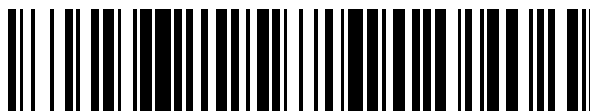


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 051**

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2015 PCT/GB2015/051893**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15198077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2015 E 15733513 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3160456**

54 Título: **7-hidroxi cannabidiol (7-OH-CBD) para uso en el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD)**

30 Prioridad:

27.06.2014 GB 201411467

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

28.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STOTT, COLIN;
DUNCAN, MARNIE;
DI MARZO, VINCENZO;
SILVESTRI, CRISTOFORO y
MARTELLA, ANDREA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 757 051 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

7-hidroxi cannabidiol (7-OH-CBD) para uso en el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD)

5 La presente invención se refiere al 7-hidroxi-cannabidiol (7-OH-CBD) para uso en el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).

Antecedentes de la invención

10 El hígado desempeña un papel clave en la regulación de la homeostasis de la energía corporal total y su capacidad para hacerlo se ve muy afectada por la aparición de afecciones patológicas tales como hepatosteatois o enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), que contribuye a la resistencia a la insulina hepática y mortalidad potencialmente relacionada con la enfermedad hepática en etapa terminal. La acumulación de triglicéridos en los hepatocitos de los hígados esteatóticos resulta de la incorporación de ácidos grasos libres de plasma, así como de la síntesis de grasas de novo.

15 La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es el término para una amplia gama de afecciones causadas por una acumulación de grasa dentro de las células del hígado. Por lo general, se observa en personas con sobrepeso u obesidad. Si aumenta la acumulación de grasa, se puede producir inflamación y cicatrización del hígado.

Las personas que son obesas y tienen NAFLD tienen más riesgo de sufrir un ataque al corazón o un accidente cerebrovascular. De hecho, NAFLD está asociada con; obesidad; diabetes tipo II; alta presión sanguínea; y colesterol alto.

20 El tratamiento de NAFLD implica pérdida de peso y ejercicio; reduciendo los niveles de triglicéridos en la sangre y reduciendo el nivel de glucosa en la sangre.

Actualmente no existen medicamentos específicos para la NAFLD, pero ciertos medicamentos usados para tratar la presión arterial alta y la diabetes también tienen un efecto beneficioso sobre el hígado. La NAFLD puede causar cirrosis o cáncer de hígado y, como tal, un tratamiento temprano y efectivo es esencial.

25 El objetivo principal para el manejo clínico de NAFLD es reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes tipo II. Los riesgos de estas enfermedades disminuyen mucho al reducir los niveles de triglicéridos en la sangre, incluido el colesterol LDL, reduciendo la presión arterial y reduciendo los niveles de glucosa en sangre.

30 Los triglicéridos (TG) son moléculas de grasa que circulan en la sangre y se usan para proporcionar energía al cuerpo, pero se almacenan los TG en exceso que no se usan. Los niveles altos de triglicéridos están relacionados con una mayor probabilidad de enfermedad cardíaca y otros trastornos metabólicos.

Los triglicéridos son el producto final de la digestión y descomposición de las grasas en las comidas. Algunos triglicéridos se producen en el cuerpo a partir de otras fuentes de energía, tales como los carbohidratos. Una dieta saludable y un plan de ejercicio pueden reducir los niveles de triglicéridos, mejorar el colesterol y disminuir el riesgo de enfermedad cardíaca, aunque esto a veces es difícil de lograr.

35 Los altos niveles de triglicéridos también pueden ser causados por mediaciones como los betabloqueantes; inhibidores de la ACE; diuréticos; anticonceptivos hormonales; inmunosupresores; tratamientos contra el HIV; y antipsicóticos.

La reducción de los niveles de TG en la sangre puede ayudar a reducir el riesgo de padecer enfermedades cardíacas, diabetes y otros trastornos metabólicos.

40 Se ha demostrado previamente que la tetrahidrocannabivarina (THCV) puede disminuir los niveles de triglicéridos en las células HHL-5 tratadas con ácido oleico. Este es un modelo in vitro para la enfermedad del hígado graso que mostró que la THCV fue capaz de reducir los niveles de triglicéridos (TG) de una manera dependiente del tiempo (Wargent *et al.*, 2013).

45 También se ha sugerido que el cannabidiol (CBD) puede ser útil para reducir los niveles de TG en sangre (documento WO 2009/093018).

Yang *et al.* (2014) describe que el CBD puede proteger al hígado de los efectos de la esteatosis inducida por el consumo excesivo de alcohol.

La Solicitud de Patente Polaca PL 388833 describe el uso de CBD para reducir el aumento de peso corporal y reducir la acumulación excesiva de grasa.

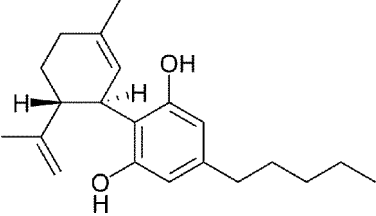
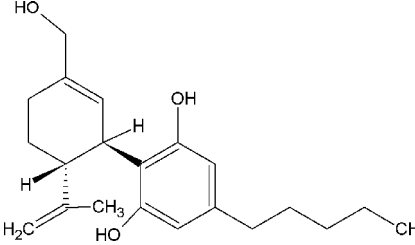
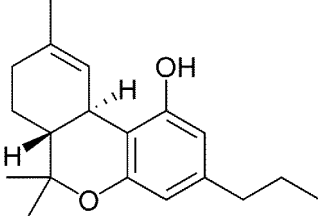
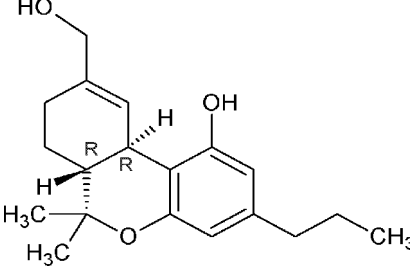
50 Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que un metabolito de CBD, 7-hidroxi-cannabidiol, (7-OH CBD) es capaz de disminuir los niveles de TG intracelular en un modelo in vitro de enfermedad del hígado graso; adicionalmente,

era más potente que su compuesto original CBD. Por el contrario, un metabolito de THCv, 11-hidroxi-tetrahidrocannabivarina, (11-OH-THCV) no tuvo efecto sobre los niveles de TG, lo que infiere que no todos los metabolitos son efectivos de la misma manera que sus compuestos originales.

Definiciones y abreviaturas

5 Las definiciones de algunos de los términos usados para describir la invención se detallan a continuación:

Los fitocannabinoides descritos en la presente solicitud se enumeran a continuación junto con sus abreviaturas estándar.

CBD	Cannabidiol	
7-OH-CBD	7-hidroxi-cannabidiol	
THCV	Tetrahidrocannabivarina	
11-OH-THCV	11-hidroxi-tetrahidrocannabivarina	

10 La tabla anterior no es exhaustiva y simplemente detalla los cannabinoides que se identifican en la presente solicitud de referencia. Hasta ahora se han identificado más de 60 cannabinoides diferentes y estos cannabinoides se pueden dividir en diferentes grupos de la siguiente manera: fitocannabinoides; endocannabinoides y cannabinoides sintéticos (que pueden ser nuevos cannabinoides o fitocannabinoides o endocannabinoides producidos sintéticamente).

15 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 las plantas para producir un extracto altamente purificado o se pueden reproducir sintéticamente.

Los "extractos de cannabinoides altamente purificados" se definen como los cannabinoides que se han extraído de la planta de cannabis y se han purificado en la medida en que otros cannabinoides y componentes no cannabinoides que se extraen conjuntamente con los cannabinoides se han eliminado sustancialmente, de modo que el cannabinoide altamente purificado es mayor o igual al 98% (p/p) puro.

- 5 Los "cannabinoides sintéticos" son compuestos que tienen una estructura de tipo cannabinoide o cannabinoide y se fabrican usando medios químicos en lugar de por la planta.

Los fitocannabinoides se pueden obtener 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.

Breve resumen de la divulgación

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende 7-hidroxi-cannabidol (7-OH-CBD) y un portador farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).

- 15 En una realización, la NAFLD puede ser causada por obesidad; diabetes tipo II; o medicación.

Preferiblemente, la dosis de 7-OH-CBD está entre 1 y 1000 mg/kg día.

La composición farmacéutica puede comprender 7-OH-CBD en formulado en combinación con otro medicamento. Preferiblemente, el 7-OH-CBD se puede formular para administración por separado, secuencial o simultáneamente con el otro medicamento o la combinación se puede proporcionar en una sola forma de dosificación.

- 20 Preferiblemente, el 7-OH-CBD está en una forma pura, aislada o sintética.

Se prevé que la composición se administre como una solución líquida oral. Otros modos de administración que incluyen sólidos, semisólidos, geles, pulverizadores, aerosoles, inhaladores, vaporizadores, enemas y supositorios son formas alternativas de administración. Tales medicamentos se podrían administrar por vía oral, bucal, sublingual, respiratoria, nasal y del recto distal.

- 25 Breve descripción de los dibujos

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

La figura 1 muestra la tinción de AdipoRed de triglicéridos en células HHL5; y

La figura 2 muestra la tinción de AdipoRed de triglicéridos en adipocitos maduros derivados de 3T3-L1.

- 30 Leyenda de las figuras:

Figura 1. THCV, CBD y 7-OH-CBD disminuyen la tinción de AdipoRed de triglicéridos en células HHL5 de una manera dependiente de la dosis. Las células HHL5 en placas de 96 pocillos a una confluencia del 90% tratadas sin o con ácido oleico 100uM en ausencia o presencia de THCV, 11-OH-THCV, CBD o 7-OH-CBD a las concentraciones indicadas (uM) analizadas para niveles de triglicéridos intracelulares usando AdipoRed (Lonza) (arriba) o viabilidad celular a través de MTT (abajo). Los datos se expresan como la desviación promedio y estándar de las señales de 4 pozos. * P <0.05.

Figura 2. THCV, CBD y 7-OH-CBD disminuyen la tinción de AdipoRed de triglicéridos en adipocitos maduros derivados de 3T3-L1 de una manera dependiente de la dosis. Las células 3T3-L1 se cultivaron y se diferenciaron en placas de 100 mm durante 5 días antes de transferirse a placas de 96 pocillos, en d7 las células se trataron con THCV, 11-OH-THCV, CBD o 7-OH-CBD a las concentraciones indicadas (uM) durante 48 horas antes del análisis de los niveles de triglicéridos intracelulares ensayados usando AdipoRed (Lonza) (arriba) o viabilidad celular a través de MTT (abajo). Los datos se expresan como la desviación promedio y estándar de las señales de 4 pozos. * P <0.05.

Descripción detallada

El siguiente ejemplo describe el uso de un modelo in vitro de enfermedad del hígado graso para demostrar la eficacia del CBD, THCV y sus metabolitos primarios 7-OH-CBD y 11-OH-THCV respectivamente para reducir los niveles de triglicéridos.

El 7-OH-CBD es el metabolito primario de su compuesto original CBD y la 11-OH-THCV es el metabolito primario de su compuesto original THCV.

Ejemplo 1:

Materiales y métodos

Cultivo de células:

5 Se cultivaron células HHL-5 en medios de crecimiento estándar (DMEM [Lonza] suplementado con FBS al 10% [Lonza], NEAA [Gibco] y pen./estrep. [Gibco]). Las células 3T3-L1 se cultivaron en medios de crecimiento (GM; DMEM [Lonza] bajo en NaHCO₃ (1.5 g/l), suplementado con FBS al 10% [Lonza] y pen./estrep. [Gibco]).

10 Para inducir la adipogénesis, las células se cultivaron al 100% de confluencia y luego se cambiaron a medios de diferenciación (DMEM [Lonza] suplementado con un lote específico de FBS al 10% [Lonza], 1ug/ml de insulina (Sigma), dexametasona 250 nM (Sigma), MIX 500uM (Sigma) y pen./estrep. [Gibco]) durante 2 días, seguido de incubación en DMEM [Lonza] suplementado con un lote específico de FBS al 10% [Lonza], 1ug/ml de insulina (Sigma) y pen./estrep. [Gibco] hasta el día 7-10, momento en el que los adipocitos maduros se tratan con cannabinoides a las concentraciones indicadas.

Análisis de nivel de triglicéridos en células:

15 Las células HHL5 sembradas en placas de 96 pocillos se cultivaron hasta un 90% de confluencia y luego se trataron con ácido oleico 100 µM (OA) o DMSO (-) durante 24 horas en ausencia o presencia de cannabinoides a las concentraciones indicadas.

20 Las células 3T3-L1 se sembraron en placas de 100 mm y se diferenciaron como anteriormente para obtener adipocitos maduros, momento en el que se volvieron a sembrar en placas de 96 pocillos y luego se trataron con las concentraciones indicadas de cannabinoides durante 2 días. Luego se lavaron las células con PBS y se tiñeron con AdipoRed (Lonza) y se leyeron con un lector de placas Genios Pro (Tecan) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayo MTT:

Se añadió MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5 difeniltetrazolio) (medio de diferenciación 5 mg/ml) a las células tratadas como se describe anteriormente, y las células se incubaron durante 1 hora adicional a 37 °C.

25 Las células se lavaron luego en PBS y se secaron antes de la adición de 100 ul de isopropanol para disolver el precipitado de formazán. La OD de cada pocillo se midió con un lector de placas Genios-Pro (Tecan) equipado con un filtro de 620 nm.

Resultados

Los hepatocitos HHL5 que han sido tratados con ácido oleico para inducir la acumulación de lípidos intracelulares son un modelo in vitro útil para la enfermedad del hígado graso.

30 La THCv y el CBD, cuando se metabolizan por el hígado, dan como resultado la formación de los metabolitos 11-OH-THCV y 7-OH-CBD (entre otros) respectivamente.

La capacidad de 11-OH-THCV y 7-OH-CBD purificados para modular los niveles de lípidos intracelulares en el sistema modelo de hepatosteatois in vitro se probó para determinar si el metabolismo de THCv y CBD dio como resultado compuestos (metabolitos) que fueron más o menos activos que sus cannabinoides originales.

35 Tras la incubación conjunta de las células HHL5 con ácido oleico 100 µM con los compuestos mencionados anteriormente durante 24 horas, encontramos que, tanto la THCv como el CBD redujeron los niveles de lípidos intracelulares dependientes de la dosis.

40 La figura 1 muestra que el metabolito de THCv, 11-OH-THCV, carecía de actividad reductora de lípidos, y el metabolito de CBD, 7-OH-CBD, era eficaz para reducir los niveles de TG. De hecho, el compuesto 7-OH-CBD era aún más potente que su compuesto original CBD (Figura 1, arriba).

Las células HHL5 tratadas en paralelo también se evaluaron para determinar su viabilidad usando el ensayo MTT, y no se encontró toxicidad para THCv o CBD hasta 20 µM. Del mismo modo, ni 11-OH-THCV ni 7-OH-CBD resultaron ser tóxicos, lo que indica que las disminuciones observadas en el contenido de lípidos no se debieron a la toxicidad (Figura 1, abajo).

45 Los adipocitos son la principal reserva biológica de triglicéridos. La producción in vitro de adipocitos maduros derivados de 3T3-L1 permite examinar los efectos de los cannabinoides sobre el contenido de lípidos de un grupo relativamente puro de adipocitos.

50 Como se muestra en la figura 2 (arriba), al igual que en los hepatocitos HHL5, THCv, CBD y 7-OH-CBD, todos disminuyen las reservas de lípidos intracelulares dependientes de la dosis dentro de los adipocitos maduros derivados de 3T3-L1, mientras que nuevamente, 11-OH-THCV no tuvo efecto.

Discusión

Los datos presentados en este ejemplo refuerzan los estudios previamente informados de que la THCv y el CBD pueden ser agentes útiles para regular el metabolismo de los lípidos.

5 Curiosamente, los metabolitos de estos cannabinoides, 11-OH-THCV y 7-OH-CBD difieren en sus capacidades para modular los niveles de lípidos.

Mientras que la 11-OH-THCV parece estar inactivo, el 7-OH-CBD parece ser más activo que el CBD.

10 Estos datos confirman que, al igual que en los hepatocitos, la THCv y el CBD pueden reducir los niveles de lípidos dentro de los adipocitos 3T3-L1 maduros derivados in vitro. Además, como en los hepatocitos, mientras que la 11-OH-THCV no tuvo efecto sobre los niveles de lípidos, el 7-OH-CBD fue más eficaz que el CBD para reducir la tinción de AdipoRed en adipocitos maduros. Estos resultados no se asociaron con ningún efecto aparente sobre la viabilidad celular basado en el ensayo MTT.

15 La sorprendente capacidad del metabolito 7-OH-CBD para reducir los niveles de triglicéridos por lo tanto hace que este sea un tratamiento potencialmente útil de los trastornos metabólicos al reducir los niveles de triglicéridos (colesterol) en el torrente sanguíneo. El hecho de que 7-OH-CBD parezca más potente que su cannabinoide original, CBD, significa que se pueden usar dosis más bajas de 7-OH-CBD en el tratamiento de NAFLD.

Referencias

Wargent et al., (2013) The cannabinoid $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabivarin (THCV) ameliorates insulin sensitivity in two mouse models of obesity. *Nutr. Diabetes*. 27:3e68.

20 Yang et al. (2014) *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 68, 2014, 260-267 "Cannabidiol protects liver from binge alcohol-induced steatosis by mechanisms including inhibition of oxidative stress and increase in autophagy."

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende 7-hidroxi-cannabidol (7-OH-CBD) y un portador farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).
- 5 2. Una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que la NAFLD es causada por la obesidad.
3. Una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 2, en la que la NAFLD es causada por la diabetes tipo II.
4. Una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 2, en la que la NAFLD es causada por medicamentos.
- 10 5. Una composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la dosis de 7-OH-CBD está entre 1 y 1000 mg/kg día.
6. Una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, formulada en combinación con otro medicamento en la que el 7-OH-CBD se puede administrar por separado, secuencial o simultáneamente con el otro medicamento o la combinación se puede proporcionar en una sola forma de dosificación.
- 15 7. Una composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el 7-OH-CBD está en una forma pura, aislada o sintética.

Figura 1. Tinción de AdipoRed de triglicéridos en células HHL5

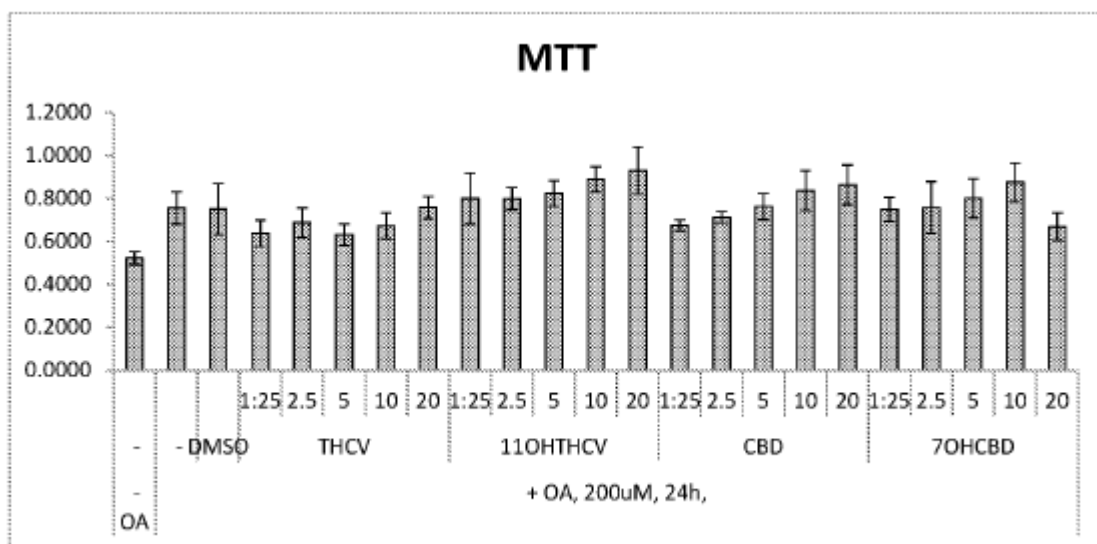
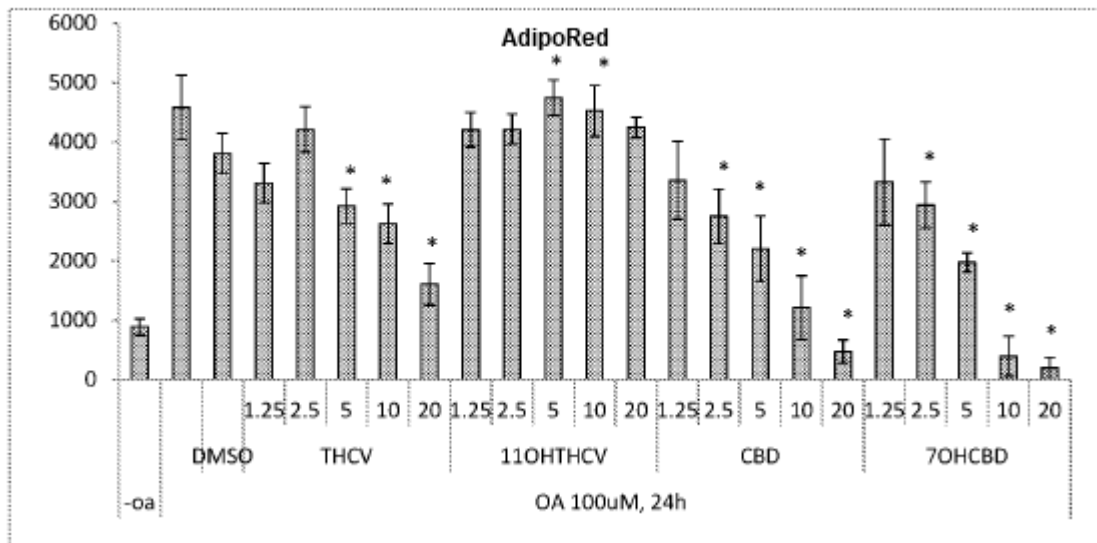


Figura 2. Tinción de AdipoRed de triglicéridos en adipocitos maduros derivados de 3T3-L1

