se inyectó peritumoralmente. El documento describe que los agonistas de CB2 tal como THC y JWH-133 pudieron reducir el crecimiento y el número de tumores en el cáncer de mama dirigido por ErbB2. El documento describe adicionalmente que el 91% de los tumores positivos para ErbB2 expresan el receptor CB2.

10 Shrivastava (2011) describe cómo el cannabidiol induce la muerte celular programada en las células de cáncer de mama mediante la coordinación de la diafonía entre la apoptosis y la autofagia.

Debido a que el cáncer de mama es un problema tan importante, y los tratamientos existentes tienen un éxito limitado a largo plazo, es un objetivo principal de la presente invención identificar tratamientos alternativos que puedan mejorar el pronóstico de un paciente.

15 Es un objetivo proporcionar compuestos novedosos que se puedan usar en el tratamiento del cáncer de mama agresivo caracterizado por la sobreexpresión del gen Her2 ya que solo aproximadamente el 25% de los pacientes con este subconjunto de cáncer de mama responden al fármaco de elección existente trastuzumab y de los tratados muchas recaídas y muertes por tumores secundarios que han hecho metástasis del cáncer primario formando tumores secundarios en los pulmones y los ganglios linfáticos.

Breve resumen de la divulgación

20 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona Cannabidiol (CBD) para su uso en el tratamiento del cáncer de mama agresivo caracterizado por la sobreexpresión del gen Her2.

Preferiblemente, el CBD está en forma de una sustancia farmacológica botánica (BDS).

El CBD está presente en una cantidad terapéuticamente aceptable, que puede estar, por ejemplo, entre 1 mg y 2000 mg.

25 La dosis equivalente humana (HED) se puede estimar usando la siguiente fórmula:

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

El  $K_m$  para un ratón es 3 y el  $K_m$  para un humano es 37.

El CBD puede comprender además un agente quimioterapéutico no cannabinoide.

El agente quimioterapéutico no cannabinoide puede ser un anticuerpo monoclonal, tal como trastuzumab.

30 En esta especificación se usan los siguientes términos y se pretende que tengan los siguientes significados/definiciones: Los "cannabinoides" son un grupo de compuestos que incluyen los endocannabinoides, los fitocannabinoides y aquellos que no son endocannabinoides ni fitocannabinoides, en adelante "sintocannabinoides".

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

35 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.

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

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

45 Un "cannabinoide sintético" es uno que se ha producido por síntesis química, este término incluye la modificación de un fitocannabinoide aislado, por ejemplo, formando una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- Una "sustancia farmacológica botánica" o "BDS" se define en the Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, August 2000, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research as: "A drug derived from one or more plants, algae, or microscopic fungi. It is prepared from botanical raw materials by one or more of the following processes: pulverisation, decoction, expression, aqueous extraction, ethanolic extraction or other similar processes". Una sustancia farmacológica botánica no incluye una sustancia altamente purificada o modificada químicamente derivada de fuentes naturales. De este modo, en el caso del cannabis, el BDS derivado de las plantas de cannabis no incluye cannabinoides de grado farmacopeico altamente purificados.
- En la presente invención, se considera que un 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 más grande que comprende más del 50% (p/p) del BDS total y el componente que no contiene fitocannabinoides es el componente más pequeño que comprende menos del 50% (p/p) del BDS total.
- La cantidad de componente que contiene fitocannabinoides en el BDS puede ser mayor del 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 usado y el método de extracción usado.
- El "fitocannabinoide principal" en un BDS es el fitocannabinoide que está presente en una cantidad que es superior a los otros fitocannabinoides. Preferiblemente, el principal fitocannabinoide está presente en una cantidad mayor del 40% (p/p) del extracto total. Más preferiblemente, el principal fitocannabinoide está presente en una cantidad mayor del 50% (p/p) del extracto total. Más preferiblemente aún, el principal fitocannabinoide está presente en una cantidad mayor del 60% (p/p) del extracto total.
- La cantidad del principal fitocannabinoide en el BDS es preferiblemente mayor del 50% de la fracción que contiene fitocannabinoide, más preferiblemente aún mayor del 55% de la fracción que contiene fitocannabinoide, y más preferiblemente aún mayor del 60% a 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% y 95% de la fracción que contiene fitocannabinoides.
- El/los "fitocannabinoide/s secundario/s" en un BDS es el/los fitocannabinoides que está/están presentes en proporciones significativas. Preferiblemente, el fitocannabinoide secundario está presente en una cantidad mayor del 5% (p/p) del extracto total, más preferiblemente mayor del 10% (p/p) del extracto total, más preferiblemente aún mayor del 15% (p/p) del extracto total. Algunos BDS tendrán dos o más fitocannabinoides secundarios que están presentes en cantidades significativas. Sin embargo, no todos los BDS tendrán un fitocannabinoide secundario.
- El/los "fitocannabinoide/s menor/es" en un BDS se puede/n describir como el resto de todos los componentes fitocannabinoides una vez que se tienen en cuenta el principio y los fitocannabinoides secundarios. Preferiblemente, los fitocannabinoides menores están presentes en total en una cantidad inferior al 5% (p/p) del extracto total, y más preferiblemente, el fitocannabinoide menor está presente en una cantidad inferior al 2% (p/p) del extracto total.
- El término "que consiste esencialmente en" se limita a los fitocannabinoides que se especifican, no excluye los componentes no cannabinoides que también pueden estar presentes.
- Por lo general, el componente que no contiene fitocannabinoides del BDS comprende terpenos, esteroides, triglicéridos, alcanos, escualenos, tocoferoles y carotenoides.
- Estos compuestos pueden desempeñar un papel importante en la farmacología del BDS ya sea solo o en combinación con el fitocannabinoide.
- La "fracción de terpeno" puede ser significativa y se puede desglosar por el tipo de terpeno: monoterpeno o sesquiterpeno. Estos componentes terpénicos se pueden definir adicionalmente de manera similar a los cannabinoides.
- La cantidad de componente que no contiene fitocannabinoides en el BDS puede ser inferior al 45%, hasta el 40%, 35%, 30%, 25%, 20% a 15% o menos del extracto total. Es probable que la cantidad real dependa del material de partida usado y el método de extracción usado.
- El/los "monoterpeno/s principal/es" en un BDS es el monoterpeno que está presente en una cantidad que es superior a la de los otros monoterpenos. Preferiblemente, el/los monoterpeno/s principal/es está/n presente/s en una cantidad mayor del 20% (p/p) del contenido total de terpeno. Más preferiblemente, el monoterpeno principal está presente en una cantidad mayor del 30% (p/p) del contenido total de terpenos, más preferiblemente aún mayor del 40% (p/p) del contenido total de terpenos, y más preferiblemente aún mayor del 50 % (p/p) del contenido total de terpenos. El monoterpeno principal es preferiblemente un mirceno o pineno. En algunos casos puede haber dos monoterpenos principales. En este caso, los principales monoterpenos son preferiblemente un pineno y/o un mirceno.
- El "sesquiterpeno principal" en un BDS es el sesquiterpeno que está presente en una cantidad que es superior a todos los demás sesquiterpenos. Preferiblemente, el sesquiterpeno principal está presente en una cantidad mayor

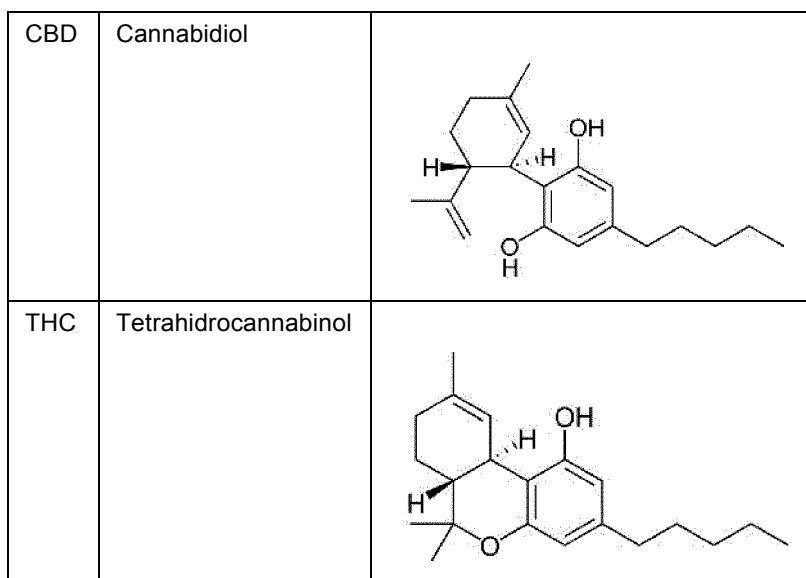
del 20% (p/p) del contenido total de terpeno, más preferiblemente aún mayor del 30% (p/p) del contenido total de terpeno. El sesquiterpeno principal es preferiblemente un cariofileno y/o un humuleno.

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

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

10 Como alternativa, se pueden preparar extractos botánicos mediante la introducción de fitocannabinoides aislados o su equivalente sintético en una fracción de planta no cannabinoide como se puede obtener de una planta de cannabinoides cero o uno o más componentes no cannabinoides encontrados en la planta de cannabis tal como los terpenos.

Las estructuras de los fitocannabinoides CBD y THC son como se muestran a continuación:



15 Los fitocannabinoides se pueden encontrar ya sea como la forma neutra (forma descarboxilada) o la forma de ácido carboxílico dependiendo del método usado para extraer los cannabinoides. Por ejemplo, se sabe que calentar la forma de ácido carboxílico hará que la mayor parte de la forma de ácido carboxílico se descarboxila en la forma neutra.

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

25 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 para los expertos en el arte. Muchas bases inorgánicas y orgánicas apropiadas son conocidas en la técnica.

Para el propósito de esta invención, el término 'tratamiento' pretende abarcar la disminución de la viabilidad de las células cancerosas y su capacidad de metástasis, y una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que logra este objetivo.

Breve descripción de los dibujos

30 Las realizaciones de la invención se describen adicionalmente en lo que sigue con referencia a los dibujos adjuntos, en los que

La figura 1 muestra que las líneas celulares de cáncer de mama positivo para Her2 humano son sensibles al THC;

La figura 2 muestra que las líneas celulares de cáncer de mama positivo para Her2 humano son sensibles al THC y al CBD;

- La figura 3 muestra que la combinación de concentraciones submáximas de THC y CBD aumenta la muerte celular por cáncer de mama;
- La figura 4 muestra que la combinación de THC y CBD disminuye la viabilidad de las células de cáncer de mama de manera sinérgica;
- 5 La figura 5 muestra que las células de cáncer de mama positivas para Her2 humanas son sensibles al THC *in vivo*;
- La figura 6 muestra que las células BT474 humanas son sensibles a los fitocannabinoides *in vivo*;
- La figura 7 muestra que los fitocannabinoides mejoran la acción antitumoral de trastuzumab *in vivo*;
- La figura 8 muestra que las células de cáncer de mama positivas para Her2 humanas son sensibles a diferentes proporciones de THC: CBD;
- 10 La figura 9 muestra que las células de cáncer de mama positivas para Her2 altamente metastásicas son sensibles al THC y al CBD;
- La figura 10 muestra que las líneas celulares de cáncer de mama positivas para Her2 resistentes a trastuzumab son sensibles al THC y al CBD;
- 15 La figura 11 muestra la combinación de THC y CBD en proporciones de hasta 1:9 que reduce la viabilidad celular de cáncer de mama triple negativo;
- La figura 12 muestra que el THC y el CBD reducen la viabilidad celular de cáncer de mama triple negativo de manera aditiva;
- La figura 13 muestra la combinación de THC y CBD en una proporción 1: 9 que reduce significativamente la viabilidad celular de cáncer de mama que sobreexpresa Her2;
- 20 La figura 14 muestra que el THC y el CBD reducen la viabilidad celular de cáncer de mama que sobreexpresa Her2 de manera aditiva;
- La figura 15 muestra la combinación de THC y CBD en una proporción 1:9 que reduce la viabilidad celular de cáncer de mama resistente a trastuzumab que sobreexpresa Her2;
- 25 La figura 16 muestra que el THC y el CBD reducen la viabilidad celular de cáncer de mama resistente a trastuzumab que sobreexpresa Her2 de manera aditiva;
- La figura 17 muestra la combinación de THC y CBD en una proporción 1: 9 que reduce la viabilidad celular de cáncer de mama altamente metastásico que sobreexpresa Her2;
- La figura 18 muestra que el THC y el CBD reducen la viabilidad celular de cáncer de mama altamente metastásico que sobreexpresa Her2 de manera aditiva; y
- 30 La figura 19 muestra que las células de cáncer de mama positivas para Her2 humanas son sensibles a combinaciones de THC: CBD 1:9 *in vivo*.

#### Leyenda de figuras

- 35 Figura 1: expresión del receptor (A) Her2 y (B) CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, según lo determinado por transferencia Western, en diferentes líneas celulares de cáncer de mama de origen humano. Se usaron células MDA-MB-231 y MCF-7 como controles negativos para Her2. Las células U373-MG y Jurkat se usaron como controles positivos para la expresión del receptor CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, respectivamente. (C) Viabilidad de las células BT474 y SkBr3, según lo determinado por la prueba colorimétrica MTT, en respuesta a 6 μM (BT474) o THC 3 μM (SkBr3) con o sin SR144528 (SR) 2 μM, durante 72 h. Los datos se expresan como % de células tratadas con vehículo, establecido en 100%. \*, p <0.05; \*\*, p <0.01 vs células tratadas con vehículo; #, p <0.05 vs células tratadas con THC.
- 40 Figura 2: Viabilidad de las células SkBr3 (panel izquierdo) y BT474 (panel derecho), según lo determinado por la prueba colorimétrica MTT, en respuesta al aumento de las concentraciones de THC o CBD durante 72 h. Los datos se expresan como % de células tratadas con vehículo, establecido en 100%. n = 3.
- 45 Figura 3: Viabilidad de las células BT474, según lo determinado por la prueba colorimétrica MTT, en respuesta a las concentraciones indicadas de THC y CBD, solas o en combinación, durante 72 h. Los datos se expresan como % de células tratadas con vehículo, establecido en 100%. n = 3.
- Figura 4: Isoblograma para la muerte celular del 50%, 75% y 90% en células BT474, según se calcula con el software CalcuSyn v2.0. n = 3.

Figura 5: Se generaron xenoinjertos subcutáneos a partir de células BT474 y los animales se trataron como se indica en la figura. El gráfico representa el volumen tumoral medio.

Figura 6: Se generaron xenoinjertos subcutáneos a partir de células BT474 y los animales se trataron por vía oral con los fármacos indicados. El gráfico representa el volumen tumoral medio.

5 Figura 7: Se generaron xenoinjertos subcutáneos a partir de células BT474 y los animales se trataron por vía oral o IP con los fármacos indicados. El gráfico representa el volumen tumoral medio.

Figura 8: Viabilidad de las células BT474, según lo determinado por la prueba colorimétrica MTT, en respuesta al THC o CBD, solo o en combinación en las proporciones indicadas, durante 72 h. Los datos se expresan como % de células tratadas con vehículo, establecido en 100%.  $n = 4$ . Para las combinaciones, la concentración final de cannabinoides es la indicada en el eje X. Por ejemplo, en el conjunto de barras correspondiente a la concentración final  $1 \mu\text{M}$ , las células desafiadas con una proporción 1:10 recibieron THC  $0.09 \mu\text{M}$  y CBD  $0.91 \mu\text{M}$ .

10

Figura 9: Viabilidad de las células indicadas (véase la sección métodos para más detalles), según lo determinado por la prueba colorimétrica MTT, en respuesta al aumento de las concentraciones de THC (panel izquierdo) o CBD (panel derecho) durante 72 h. Los datos se expresan como % de células tratadas con vehículo, establecido en 100%.  $n = 3$ .

15

Figura 10: Viabilidad de las células indicadas según lo determinado por la prueba colorimétrica MTT, en respuesta a concentraciones crecientes de THC (panel izquierdo) o CBD (panel derecho) durante 72 h. Los datos se expresan como % de células tratadas con vehículo, establecido en 100%.  $n = 3$ .

Figura 11: Viabilidad de las células MDA-MB-231, según lo determinado por la prueba colorimétrica MTT, en respuesta a las concentraciones indicadas de THC y CBD, solas o en combinación, durante 48 h. Los datos se expresan como % de células tratadas con vehículo, establecido en 100%.  $n > 3$ .

20

Figura 12: Isoblograma para las dosis de efecto 50 (ED50), 75 (ED75) y 90 (ED90) en células MDA-MB-231, calculadas con el software CalcuSyn v2.0. La dosis de efecto X se define como la concentración de cannabinoides que induce el X % de muerte celular. Se muestran los valores del índice de combinación (CI) obtenidos para las ED correspondientes.  $n > 3$ .

25

Figura 13: Viabilidad de las células MDA-MB-231 que sobreexpresan de manera estable el oncogén Her2, según lo determinado por la prueba colorimétrica MTT, en respuesta a las concentraciones indicadas de THC y CBD, solas o en combinación, durante 48 h. Los datos se expresan como % de células tratadas con vehículo, establecido en 100%.  $n > 3$ .

Figura 14: Isoblograma para las dosis de efecto 50 (ED50), 75 (ED75) y 90 (ED90) en células MDA-MB-231 que sobreexpresan Her2 de manera estable, según se calcula con el software CalcuSyn v2.0. La dosis de efecto X se define como la concentración de cannabinoides que induce el X % de muerte celular. Se muestran los valores del índice de combinación (CI) obtenidos para las ED correspondientes.  $n > 3$ .

30

Figura 15: Viabilidad de un clon resistente a trastuzumab de células MDA-MB-231 que sobreexpresan Her2 de manera estable, según lo determinado por la prueba colorimétrica MTT, en respuesta a las concentraciones indicadas de THC y CBD, solo o en combinación, durante 48 h. Los datos se expresan como % de células tratadas con vehículo, establecido en 100%.  $n > 3$ .

35

Figura 16: Isoblograma para las dosis de efecto 50 (ED50), 75 (ED75) y 90 (ED90) en un clon de células MDA-MB-231 resistentes a trastuzumab que sobreexpresan Her2 de manera estable, según se calcula con el software CalcuSyn v2.0. La dosis de efecto X se define como la concentración de cannabinoides que induce el X % de muerte celular. Se muestran los valores del índice de combinación (CI) obtenidos para las ED correspondientes.  $n > 3$ .

40

Figura 17: Viabilidad de un clon altamente metastásico de células MDA-MB-231 que sobreexpresan Her2 de manera estable, según lo determinado por la prueba colorimétrica MTT, en respuesta a las concentraciones indicadas de THC y CBD, solo o en combinación, durante 48 h. Los datos se expresan como % de células tratadas con vehículo, establecido en 100%.  $n > 3$ .

45

Figura 18: Isoblograma para las dosis de efecto 50 (ED50), 75 (ED75) y 90 (ED90) en un clon de células MDA-MB-231 altamente metastásicas que sobreexpresan Her2 de manera estable, según se calcula con el software CalcuSyn v2.0. La dosis de efecto X se define como la concentración de cannabinoides que induce el X % de muerte celular. Se muestran los valores del índice de combinación (CI) obtenidos para las ED correspondientes.  $n > 3$ .

Figura 19: Se generaron xenoinjertos subcutáneos a partir de células BT474 y los animales se trataron como se indica en la leyenda (véase la sección métodos para detalles experimentales). Tanto el THC como el CBD se administraron en sus formas BDS. El gráfico representa el volumen tumoral medio.

50

Descripción detallada

Los ejemplos a continuación demuestran la efectividad de los cannabinoides THC y CBD en el cáncer de mama Her2 positivo. Este tipo de cáncer de mama representa un subconjunto de tumores de mama caracterizados por cursos clínicos muy agresivos. Estos tumores se tratan actualmente con trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra Her2.

- 5 Los ejemplos que se refieren al THC para el tratamiento del cáncer de mama Her-positivo son ejemplos de referencia y no forman parte de la invención.

Ejemplo 1: efectos *in vitro* de tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) en líneas de células de cáncer de mama positivas para Her2

Materiales y métodos

- 10 El efecto de THC y CBD, solos y en combinación, sobre la viabilidad de dos líneas celulares de cáncer de mama humano positivas para Her2 diferentes: se probaron SkBr3 y BT474. El cannabinoide THC está fuera del alcance de la invención reivindicada.

- 15 Brevemente, las células se incubaron en RPMI (SkBr3) o DMEM (BT474) suplementado con suero bovino fetal al 10%. Después de 12 horas de inanición de suero, las células fueron desafiadas con diferentes concentraciones de THC o CBD (o el vehículo correspondiente, DMSO) durante 72 h. La viabilidad celular se determinó luego mediante la prueba colorimétrica MTT.

El análisis del efecto combinado del fármaco se realizó con el software CalcuSyn v2.0. Para determinar si la combinación de THC y CBD era aditiva o sinérgica, calculamos diferentes índices de combinación (CI) usando el algoritmo de Chou y Talalay con el software CalcuSyn v2.0.

- 20 Resultados

Se demostró en primer lugar que las líneas celulares BT474 y SkBr3 expresaban los receptores Her2 (Figura 1A) y CB<sub>2</sub> (Figura 1B), y que la viabilidad de las líneas celulares disminuye con la exposición al THC (Figura 1C) y que este efecto está mediado por activación de los receptores CB<sub>2</sub> ya que es impedida por el antagonista selectivo CB<sub>2</sub> SR144528 (Figura 1C).

- 25 Las dos líneas celulares fueron desafiadas con diferentes concentraciones de THC y CBD. Como se muestra en la figura 2, las células SkBr3 y BT474 redujeron su viabilidad en respuesta al THC y CBD de una manera relacionada con la concentración. En términos cuantitativos, el efecto fue prácticamente idéntico para ambos cannabinoides.

- 30 Las células BT474 se expusieron luego a diferentes concentraciones de una combinación de THC y CBD en una proporción 1:1. Curiosamente, se observa que la combinación de bajas concentraciones (<1 μM) de los cannabinoides (concentraciones sin efecto sobre la viabilidad celular cuando se administra solo) disminuyó significativamente la viabilidad de los cultivos celulares (Figura 3).

Se obtuvieron los valores de CI mostrados en la tabla 1.1 a continuación, todos los valores de CI fueron menores que 1, lo que indica que estos compuestos estaban produciendo un fuerte efecto sinérgico.

Tabla 1.1 Valores CI de la combinación de THC y CBD en la viabilidad celular del cáncer de mama

	<b>ED50</b>	<b>ED75</b>	<b>ED90</b>
<b>CI</b>	0.52	0.55	0.57

- 35 Esta sinergia también se puede observar en el isoblograma que se muestra en la figura 4. Este gráfico se generó seleccionando las concentraciones de cannabinoides que disminuyen la viabilidad celular en un 50% (ED50), 75% (ED75) y 90% (ED90). Para cada ED, el software (i) traza una línea que conecta las concentraciones de THC y CBD que producen ese efecto particular cuando se administran como agentes únicos, y (ii) genera un punto que indica la concentración de THC y CBD, aplicada como una combinación, requerida para producir tal efecto. Si la línea es recta, esto significa que los dos compuestos están produciendo un simple efecto aditivo y el punto debería aparecer dentro de él. En el ejemplo demostrado aquí, las líneas están curvadas hacia abajo y los puntos aparecen debajo de ellas, lo que indica que se requieren cantidades menores de cannabinoides para obtener los mismos efectos si se administran como una combinación. Ambas observaciones confirman que la combinación de THC y CBD tiene efectos sinérgicos.
- 40
- 45

Conclusión

Los resultados demuestran que una dosis baja de una combinación de THC y CBD tiene efectos antiproliferativos significativos en las células de cáncer de mama positivas para Her2 humanas.



Es importante destacar que se logró un efecto sinérgico con la mitad de la dosis de THC que se requería cuando se administraba solo. Esta observación puede tener implicaciones importantes para el desarrollo de terapias basadas en cannabinoides para tumores de mama, ya que la dosis de THC se podría reducir, en consecuencia, disminuyendo o eliminando cualquier efecto secundario potencial, sin afectar su potencia.

5 Estos datos proporcionan una fuerte evidencia del uso de terapias basadas en cannabinoides para el tratamiento del cáncer de mama positivo para Her2, que representa un subconjunto de tumores de mama caracterizados por cursos clínicos muy agresivos, capacidad de respuesta reducida a las terapias convencionales y dirigidas y frecuencias de recaída alta.

10 Ejemplo 2: efectos *in vitro* del tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) en una línea celular de cáncer de mama positivo para Her2

Materiales y métodos

15 Se generaron xenoinjertos ectópicos mediante inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células BT474 humanas (células de cáncer de mama humano positivas para Her2). Los animales se dividieron en 11 grupos experimentales (8 animales/grupo) y cuando los tumores alcanzaron  $200 \text{ mm}^3$ , se trataron como se detalla en la tabla 2.1 a continuación, durante un período de 4 semanas.

Tabla 2.1 Grupos de tratamiento

Grupo	Fármaco	Ruta	Volumen	Patrón
Vehículo	Aceite de ajonjolí	Oral	300 $\mu\text{L}$	3 días/semana
	PBS	IP	50 $\mu\text{L}$	2 días/semana
THC-BDS	45mg/Kg de THC-BDS	Oral	300 $\mu\text{L}$	3 días/semana
	PBS	IP	50 $\mu\text{L}$	2 días/semana
CBD-BDS	45mg/Kg de CBD-BDS	Oral	300 $\mu\text{L}$	3 días/semana
	PBS	IP	50 $\mu\text{L}$	2 días/semana
THC-BDS + CBD-BDS	22.5mg/Kg de THC-BDS	Oral	300 $\mu\text{L}$	3 días/semana
	22.5mg/Kg de CBD-BDS			
	PBS	IP	50 $\mu\text{L}$	2 días/semana
THC-BDS + CBD-BDS	45mg/Kg de THC-BDS	Oral	300 $\mu\text{L}$	3 días/semana
	45mg/Kg de CBD-BDS			
	PBS	IP	50 $\mu\text{L}$	2 días/semana
TRASTUZUMAB	Aceite de ajonjolí	Oral	300 $\mu\text{L}$	3 días/semana
	Trastuzumab	IP	50 $\mu\text{L}$	2 días/semana
TRASTUZUMAB +THC-BDS	45mg/Kg de THC-BDS	Oral	300 $\mu\text{L}$	3 días/semana
	Trastuzumab	IP	50 $\mu\text{L}$	2 días/semana
TRASTUZUMAB +CBD-BDS	45mg/Kg de CBD-BDS	Oral	300 $\mu\text{L}$	3 días/semana
	Trastuzumab	IP	50 $\mu\text{L}$	2 días/semana
TRASTUZUMAB + THC-BDS + CBD-BDS	22.5mg/Kg deTHC-BDS	Oral	300 $\mu\text{L}$	3 días/semana
	22.5mg/Kg de CBD-BDS			

	Trastuzumab	IP	50 µL	2 días/semana
VEHÍCULO	PBS+5% BSA+2.5% DMSO	IP	100 µL	3 días/semana
THC-BDS	15mg/Kg THC-BDS	IP	100 µL	3 días/semana

Se probaron diferentes rutas de administración junto con diferentes combinaciones de THC, CBD y trastuzumab. El cannabinoide THC está fuera del alcance de la invención reivindicada.

5 Los cannabinoides THC y CBD estaban en forma de sustancias farmacológicas botánicas (BDS) mediante las cuales el cannabinoide principal está presente junto con otros componentes cannabinoides y una fracción no cannabinoide.

Las cantidades relativas de los diferentes cannabinoides en los BDS de THC y CBD se muestran en la tabla 2.2 a continuación. Se apreciará que pueden ocurrir variaciones de más o menos 25% (p/p) con componentes BDS dependiendo del método de extracción usado.

10 Tabla 2.2 Componentes cannabinoides y no cannabinoides de BDS de THC y CBD

	THC-BDS (% p/p)	CBD-BDS (% p/p)
Fracción Cannabinoide:		
Cannabinoide mayor:		
THC	63.0 - 78.0	n/a
CBD	n/a	57.0 - 72.0
Cannabinoides menores/otros:		
THC	n/a	2.0 - 6.5
CBD	0.1 - 2.5	n/a
Cannabigerol (CBG)	1.0 - 2.0	0.8 - 6.5
Cannabicromeno (CBC)	0.8 - 2.2	3.0 - 6.5
Tetrahidrocannabivarina (THCV)	0.4 - 1.0	-
Ácido tetrahidrocannabinólico (THCA)	<2.0	-
Cannabidivarina	-	1.0 - 2.0
Ácido cannabinólico	-	<2.0
Fracción no-cannabinoide:		
Terpenos:		
Monoterpenos	0.7	0.4
Di/tri-terpenos	0.6	0.4
Sesquiterpenos	1.7	2.0
Otros terpenos	<3.0	<3.0
Otros componentes menores derivados de plantas que incluyen:		

Esteroles		
Triglicéridos		
Alcanos		
Escualeno		
Tocoferol	6.3 - 26.7	1.7 - 28.4
Carotenoides		

Los tumores se midieron rutinariamente durante este período con un calibrador externo, y su volumen se calculó como  $(4\pi/3) \times (\text{ancho}/2)^2 \times (\text{largo}/2)$ .

Resultados

- 5 La administración oral de THC redujo significativamente el crecimiento tumoral y, curiosamente, esta ruta de administración es más eficaz que la administración IP (Figura 5).

Los resultados también muestran claramente un importante efecto antitumoral del CBD en este modelo (Figura 6). Además, la combinación de THC y CBD en una proporción 1:1 tuvo un efecto mayor de cada cannabinoide solo (Figura 6).

- 10 El THC y el CBD pudieron mejorar la acción antitumoral del trastuzumab, especialmente cuando se administraron en combinación (Figura 7). La mejor respuesta antitumoral se obtuvo con la dosis alta de la combinación de THC y CBD sin trastuzumab (Figura 7).

Conclusión

- 15 Estos datos demuestran que las células cancerosas positivas para Her2 humanas son sensibles a los fitocannabinoides *in vivo*. De hecho, la combinación de THC y CBD fue más eficaz que el tratamiento estándar trastuzumab, lo que conduce a una indicación positiva de estos cannabinoides en el tratamiento de los tipos agresivos de cáncer de mama.

Ejemplo 3: efectos *in vivo* de diferentes proporciones de tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) en una línea de células de cáncer de mama positivas para Her2

- 20 Se ha demostrado que el CBD tiene propiedades antitumorales significativas en el cáncer de mama. Dado que este compuesto tiene un perfil muy seguro, se realizaron experimentos para determinar si la proporción del compuesto psicoactivo THC se puede disminuir en los tratamientos combinados

Materiales y métodos

- 25 Se examinó el efecto de THC y CBD, solos y en combinación en diferentes proporciones, sobre la viabilidad de las células BT474. El cannabinoide THC está fuera del alcance de la invención reivindicada.

Las células se incubaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%. Después de 12 horas de inanición en suero, las células se expusieron durante 72 h como se describe en la tabla 3.1. La viabilidad celular se determinó luego mediante la prueba colorimétrica MTT.

Tabla 3.1 Concentraciones de cannabinoides

Cannabinoide total (μM)	Condición	THC (μM)	CBD (μM)
0.5	THC	0.5	-
	CBD	-	0.5
	THC:CBD (1:1)	0.25	0.25
	THC:CBD (1:5)	0.08	0.42
	THC:CBD (1:7)	0.06	0.44

	THC:CBD (1:10)	0.05	0.45
1.0	THC	1.0	-
	CBD	-	1.0
	THC:CBD (1:1)	0.5	0.5
	THC:CBD (1:5)	0.16	0.84
	THC:CBD (1:7)	0.12	0.88
	THC:CBD (1:10)	0.1	0.9
1.5	THC	1.5	-
	CBD	-	1.5
	THC:CBD (1:1)	0.75	0.75
	THC:CBD (1:5)	0.24	1.26
	THC:CBD (1:7)	0.18	1.32
	THC:CBD (1:10)	0.15	1.35

#### Resultados

Estos datos indican que las combinaciones de THC y CBD en las que la proporción de THC era tan baja como 1:10 eran tan eficaces como las proporciones 1:1 para disminuir la viabilidad celular (Figura 8).

#### 5 Conclusiones

Las células cancerosas positivas para Her2 humanas son sensibles a los fitocannabinoides tanto en cultivos celulares como *in vivo*. Es de destacar que la disminución de la proporción de THC a tan bajo como 1:10 (THC: CBD) no hizo ninguna diferencia en la efectividad de la combinación de los cannabinoides.

10 Como tales combinaciones proporcionales de THC y CBD podrían usarse para tratar formas agresivas de cáncer de mama con muy pocos, si es que tienen efectos secundarios.

Ejemplo 4: efectos del tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) en una línea celular de cáncer de mama resistente al trastuzumab

#### Materiales y métodos

15 El efecto de THC y CBD sobre la viabilidad de una serie de líneas celulares de cáncer de mama humano positivo para Her2: células MDAMB-231 que sobreexpresan ectópicamente Her2 (231-Her2), una versión altamente metastásica de 231-Her2 (231- Met) y tres líneas celulares derivadas de 231-Her2 resistentes a trastuzumab diferentes (TrR1, TrR2 y TrR3). El cannabinoide THC está fuera del alcance de la invención reivindicada.

20 Las células se incubaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%. Después de 12 horas de inanición en suero, las células fueron desafiadas con diferentes concentraciones de THC o CBD (o el vehículo correspondiente, DMSO) durante 72 h. La viabilidad celular se determinó luego mediante la prueba colorimétrica MTT.

#### Resultados

25 Como se muestra en la figura 9, la línea celular 231-Her2 altamente metastásica disminuyó su viabilidad en respuesta a concentraciones crecientes de THC o CBD, con valores de IC<sub>50</sub> virtualmente idénticos para ambos compuestos.

Se realizaron estudios similares con células resistentes a trastuzumab y los resultados fueron análogos: estas líneas celulares disminuyeron su viabilidad en respuesta a los fitocannabinoides de una manera dependiente de la concentración (Figura 10).

Conclusión

5 Juntos, estos resultados sugieren que, cualesquiera que sean los cambios moleculares que estas células hayan sufrido para volverse extremadamente agresivas (altamente metastásicos o resistentes al trastuzumab), los fitocannabinoides siguen siendo agentes de efecto para disminuir la viabilidad y la capacidad de metástasis de estas células.

Ejemplo 5: efectos de una combinación de tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) en una línea celular de cáncer de mama resistente al trastuzumab

Materiales y métodos

10 Los ejemplos anteriores demuestran que THC: CBD 1: 9 es tan eficaz como la proporción 1:1 para reducir la viabilidad celular BT474 *in vitro*. En este ejemplo se proporcionan estos datos que demuestran el efecto de combinaciones 1: 9 de THC:CBD en células BT474 *in vivo*. Además, también se demuestra el efecto de dicha combinación sobre células MDA-MB-231 *in vitro* resistentes a trastuzumab y en células altamente metastásicas que sobreexpresan Her2. El cannabinoide THC está fuera del alcance de la invención reivindicada.

15 El efecto de una combinación 1:9 de THC:CBD en células cancerosas positivas para Her2 *in vitro*, se demostró desafiando las siguientes líneas celulares con las concentraciones de cannabinoides indicadas en las leyendas de las figuras correspondientes:

- F MDA-MB-231 Línea celular de cáncer de mama humano triple negativa (sin sobreexpresión de Her2)
- 231-Her2 MDA-MB-231 que sobreexpresan de manera estable Her2
- 231-Her2-Met Línea celular altamente metastásica derivada de 231-Her2
- 20 • 231-Her2-TrR Línea celular trastuzumab resistente derivada de 231-Her2

Las células se incubaron en presencia de cannabinoides durante 48 h y la viabilidad celular se evaluó mediante la prueba colorimétrica MTT.

25 Para estudiar el efecto de diferentes proporciones de THC: CBD sobre el cáncer de mama humano positivo para Her2 *in vivo*, se generaron xenoinjertos ectópicos en ratones hembra inmunodeficientes mediante inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células BT474. Los animales se dividieron en 7 grupos experimentales (8 animales/grupo) y cuando los tumores alcanzaron  $200 \text{ mm}^3$  (por lo general 40 días después de la inyección de células cancerosas), comenzaron a tratarse como se indica en la tabla a continuación.

Grupo	Fármaco	Ruta de administración	Volumen	Patrón de administración
Vehículo	Aceite de ajonjolí	Oral	300 $\mu$ L	3 días/semana
THC 45	45 mg/Kg de THC-BDS			
CBD 45	45 mg/Kg de THC-BDS			
THC:CBD (1:1)	90 mg/Kg de cannabinoide total (45 mg/Kg de THC-BDS + 45 mg/Kg de THC-BDS)			
THC 9	9 mg/Kg THC-BDS			
CBD 81	81 mg/Kg CBD-BDS			
THC:CBD (1:9)	90 mg/Kg de cannabinoide total (9 mg/Kg de THC-BDS + 81 mg/Kg de THC-BDS)			

Los tumores se midieron rutinariamente con un calibrador externo, y el volumen se calculó como  $(4\pi/3) \times (\text{ancho}/2)^2 \times (\text{largo}/2)$ .

30 Resultados

Ejemplos anteriores demostraron que las combinaciones de THC:CBD en las que el THC representa solo una décima parte de la concentración total de cannabinoides fueron tan eficaces como las proporciones 1:1 para reducir

la viabilidad de las células de cáncer de mama humano que sobreexpresan naturalmente el oncogén Her2 (células BT474).

5 Este ejemplo demuestra experimentos similares con líneas celulares derivadas de MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se usan ampliamente en estudios de cáncer de mama debido a su capacidad para formar tumores y metástasis *in vivo*. Sin embargo, esta línea celular no expresa Her2. Para convertir las células MDA-MB-231 en un modelo de cáncer de mama positivo para Her2, se usaron 231 células transfectadas de manera estable con Her2 (231-Her2) y dos clones derivados de ellas: una que muestra resistencia al tratamiento con trastuzumab (231-Her2-TrR) y otro con un potencial metastásico aumentado (231-Her2-Met).

10 La figura 11 demuestra que las células MDA-MB-231 triple negativas son sensibles tanto al THC como al CBD. La combinación de los dos fitocannabinoides en una proporción 1:1 tiene efectos aditivos, como se sugiere en la figura 11 y se demostró en la figura 12. Se observaron efectos similares cuando la proporción de THC se redujo a una proporción 1:9 (Figuras 11 y 12).

15 La sobreexpresión del oncogén Her2 en células MDA-MB-231 no alteró la capacidad de respuesta a los fitocannabinoides (Figuras 13 y 14). De este modo, la viabilidad de estas células disminuye en respuesta al aumento de las concentraciones de THC y CBD solo y ambas combinaciones 1:1 y 1: 9 tuvieron los mismos efectos aditivos (Figuras 13 y 14).

20 Las células positivas para Her2 resistentes a trastuzumab (Figuras 15 y 16) y altamente metastásicas (Figuras 17 y 18) se comportan como sus controles (231-Her2) en términos de viabilidad celular en respuesta a fitocannabinoides solos o en combinación. En cuanto a las líneas celulares 231 y 231-Her2, las proporciones de THC:CBD 1:9 fueron tan eficaces como las combinaciones 1:1 (Figuras 15-18).

También se examinó el efecto de las combinaciones de fitocannabinoides en células positivas para Her2 *in vivo*. Los xenoinjertos subcutáneos BT474 disminuyeron su crecimiento en respuesta a THC-BDS y CBD-BDS solo (Figura 19). La combinación de los dos cannabinoides en una proporción 1:1 produce el mismo efecto que los compuestos solos. Curiosamente, la combinación 1:9 indujo la respuesta antitumoral más fuerte (Figura 19).

25 Conclusión

Estos datos demuestran que las células MDA-MB-231 y 231-Her2 son igualmente sensibles al THC y al CBD solos; que las combinaciones 1:1 de THC:CBD tienen efectos aditivos en las células 231 y 231-Her2 *in vitro*; y que las combinaciones 1: 9 de THC:CBD son tan eficaces como las combinaciones 1:1 para disminuir la viabilidad celular.

30 A pesar de los cambios moleculares sufridos para volverse altamente agresivos, las células positivas para Her2 resistentes a trastuzumab y altamente metastásicas conservan su capacidad de responder a los fitocannabinoides como se describe en el ejemplo anterior.

También se demuestra que una combinación 1: 9 de THC: CBD es más eficaz que las combinaciones 1:1 para disminuir el crecimiento de xenoinjerto BT474.

Referencias

35 Caffarel, M.M., Andradás, C., Mira, E., Perez-Gomez, E., Cerutti, C., Moreno-Bueno, G., Flores, J.M., Garcia-Real, I., Palacios, J., Manes, S., et al. 2010. Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Mol Cancer* 9:196.

40 Ligresti, A., Moriello, A.S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., Laezza, C., Portella, G., Bifulco, M., and Di Marzo, V. 2006. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 318:1375-1387.

McAllister, S.D., Christian, R.T., Horowitz, M.P., Garcia, A., and Desprez, P.Y. 2007. Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 6:2921-2927.

45 McAllister, S.D., Murase, R., Christian, R.T., Lau, D., Zielinski, A.J., Allison, J., Almanza, C., Pakdel, A., Lee, J., Limbad, C., et al. 2010. Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Res Treat*.

**REIVINDICACIONES**

1. Cannabidiol (CBD) para su uso en el tratamiento del cáncer de mama agresivo caracterizado por la sobreexpresión del gen Her2.
- 5 2. CBD para uso según la reivindicación 1, en el que el CBD está en forma de una sustancia farmacológica botánica (BDS).
3. CBD para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el CBD está presente en una cantidad aproximada entre 1 mg y 2000 mg.
4. CBD para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un agente quimioterapéutico no cannabinoide.
- 10 5. CBD para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente quimioterapéutico no cannabinoide es un anticuerpo monoclonal.
6. CBD para uso según la reivindicación 5, en el que el agente quimioterapéutico no cannabinoide es trastuzumab.

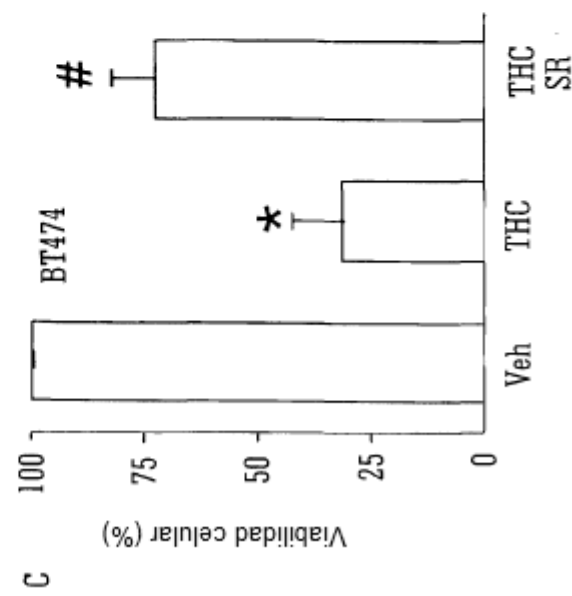
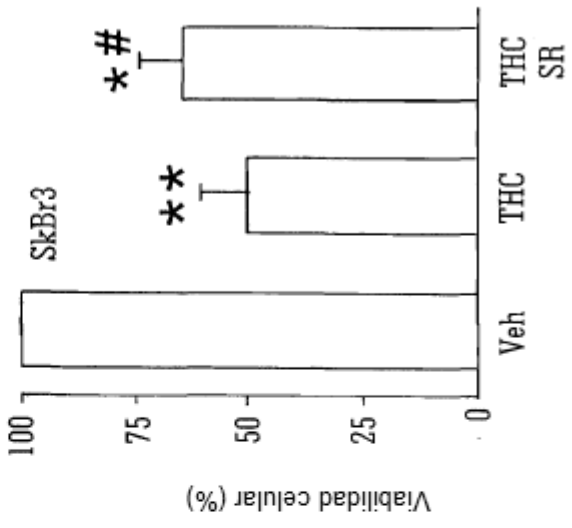
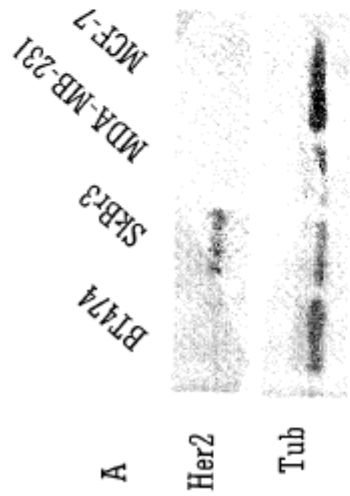
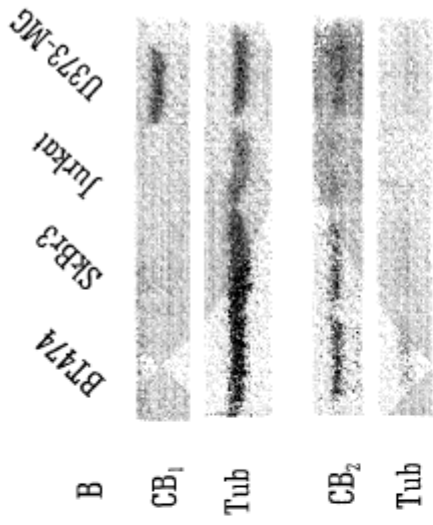


FIG. 1



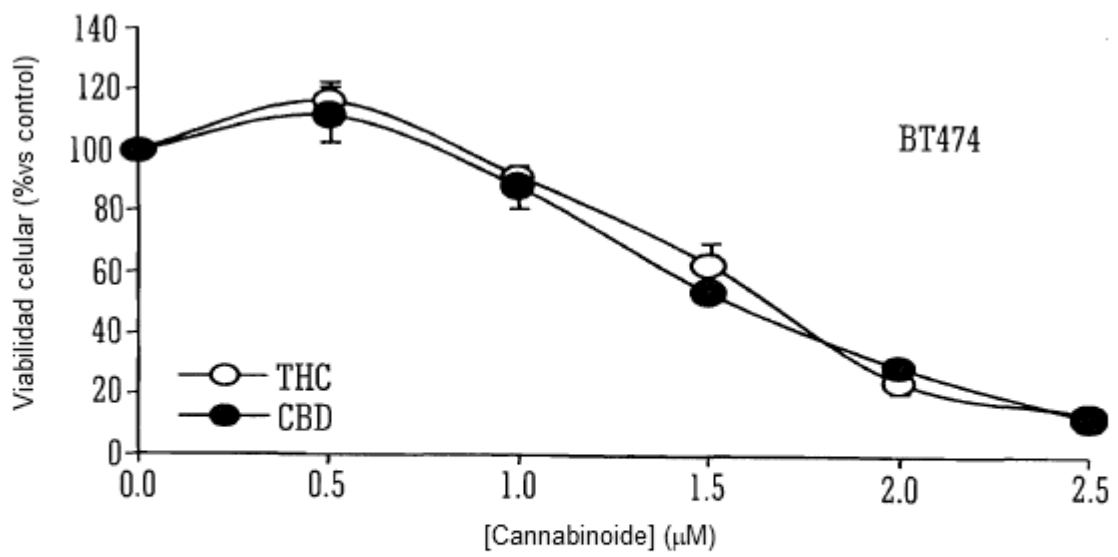
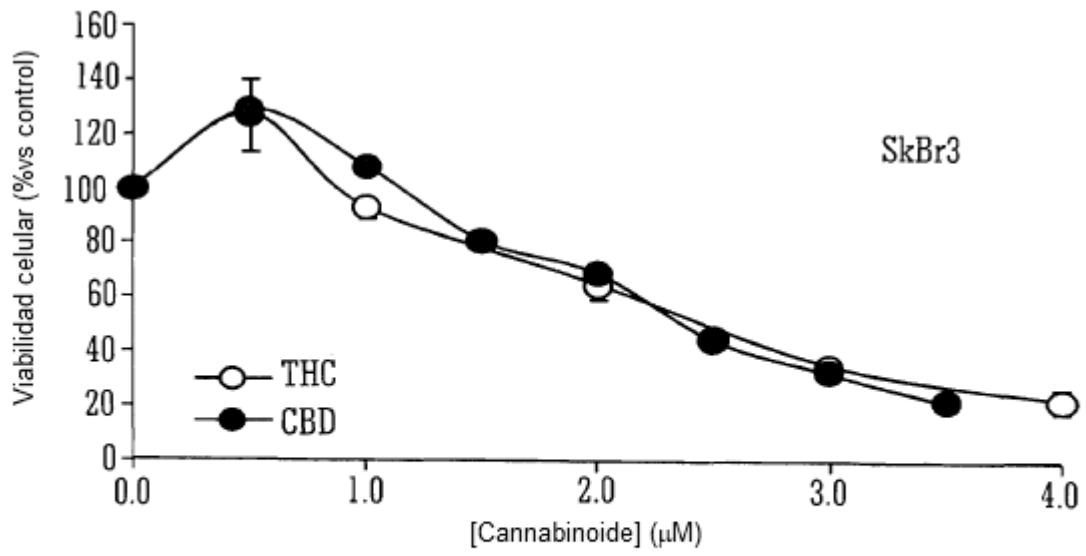


FIG. 2

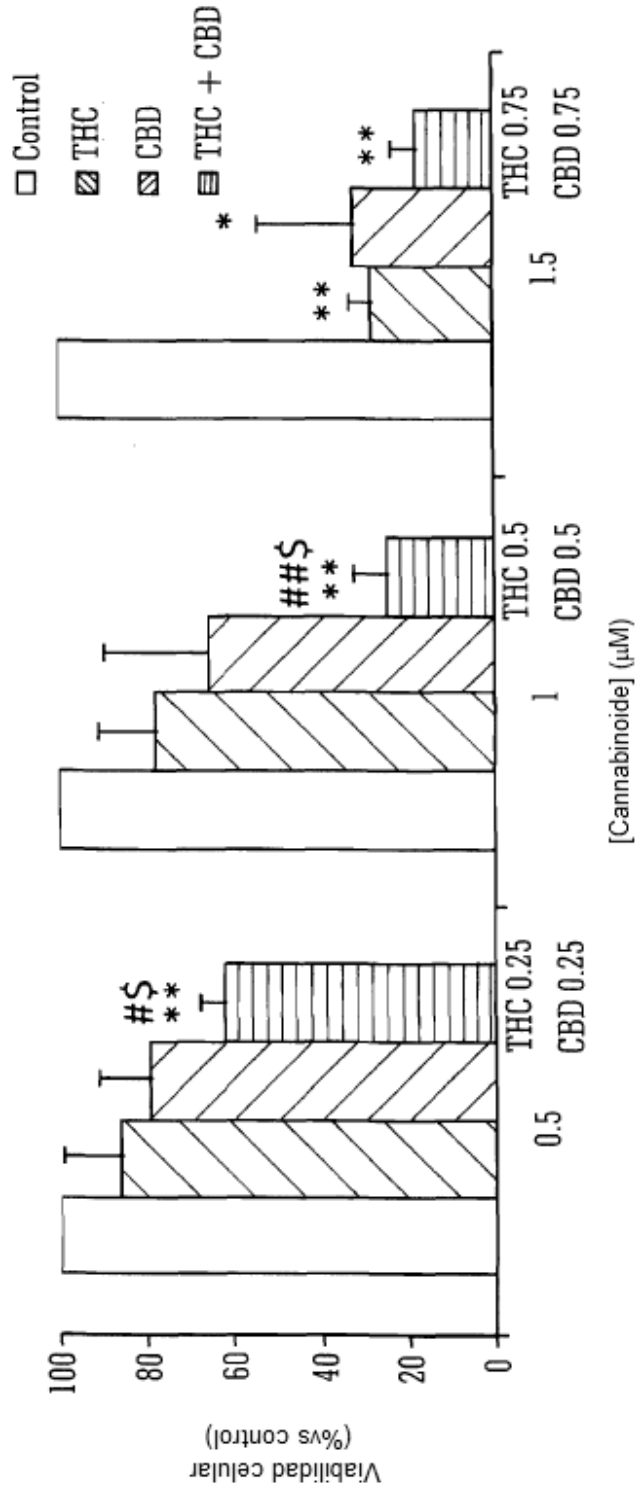


FIG. 3

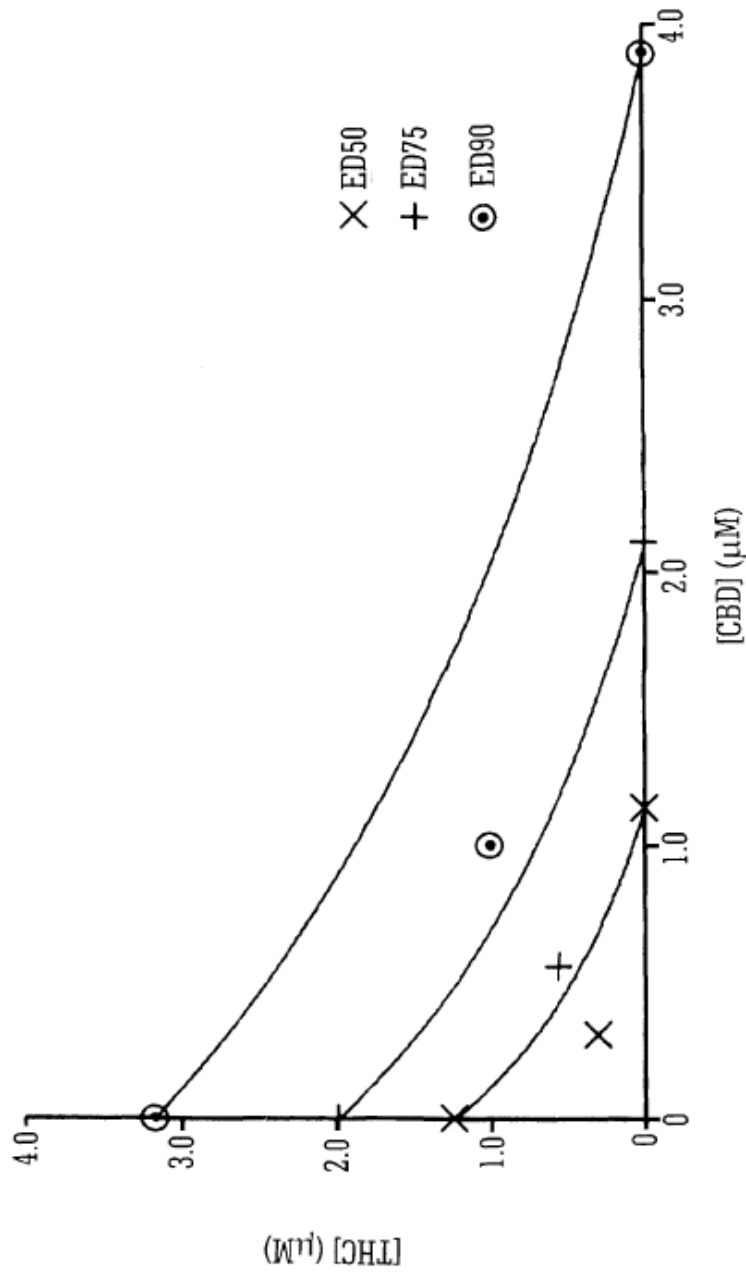


FIG. 4

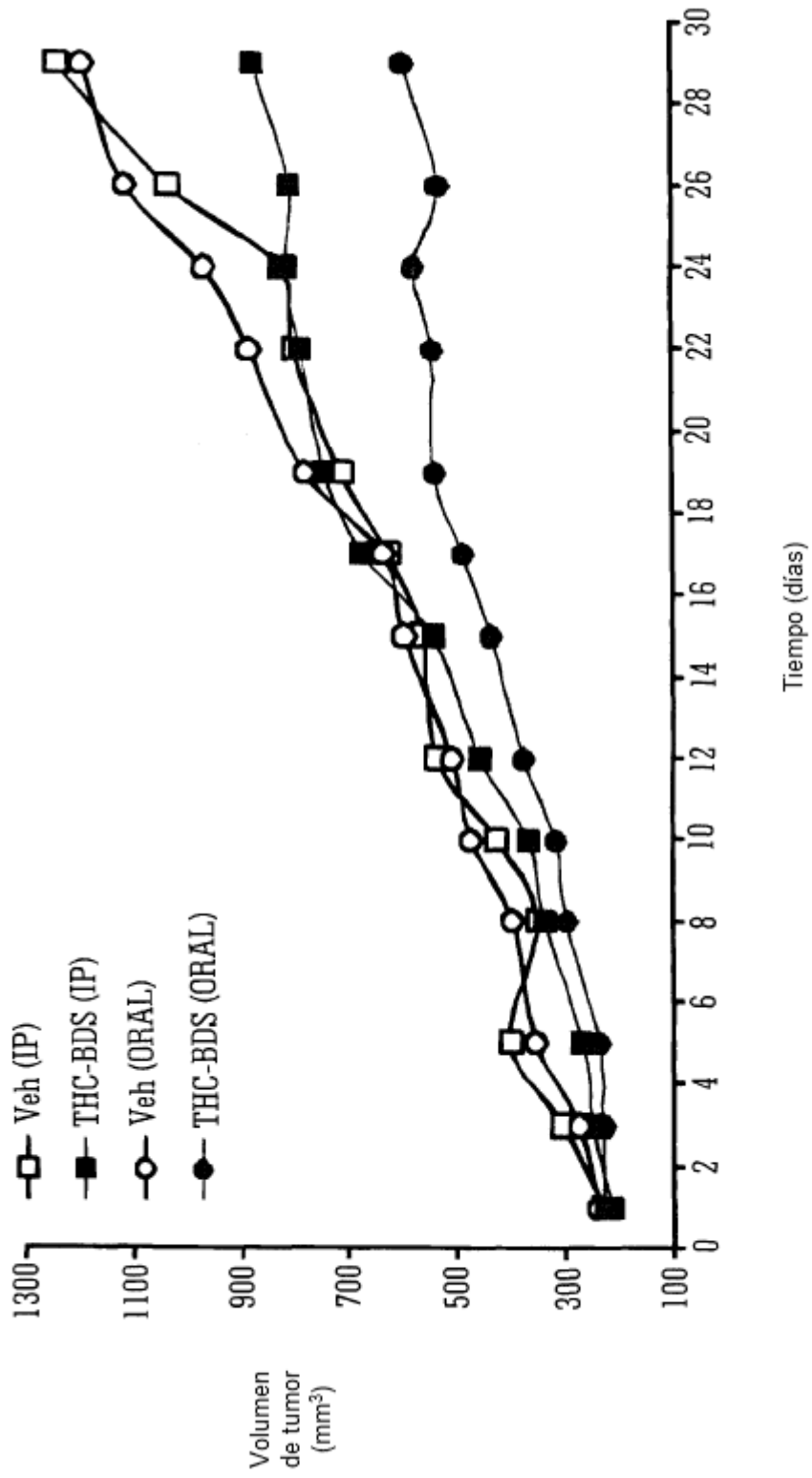


FIG. 5

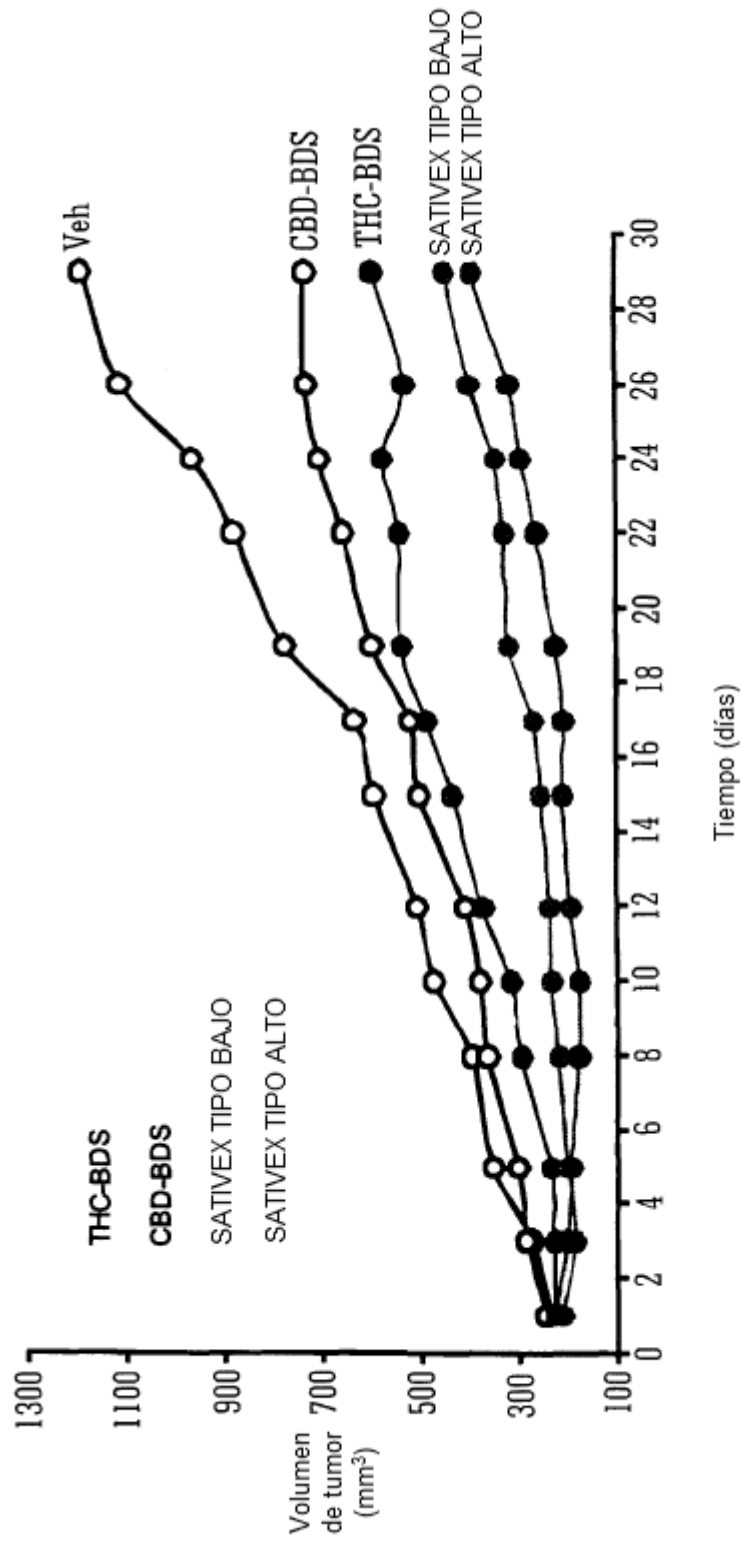


FIG. 6

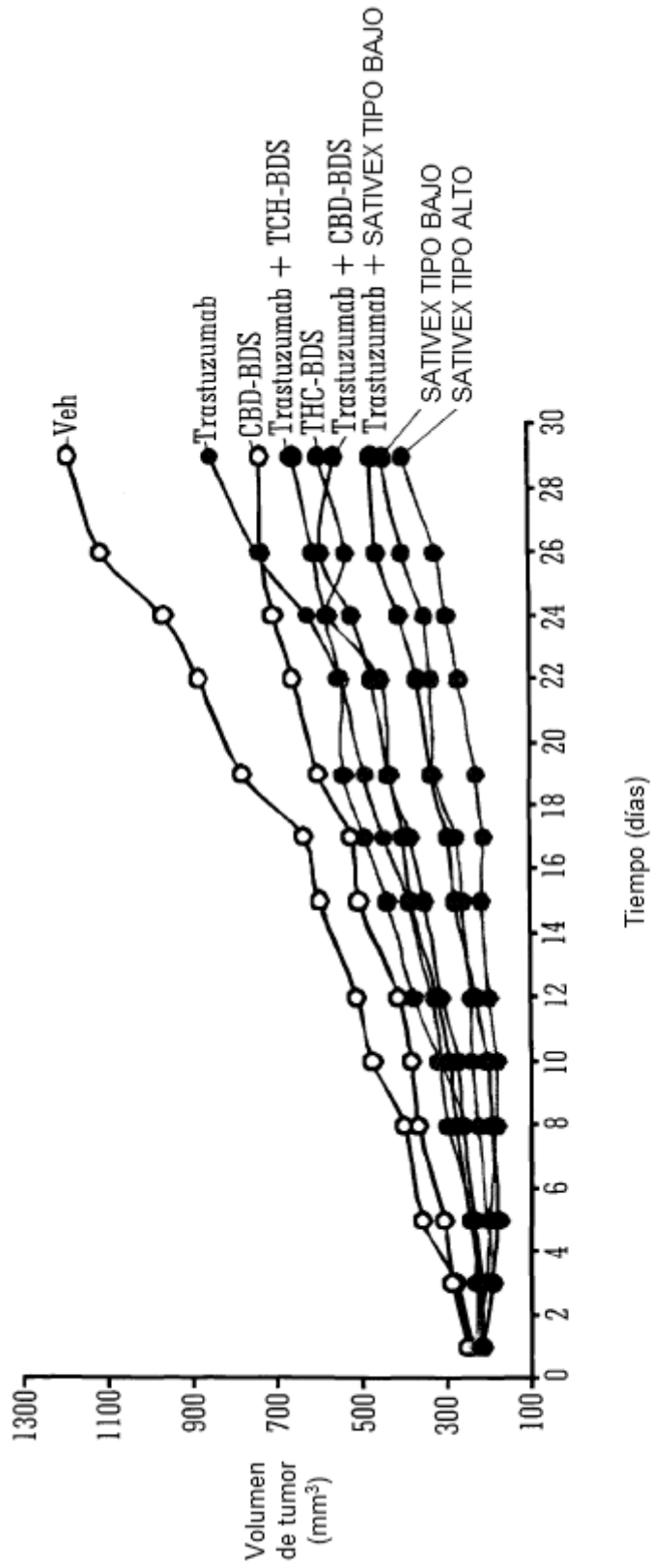


FIG. 7

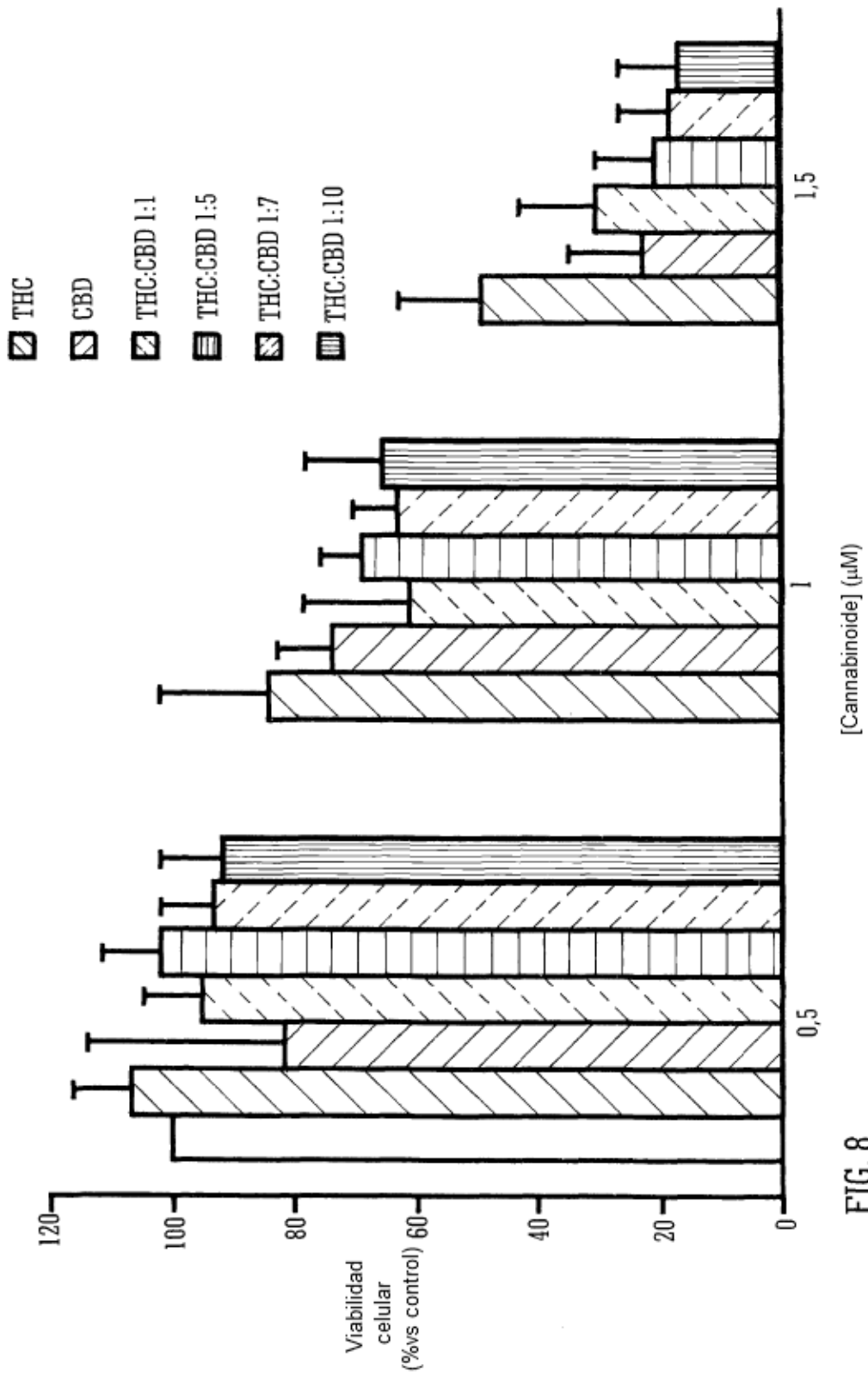


FIG. 8

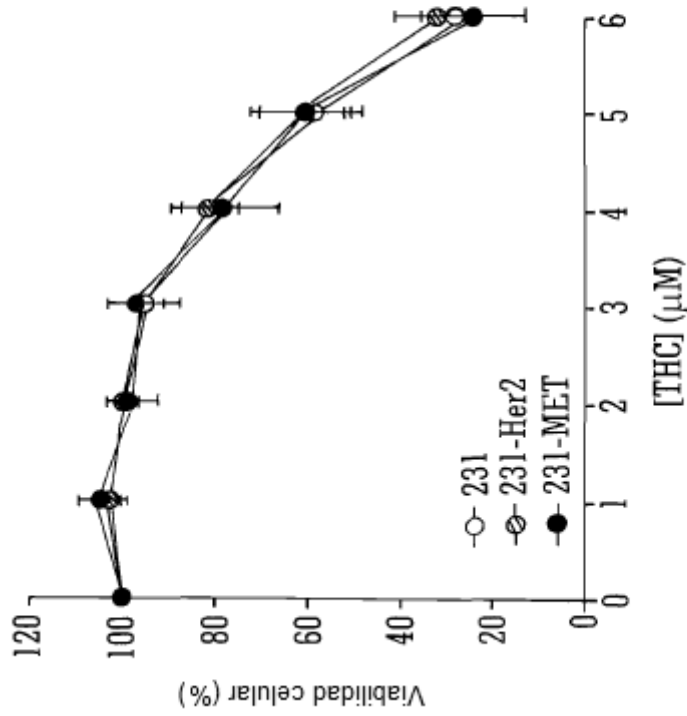
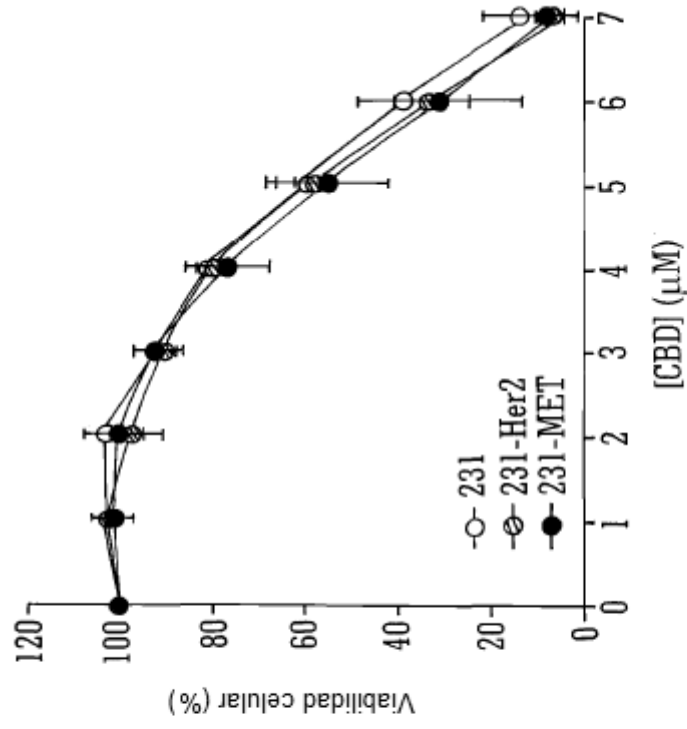


FIG. 9



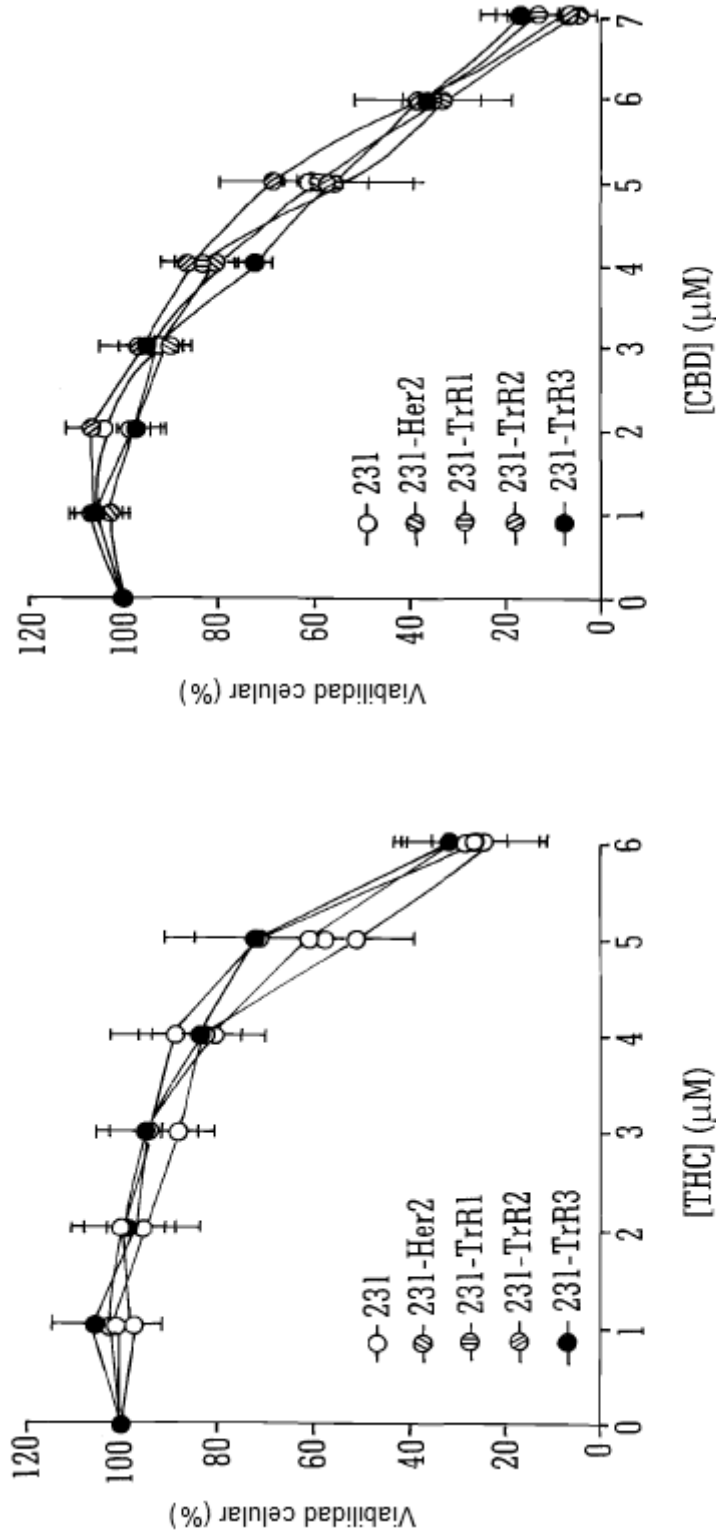


FIG. 10

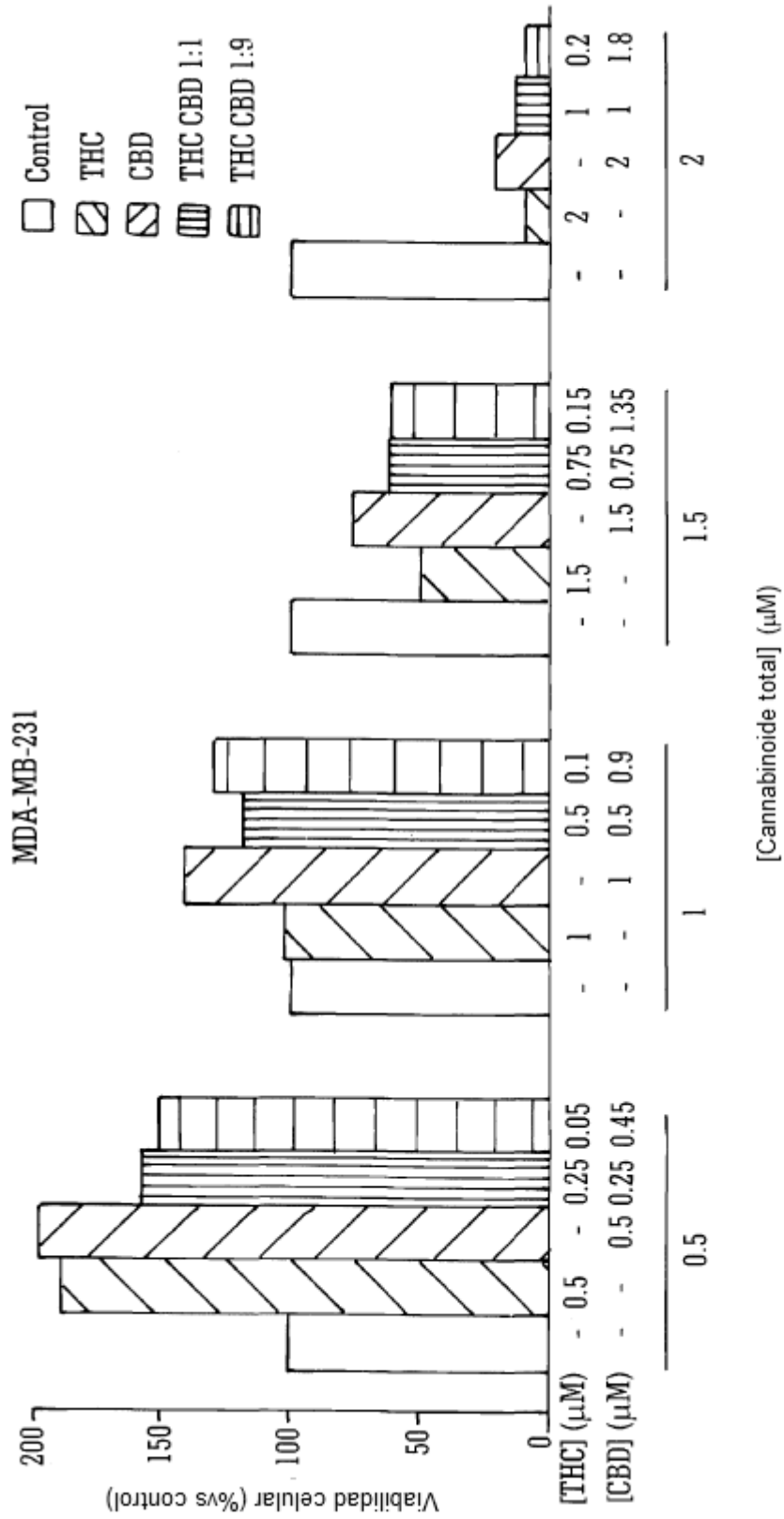
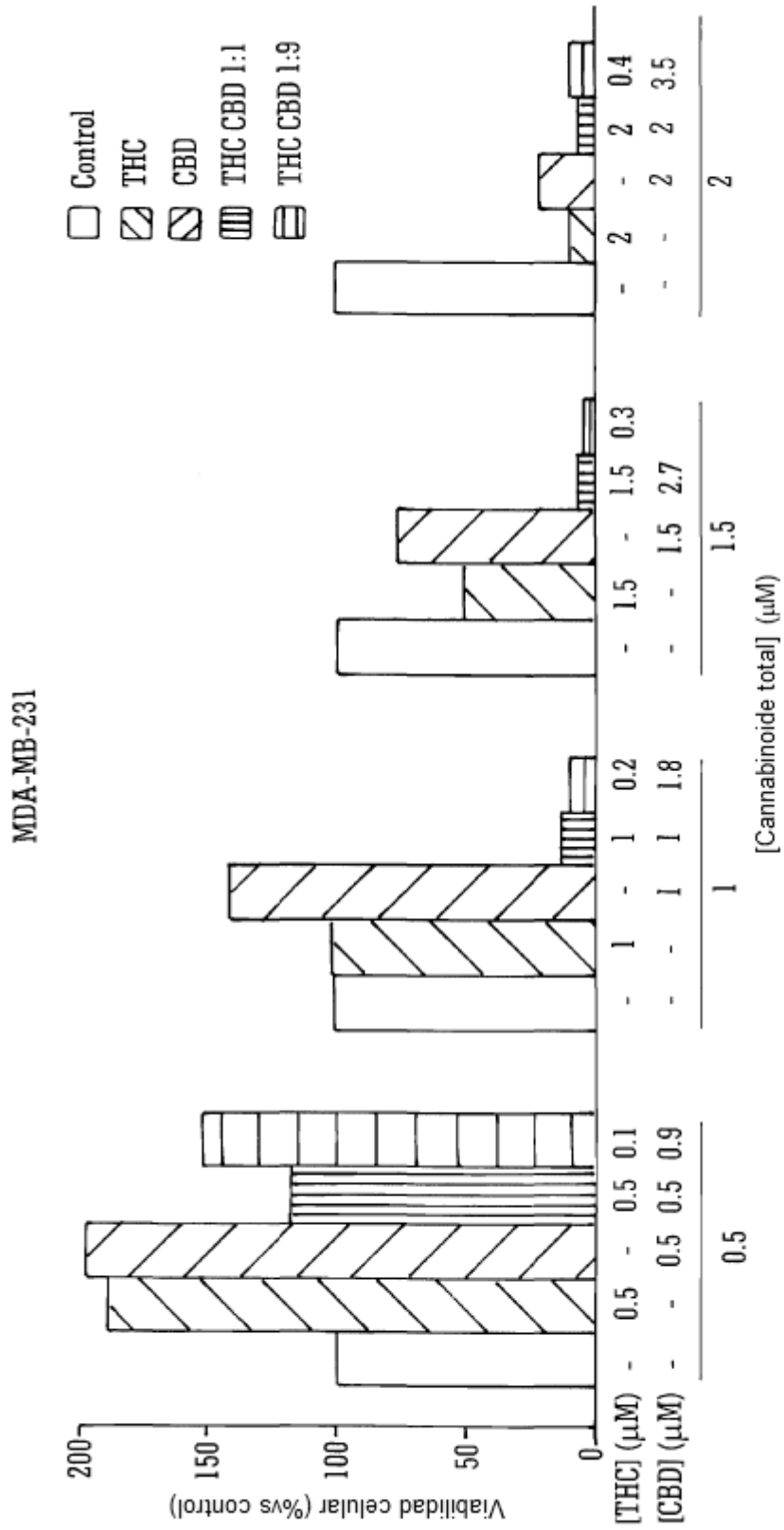


FIG. 11A



**FIG.11B**

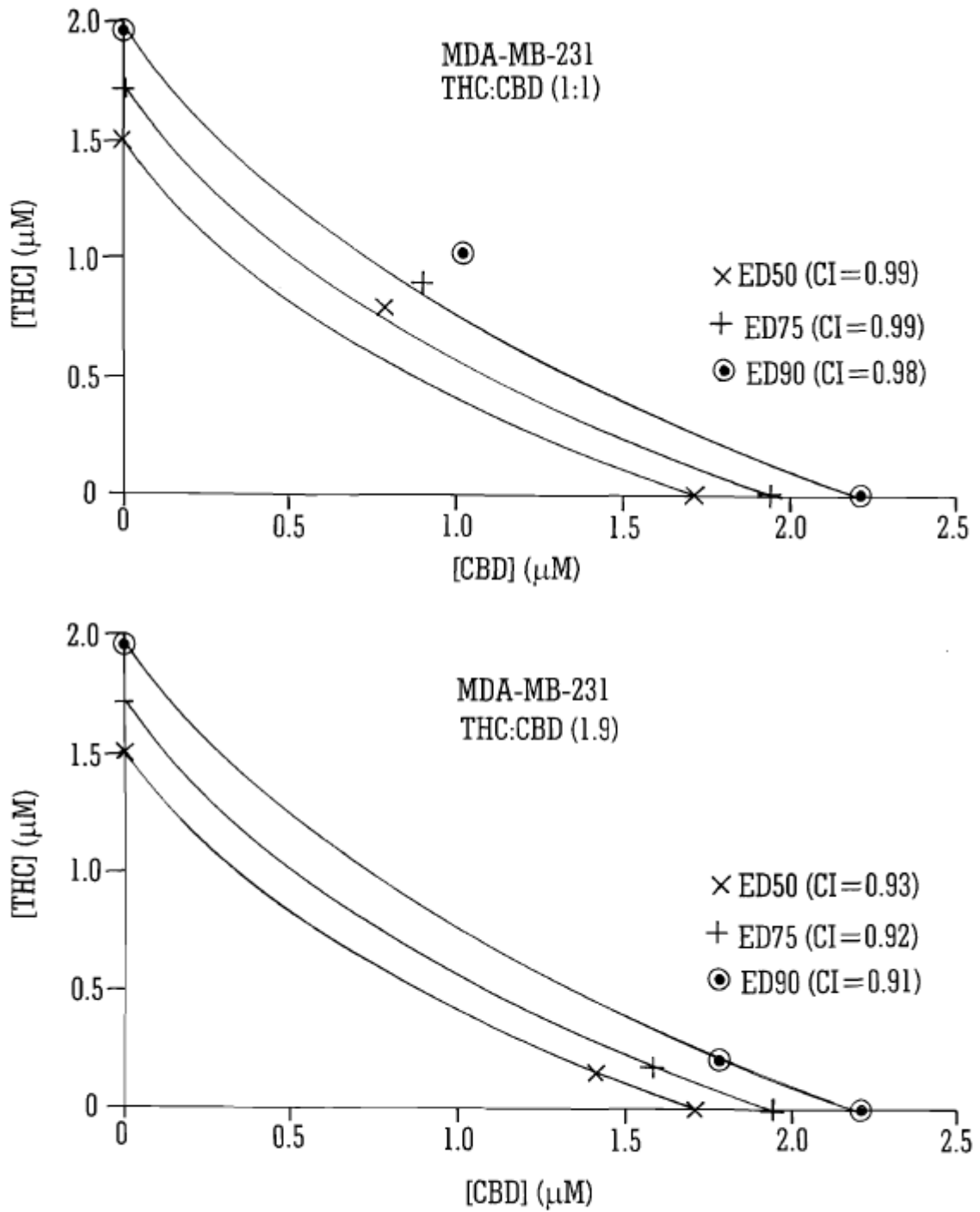


FIG.12

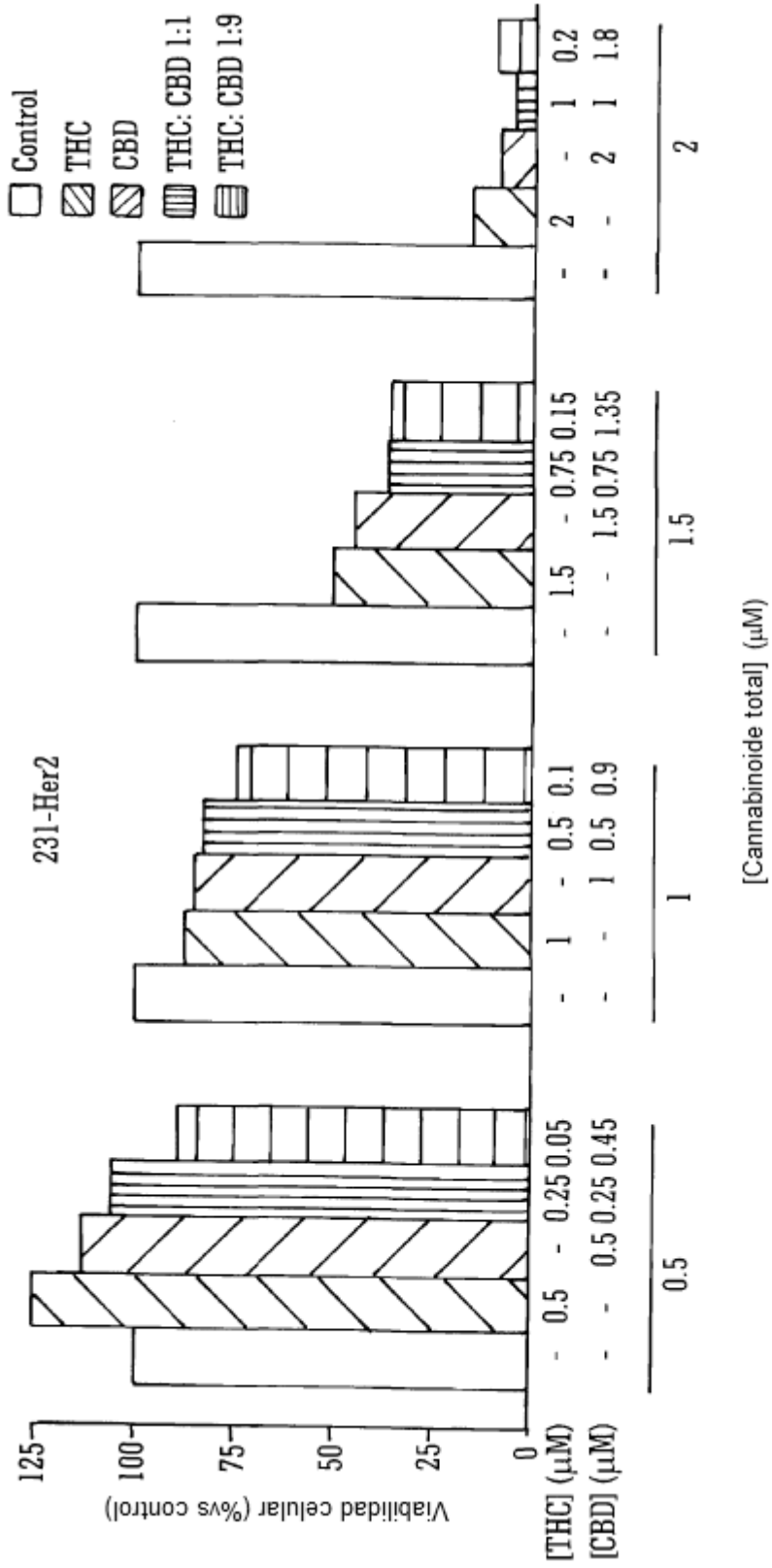


FIG.13A

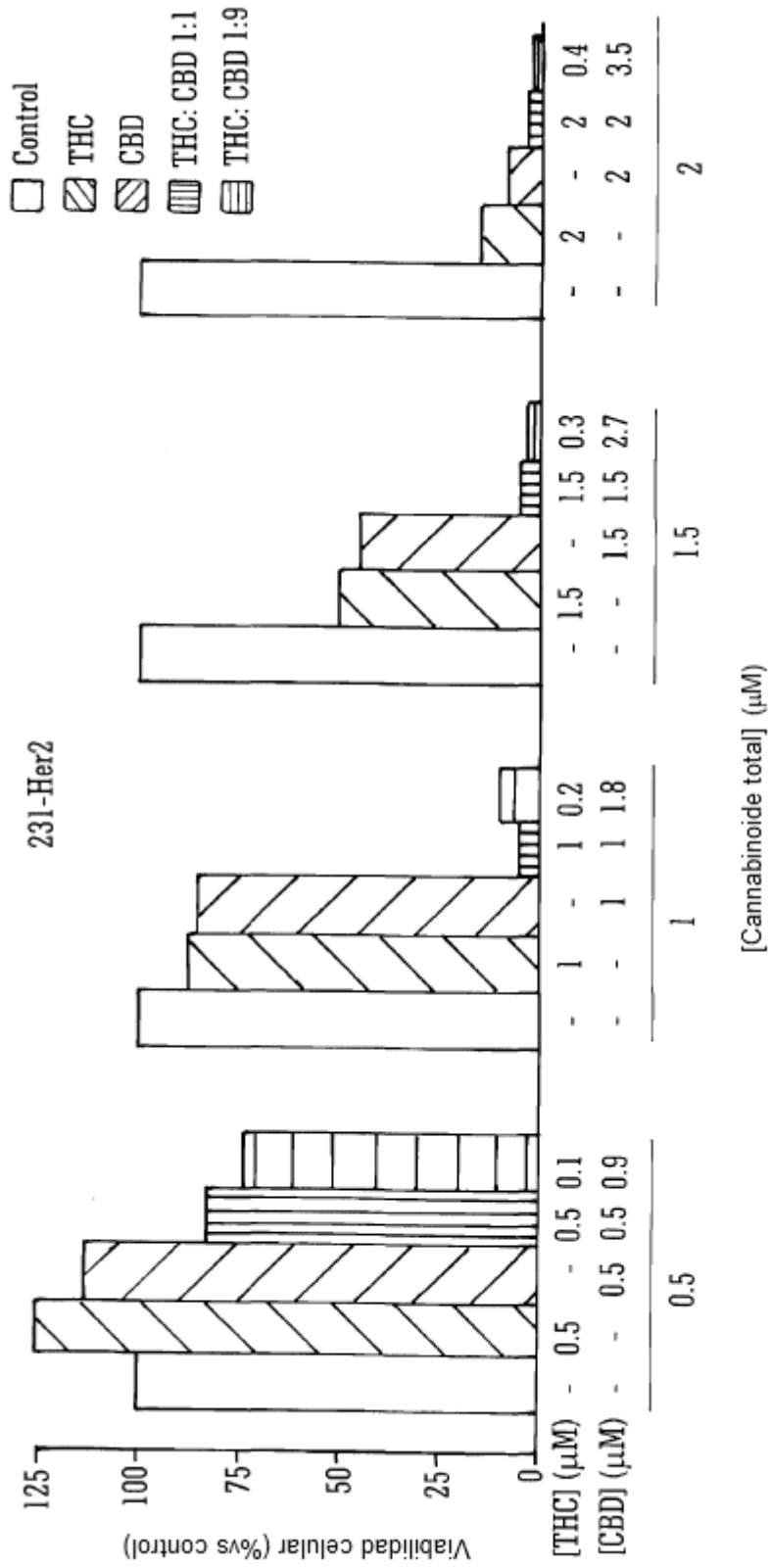


FIG.13B

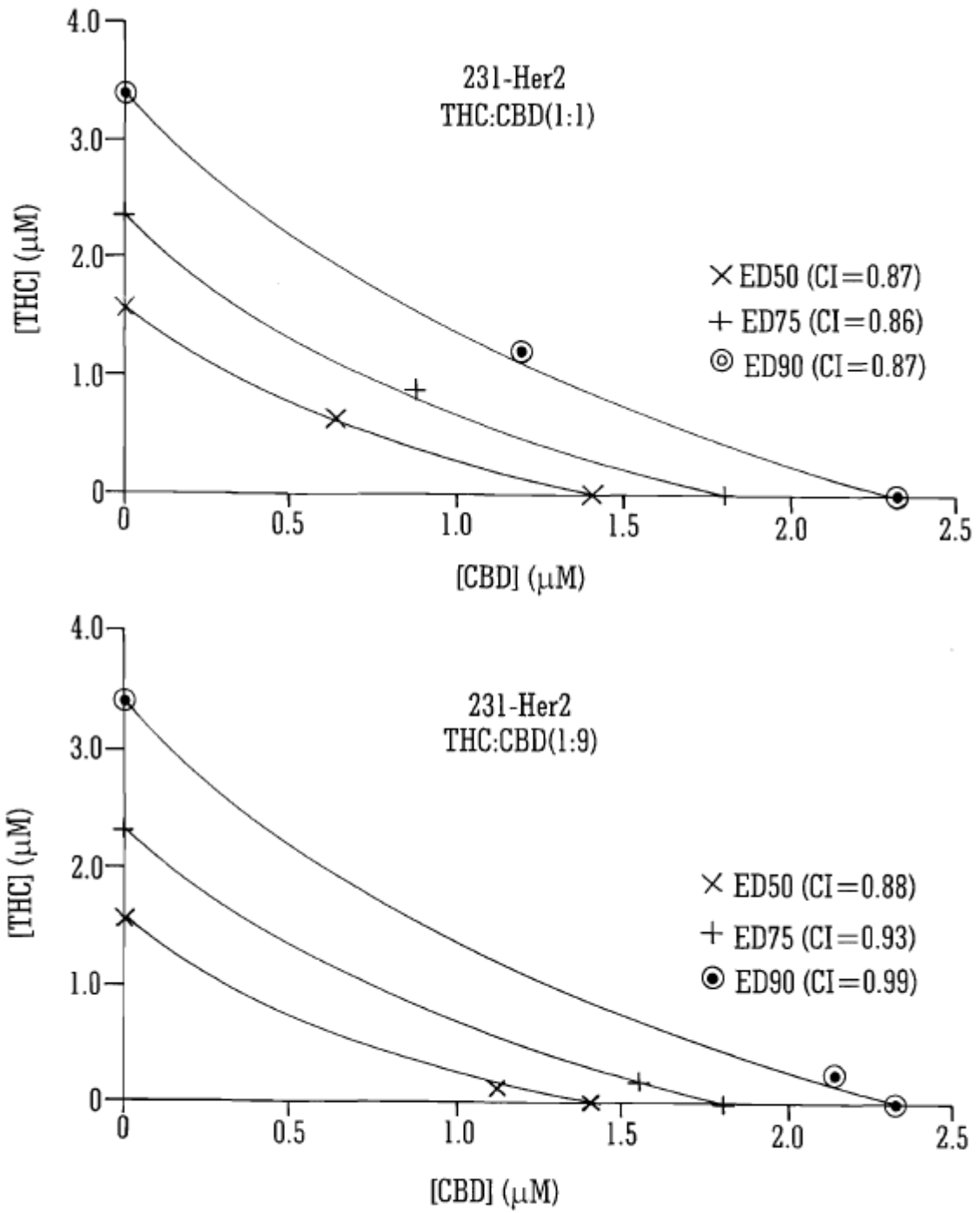


FIG.14

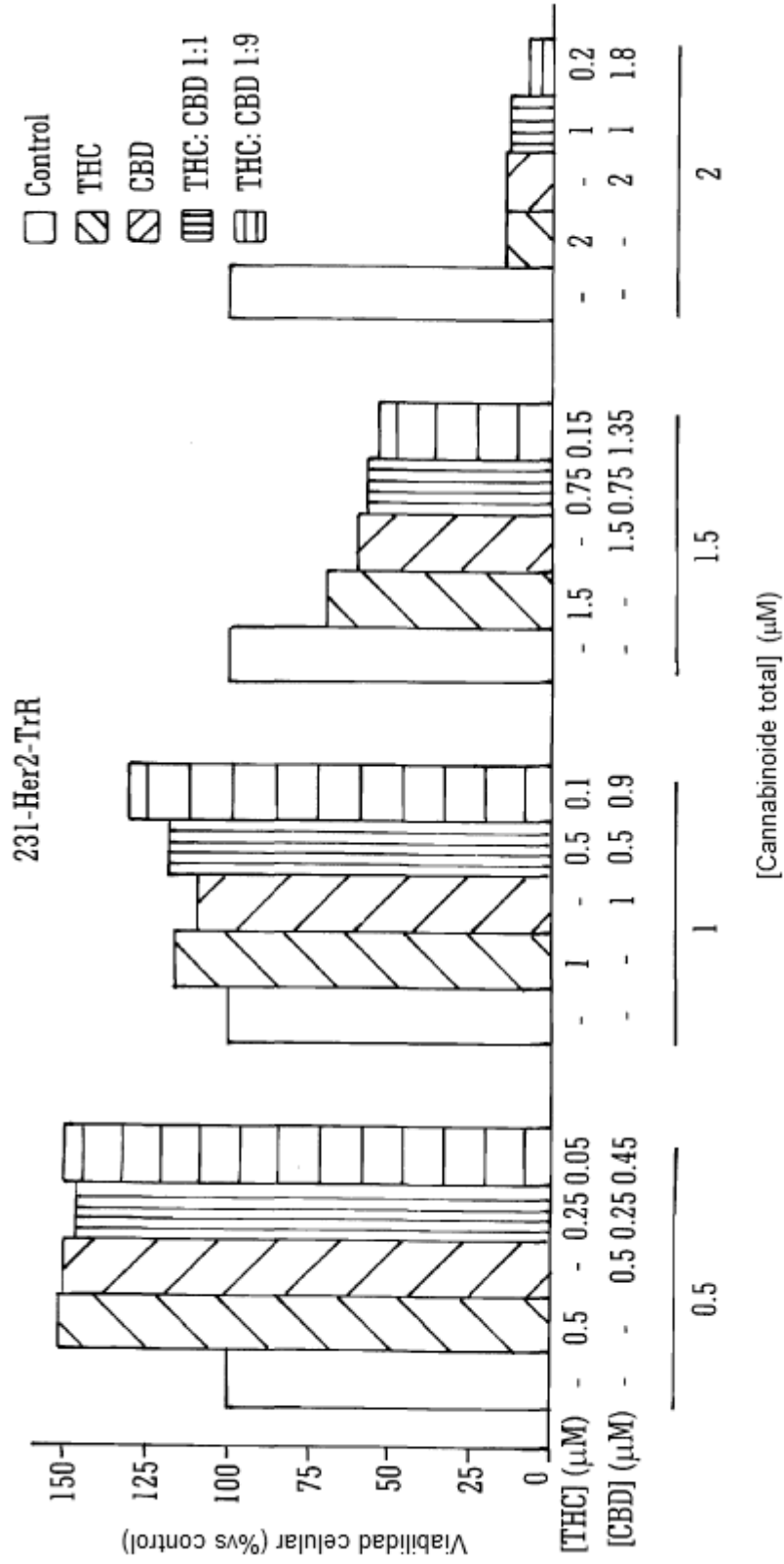


FIG.15A



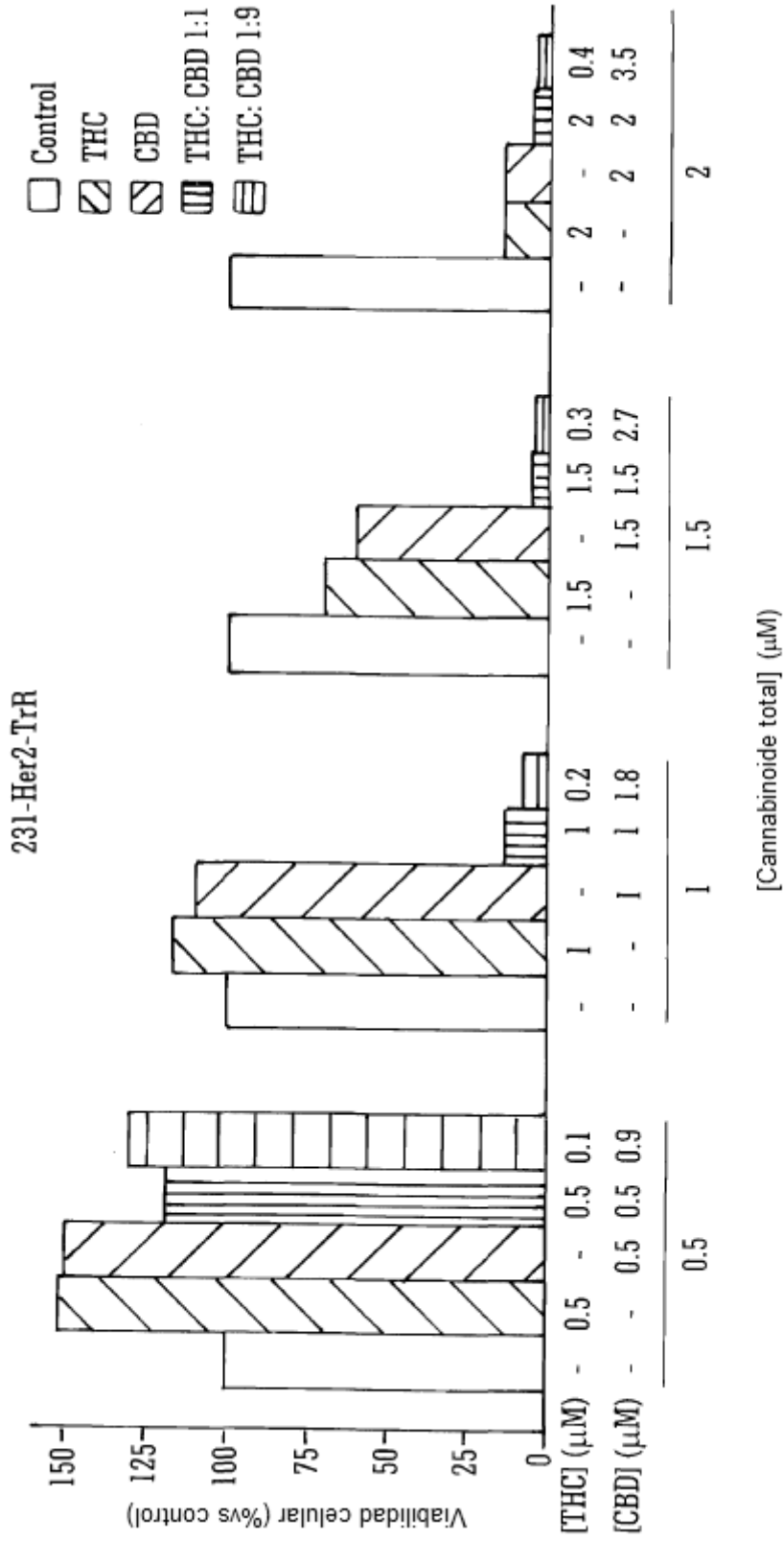


FIG.15B

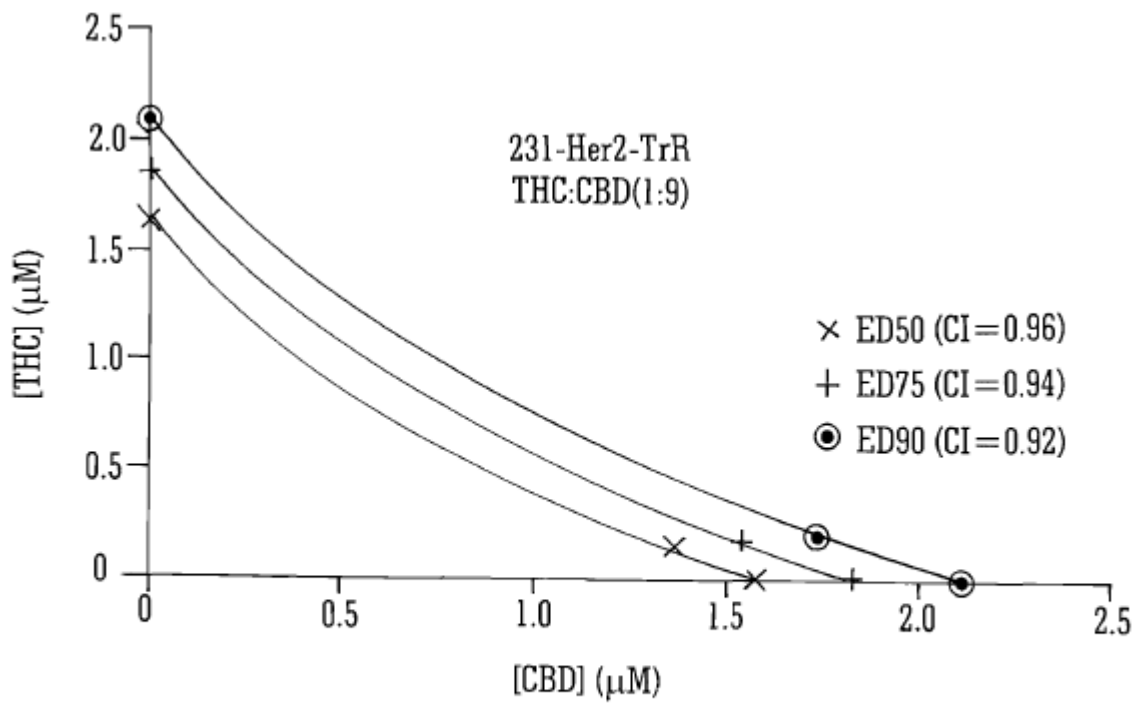
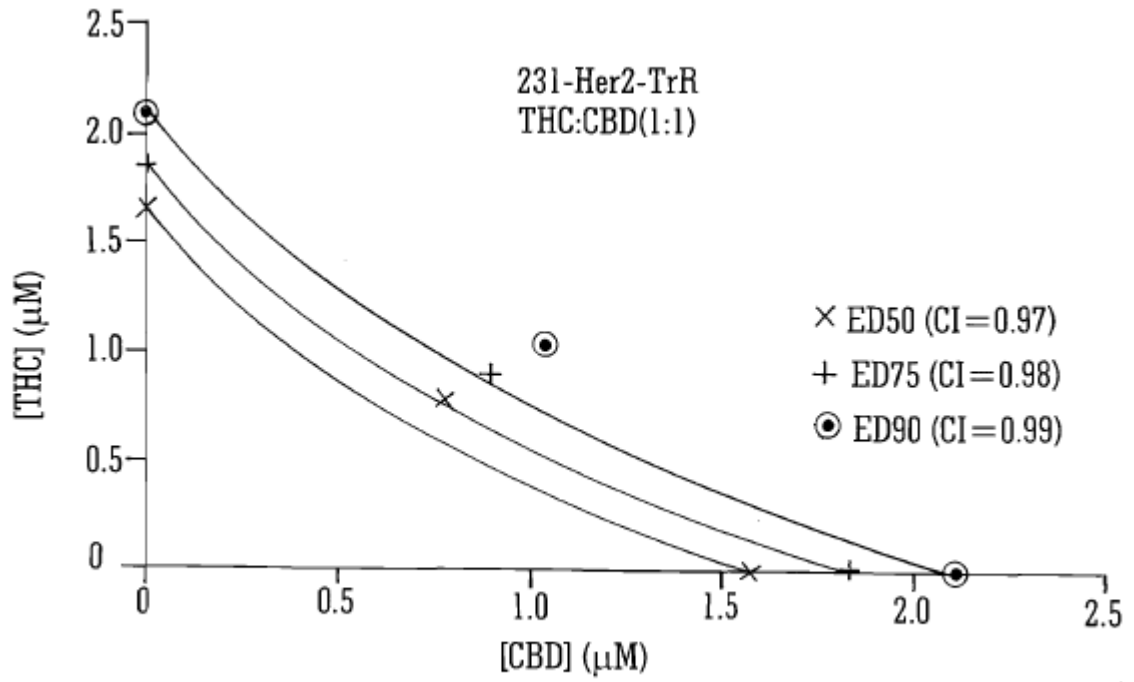


FIG.16

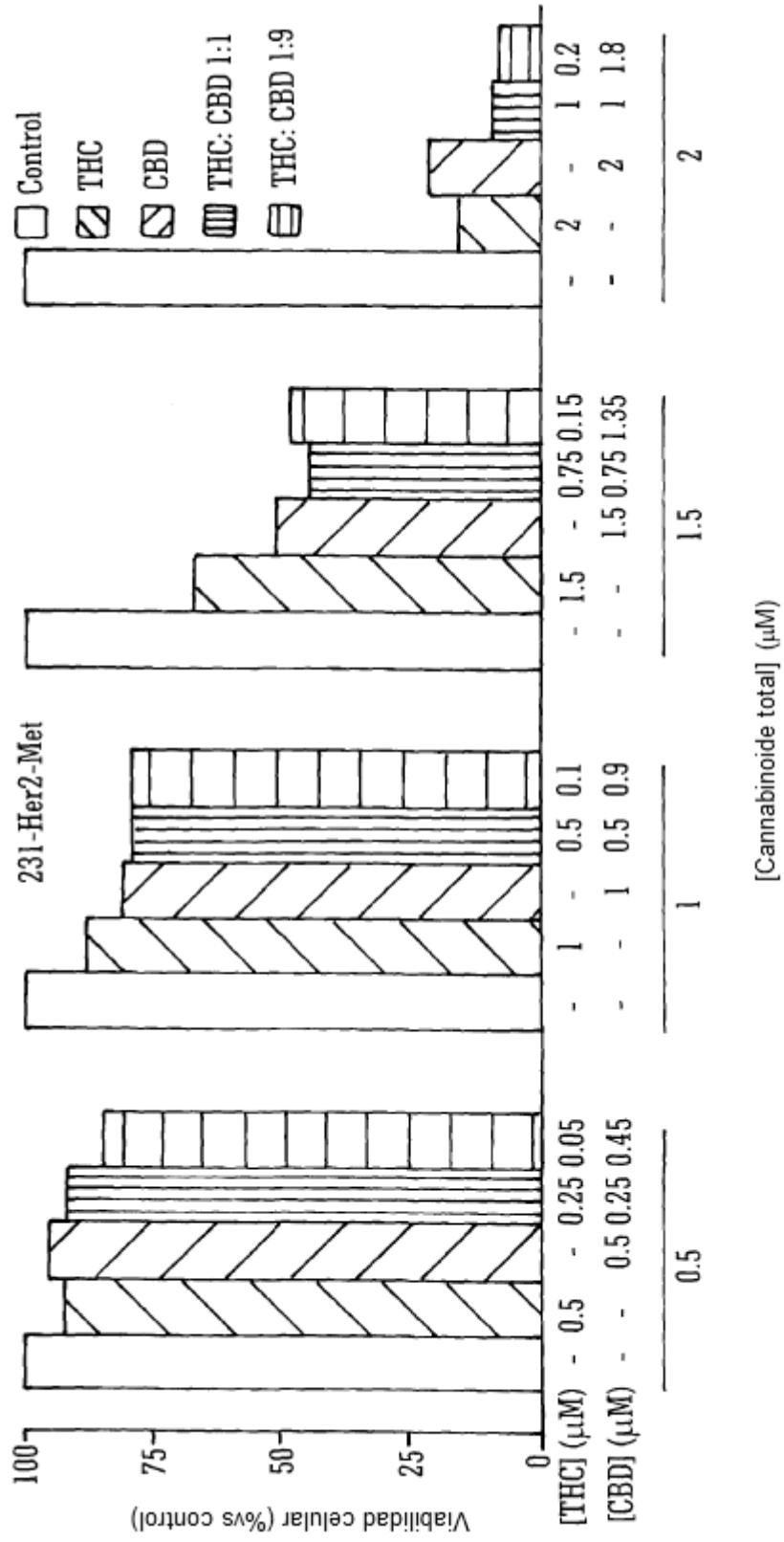


FIG.17A

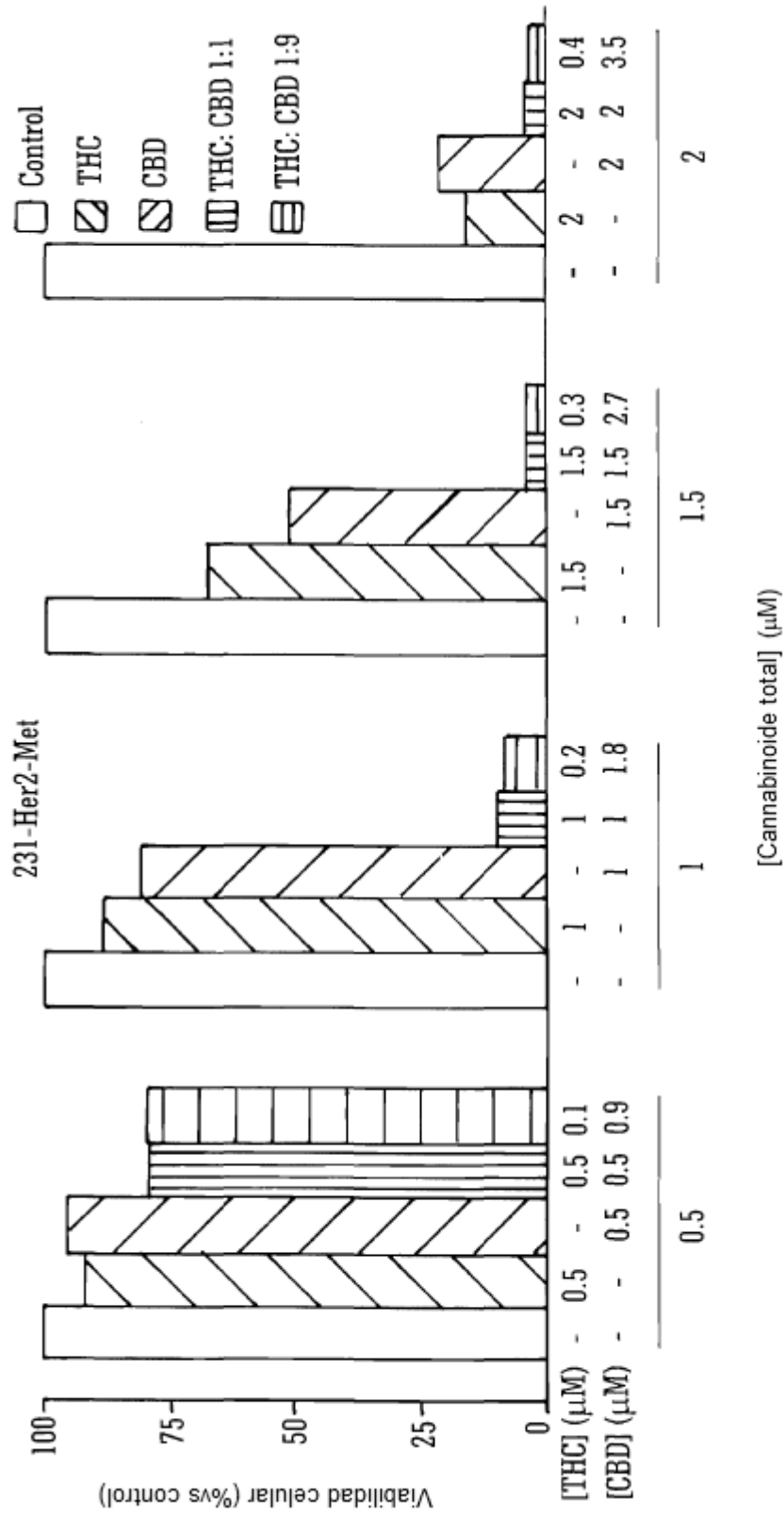


FIG.17B

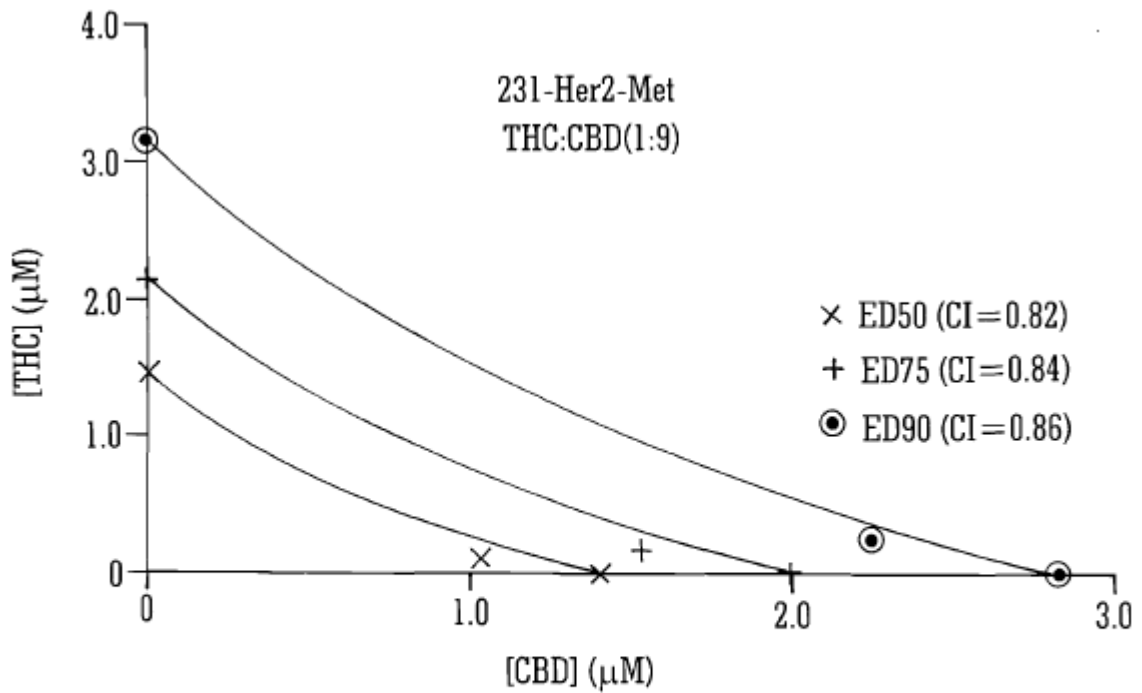
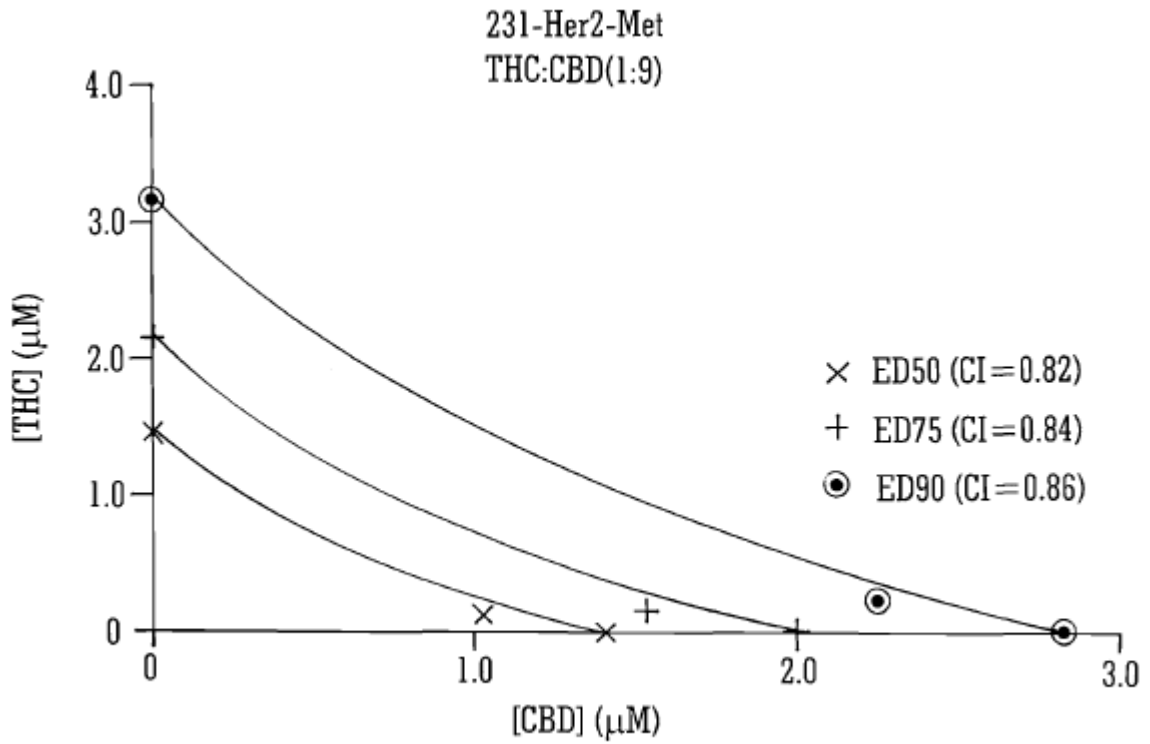


FIG.18

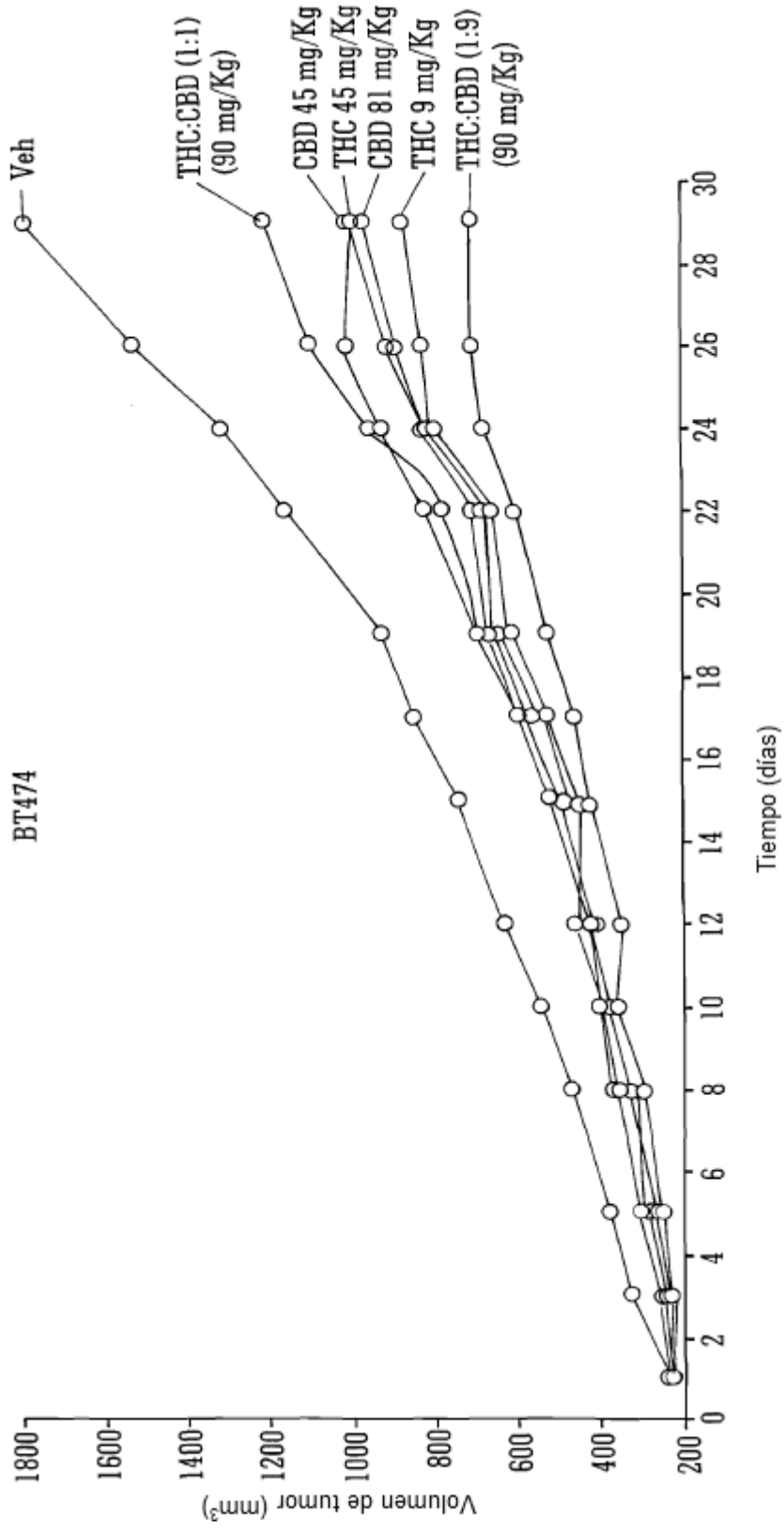


FIG.19