

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 229**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/05</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/015</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/09</b>	(2006.01)
<b>A61P 25/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 27/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)
<b>C07C 13/32</b>	(2006.01)
<b>C07C 39/23</b>	(2006.01)
<b>C07C 43/23</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2014 PCT/CA2014/000841**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15074137**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2014 E 14864137 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3071193**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento de la inflamación y el dolor ocular**

30 Prioridad:

**20.11.2013 US 201361906694 P**

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

**23.09.2020**

73 Titular/es:

**PANAG PHARMA INC. (100.0%)  
Suite 1300 - 1969 Upper Water Street, Purdy's  
Wharf Tower II  
Halifax, Nova Scotia, B3J 3R7 , CA**

72 Inventor/es:

**LYNCH, MARY y  
KELLY, MELANIE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

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

**ES 2 784 229 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**

Composiciones y procedimientos para el tratamiento de la inflamación y el dolor ocular

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos copendiente núm. 61/906,694 presentada el 20 de noviembre de 2013.

10 **Campo de la divulgación**

La divulgación proporciona composiciones para tratar el dolor y la inflamación ocular.

15 **Antecedentes**

Existe la necesidad de nuevos tratamientos para el dolor y la inflamación. Los agentes actuales son inadecuados y pueden provocar efectos secundarios inaceptables. Además, la creciente preocupación sobre el potencial de adicción con el tratamiento del dolor con opioides apoya aún más la necesidad de nuevas terapias contra el dolor. En particular, existe una necesidad de nuevos productos para el tratamiento del dolor y la inflamación neuropática ocular (por ejemplo, uveítis).

Los cannabinoides se han usado para el tratamiento sistémico del dolor y la inflamación. Todos los cannabinoides vendidos actualmente para uso humano también exhiben los efectos del receptor cannabinoides tipo 1 (CB1) que están asociados con, por ejemplo, hipotermia, catalepsia, hipolocomoción y efectos psicoactivos, por lo que estos agentes están asociados con sedación y otros efectos que pueden limitar, por ejemplo, la dosificación sistémica.

CBD-DMH, como su molécula original, el cannabidiol (CBD), no es psicotrópico y exhibe efectos analgésicos y antiinflamatorios en modelos animales. Sin embargo, se informa que CBD-DMH es más de 10 veces más potente que CBD. La estructura de CBD y CBD-DMH se ha descrito previamente (Mechoulam y otros, 2002; Frideri y otros, 2004).

HU-308 es un compuesto cannabinoide sintético que se une y activa específicamente el receptor CB2 (Hanus 1999). Un derivado enantiomérico de HU-308, llamado HU-433, también es un agonista de CB2. Se ha demostrado que HU-433 tiene una potencia de 2-3 órdenes de magnitud mayor en ambos sistemas *in vitro* e *in vivo*. No muestra psicoactividad. Las estructuras químicas de HU-308 y HU-433 se describieron previamente en la publicación PCT núm. WO 2010/041253.

Sin limitarse a la teoría, la sinergia del cannabis surge de los efectos de la combinación constituyente (Berenbaum 1989; McPartland y Russo 2001; Russo 2011). Esto puede ocurrir a través de varios mecanismos que incluyen, pero sin limitarse a: efectos a múltiples dianas (agonismo o antagonismo del receptor, antioxidante, modulación de la síntesis o metabolismo endocannabinoide endógeno, etc.), propiedades farmacocinéticas mejoradas de los compuestos a través de la modulación de la solubilidad, biodisponibilidad, así como la posible actividad bacteriostática (Wagner y Ulrich-Merzenich 2009; Russo 2011).

La sinergia del CBD con otros fitocannabinoides y terpenoides del Cannabis se ha informado específicamente con respecto al tratamiento de la inflamación y el dolor (Russo, 2011).

Las enfermedades oculares inflamatorias representan un desafío particular debido al dolor y al riesgo de ceguera. Las condiciones abarcan la inflamación intraocular (por ejemplo, uveítis, uveorretinitis, vitreorretinopatía proliferativa) así como la inflamación extraocular, que incluye la inflamación de la córnea y la neuropatología. Colectivamente, la inflamación ocular contribuye significativamente a la incidencia global de la enfermedad ocular cegadora y puede ser una afección debilitante con una alta carga médica y económica para las poblaciones.

55 **Dolor neuropático**

El dolor neuropático se genera por una patología en el sistema nervioso periférico o central. Una gran cantidad de trastornos puede dar lugar a dolor neuropático. Esto puede variar desde nervios que se cortan (trauma o cirugía) o son dañados por virus, lesión isquémica y metabólica o trastornos genéticos complejos, por nombrar algunos. El dolor neuropático puede surgir del daño local a los tejidos neurales así como a los tejidos alejados del trauma inicial y también puede surgir como resultado de una enfermedad inflamatoria crónica. El manejo farmacológico es una de las opciones de tratamiento del dolor más usadas, pero los resultados son pobres donde muchos pacientes obtienen un alivio inadecuado con los agentes disponibles actualmente. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos agentes para el tratamiento del dolor neuropático. El dolor neuropático puede afectar cualquier parte del cuerpo incluido el ojo para el que actualmente no existen tratamientos adecuados.

65 **Inflamación y dolor intraocular**

La uveítis es un término usado para describir cualquier inflamación intraocular dentro del ojo desde la úvea (iris, cuerpo ciliar y coroides) hasta la esclera, la retina y el nervio óptico. Esta implica afecciones tanto infecciosas como no infecciosas, que pueden localizarse dentro del ojo o asociarse con enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias sistémicas, incluidas la artritis reactiva y la esclerosis múltiple. La forma más común de uveítis, la uveítis anterior, con inflamación del iris y el cuerpo ciliar, se asocia además con un dolor considerable y fotofobia (Jabs, Nussenblatt y otros 2005; Lee y Dick 2012). La uveítis no tratada puede conducir a la pérdida permanente de la visión. La uveítis grave se trata agresivamente para mitigar el daño provocado por la inflamación. Sin embargo, los agentes actualmente utilizados, incluidos los corticosteroides "estándar de oro", los antimetabolitos, los modificadores de la respuesta biológica y los agentes antiinflamatorios no esteroideos, provocan efectos secundarios significativos y, en algunos casos, costos crecientes (es decir, biológicos). La búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores eficaces, seguros y/o rentables, adecuados para uso agudo y crónico, ya sea como únicos tratamientos o en combinación, y suministrados localmente al ojo, es una prioridad para el tratamiento futuro de la inflamación ocular para prevenir la pérdida de visión.

#### 15 Inflamación y dolor extraocular

La hiperalgesia neuropática corneal implica un sistema de dolor corneal disfuncional y se asocia con una molestia significativa y una mayor sensibilidad persistente de la córnea (sensibilización periférica) en ausencia de trauma manifiesto o estímulos nocivos (revisado en Belmonte y otros, 2004; Rosenthal & Borsook, 2012; Rosenthal y otros, 2009). La excitación continua de los nervios corneales, después del daño o la irritación corneales, produce la liberación de neuropéptidos y mediadores inflamatorios que aumentan la reacción inflamatoria (inflamación neurogénica) que conduce a la hiperalgesia. Se informa hipersensibilidad corneal, neuroinflamación, dolor y fotofobia en pacientes después de cirugía refractiva y exposición química/tóxica, incluido el uso repetitivo de gotas para los ojos conservadas con cloruro de benzalconio. El dolor neuropático corneal también es una característica patogénica central de los trastornos oculares que se denominan colectivamente ojo seco, e incluyen causas inmunológicas no infecciosas tales como el síndrome de Sjogren y el lupus sistémico, así como infecciones con Herpes Zoster (revisado en Rosenthal & Borsook, 2012; Yawn y otros, 2013). Hasta el 20 % de los adultos de 45 años o más se ven afectados por la enfermedad del ojo seco que representa un importante problema de salud con importantes implicaciones económicas y sociales (revisado en Friedman, 2013; Pflugfelder, 2008). En muchos casos la enfermedad del ojo seco es refractaria al tratamiento y carece de una asociación clara entre síntomas y signos. Por ejemplo, si bien la hiperalgesia corneal inflamatoria, como resultado de la desecación de la superficie ocular (ojo seco por evaporación), es la forma más común de hiperalgesia corneal, muchos pacientes que informan síntomas de ojo seco no muestran signos de ojos secos (lágrimas reducidas), o erosiones corneales superficiales. En contraste, hay otros que tienen una cantidad y calidad de lágrimas insuficientes que son asintomáticos. Además, la enfermedad neuropática a veces puede preceder a las alteraciones en la dinámica de la película lagrimal (Rosenthal & Borsook, 2012; Rosenthal y otros, 2009).

Los agentes actuales prescritos para el dolor neuropático corneal incluyen una amplia variedad de diferentes compuestos tales como pero sin limitarse a, opioides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, bloqueadores de los canales de sodio (anestésicos locales), anticonvulsivos, antidepressivos tricíclicos y agentes GABAérgicos. Sin embargo, la farmacoterapia actual sigue siendo inadecuada y la naturaleza compleja del dolor neuropático corneal se destaca por el hecho de que ningún tratamiento conocido parece ser efectivo para controlar los síntomas. Además, los efectos secundarios indeseables de muchos agentes recetados actualmente limitan la ventana terapéutica para el tratamiento. El dolor neuropático inflamatorio corneal, por lo tanto, representa una necesidad terapéutica no satisfecha significativa (Rosenthal y Borsook, 2012; Rosenthal y otros, 2009).

El CBD, o CBD en combinación con otros moduladores del sistema endocannabinoide, ha demostrado su eficacia clínica y preclínica en el tratamiento del dolor neuropático resultante de una lesión y enfermedad nerviosa (Hsieh y otros, 2011; Ward y otros, 2011; revisado en Rahn y Hohmann 2009; Hohman y Suplita, 2006).

#### 50 **Sumario**

La invención está limitada a las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación proporciona agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores, adecuados para uso agudo y crónico, ya sea como tratamientos únicos o en combinación, y para suministro local al ojo. Los agentes se usan opcionalmente para el tratamiento (incluida la prevención) de la inflamación ocular opcionalmente para prevenir el dolor y la pérdida de visión asociados.

Los cannabinoides, tal como el agonista de CB2, HU-308, CBD y HU-433 poseen propiedades antiinflamatorias. La presente divulgación proporciona procedimientos para administrar ocularmente tales compuestos para reducir la inflamación y el dolor ocular en un sujeto. Los fitocannabinoides no psicotrópicos (por ejemplo, B-cariofileno, cannabidiol [CBD]) y los cannabinoides sintéticos (por ejemplo, HU-433, HU-308, CBD-DMH) son útiles ocularmente para el tratamiento de la inflamación y el dolor neuropático ocular. Sin unirse a la teoría, estos productos están dirigidos al sistema endocannabinoide (ECS). El ECS es una red compleja y sofisticada que forma parte de la red del dolor y de defensa inmunológica del cuerpo. Existen dos tipos principales de receptores en el ECS. Estos son los receptores CB1 y CB2 respectivamente. Los receptores CB2 se encuentran principalmente en los tejidos periféricos

(por ejemplo, piel, ojos, esqueleto, vísceras) y en las células gliales neurales (células de defensa inmunitaria del cerebro). El ECS es una diana útil emergente para tratar el dolor y la inflamación.

5 En consecuencia, la presente invención incluye el tratamiento de la inflamación ocular o el dolor neuropático ocular en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar ocularmente al sujeto un agente cannabimimético en el que el agente cannabimimético es CBD-DMH.

10 En una realización, al sujeto se le administra además un agonista de CB2 y un agente agonista parcial de CB2, en el que el agente agonista de CB2 es HU-433, HU-308 o  $\beta$ -cariofileno; el agente agonista parcial de CB2 es CBD. En una realización adicional de la presente divulgación, al sujeto se le administra CBD-DMH por vía ocular.

15 Una realización de la presente invención es el tratamiento de la inflamación ocular. En una realización, la inflamación ocular es provocada por una enfermedad ocular. En otra realización, la enfermedad ocular provoca inflamación intraocular. Opcionalmente, la enfermedad ocular es uveítis, uveorretinitis o vitreorretinopatía proliferativa. En otra realización, la enfermedad ocular provoca inflamación extraocular. Opcionalmente, la enfermedad ocular es inflamación o neuropatología corneal.

En una realización de la presente divulgación, el sujeto tiene una enfermedad ocular que provoca dolor y pérdida de visión, y el agente reduce el dolor y/o reduce la pérdida de visión.

20 En otra realización de la presente divulgación, es el tratamiento del dolor neuropático ocular. En una realización, el dolor neuropático ocular es dolor neuropático ocular visceral.

En una realización, el sujeto es un mamífero, opcionalmente un ser humano.

25 La presente divulgación también incluye una composición farmacéutica ocular que comprende un agente dirigido a CB2, un agente cannabimimético o una combinación de estos y un portador adecuado para la administración ocular a un ojo, opcionalmente en el que el agente cannabimimético es un agente cannabimimético no psicotrópico.

30 En una realización, la composición comprende además un agonista de CB2 y un agente agonista parcial de CB2, en la que el agente agonista de CB2 es HU-433, HU-308 o  $\beta$ -cariofileno y el agente agonista parcial de CB2 es CBD. En una realización adicional de la presente divulgación, la composición comprende CBD-DMH.

35 En una realización, el portador comprende un liposoma. En otra realización, el portador comprende una formulación de emulsión de aceite en agua.

La presente divulgación también incluye el tratamiento de la inflamación ocular o el dolor neuropático ocular en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar CBD-DMH al sujeto que lo necesita.

40 En una realización, el dolor neuropático es dolor neuropático ocular visceral.

En una realización, la inflamación es provocada por el sujeto que tiene una enfermedad ocular. En una realización, la enfermedad ocular provoca inflamación intraocular. En otra realización, la enfermedad ocular provoca inflamación extraocular. Aún en otra realización, la enfermedad ocular provoca dolor y pérdida de visión, y el agente reduce el dolor y/o reduce la pérdida de visión.

45 En una realización, la enfermedad ocular es uveítis, uveorretinitis o vitreorretinopatía proliferativa. En otra realización, la enfermedad ocular es inflamación corneal o neuropatología.

50 En una realización, el agente agonista de CB2 se suministra localmente al ojo.

En una realización, el sujeto es un mamífero, opcionalmente un ser humano.

55 La presente divulgación también incluye una composición farmacéutica ocular que comprende un agente agonista de CB2 y un portador adecuado para la administración al ojo.

En una realización, el portador comprende un liposoma, opcionalmente un liposoma de ciclodextrina.

### **Breve descripción de los dibujos**

60 La divulgación se describirá ahora en relación con los dibujos en los que:

La Figura 1 muestra imágenes representativas de microscopía intravital (IVM) de microcirculación iridial en ojo de rata que muestra leucocitos adherentes a las 6 horas después de la inyección intravítrea de: (A) solución salina y (B) lipopolisacárido (LPS). Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ . Las flechas indican leucocitos adherentes.

65 La Figura 2 muestra imágenes representativas de microscopía intravital en ojo de rata que muestran leucocitos adherentes a las 6 horas después de la inyección intravítrea de (A) LPS; y (B) LPS + HU-433 (0,1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) que

muestran que la administración de HU-433 mejora los efectos de LPS demostrados por los pocos leucocitos adherentes. Las flechas blancas en la Figura 1A indican leucocitos adherentes.

La Figura 3 es un gráfico de barras de la respuesta a dosis para la administración i.v. (0,001-1 mg/kg) del agonista de cannabinoides, HU-433, sobre la adhesión de leucocitos en vénulas iridiales en animales control y tratados con LPS (n = 3-7 por grupo). Los valores se representan como número de leucocitos adherentes/mm<sup>2</sup> de endotelio y se muestran como media +SEM. P<0,01 para dosis de HU-433 de 0,1 mg/kg.

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra la disminución porcentual promedio de la adhesión de leucocitos al endotelio después de la inyección intravítrea de LPS en presencia de varias dosis del agonista del receptor CB2, HU-433, administradas i.v. a dosis de 0,01-1 mg/kg en comparación con tratamiento de LPS solo (n = 3 - 7 por grupo). Los valores representan las medias.

La Figura 5 muestra imágenes fijas representativas de la microscopía intravital de la microcirculación iridial en ojos CD1 a las 5 horas después de la inyección intravítrea de LPS en los siguientes grupos: (A) control (inyección de solución salina); (B) inyección de LPS + control de vehículo (solución salina + DMSO); (C) LPS + CBD-DMH; y (D) una imagen de un ojo de control con el aumento más bajo. Las flechas indican leucocitos adherentes. Barra de escala = 100  $\mu$ m.

La Figura 6 muestra un gráfico de barras de las mediciones de IVM que examinan el número medio de leucocitos adherentes para los grupos de la Figura 5: Control (n = 5), LPS + vehículo (n = 4), LPS + CBD-DMH (n = 4). \*\* P<0,01 en comparación con el grupo de LPS + vehículo. \*\*\* P<0,001 en comparación con el grupo de LPS + vehículo. Los valores representan la media  $\pm$  SEM.

La Figura 7 muestra los resultados de la evaluación de la retinopatía proliferativa (PVR) en ratones C57Blk6 inyectados con dispasa (0,2 U; 2  $\mu$ l) y tratados con inyecciones ip diarias (7 días) de ligandos de cannabinoides: Vehículo, CBD-DMH (10 mg/kg), CBD (10 mg/kg) y CBD (10 mg/kg) +  $\beta$ -Cariofileno ( $\beta$ C; 20 mg/kg). (A) Evaluación clínica de PVR. La gravedad de la PVR se determinó en una escala de 0-5, con 0 (sin enfermedad) a 5 (ojo completamente regenerado). (B) La puntuación histopatológica en ratones con PVR (o de control) se evaluó mediante la tinción con H&E y se evaluó con el sistema de puntuación de 0 (sin enfermedad) a 4 (tejido ocular gravemente dañado). La evaluación se basó en el grado de daño retiniano, la infiltración de células inflamatorias, la presencia/ausencia de exudados y la formación de granulomas. (C) Recuento promedio de microglías (MG) por sección retiniana/animal. Los datos se muestran como media + SEM \*P<0,05.

La Figura 8 muestra imágenes representativas de la tinción con Iba1 de microglía activada para ratones C57Blk6 inyectados con dispasa (0,2 U; 2  $\mu$ l) y tratados con inyecciones ip diarias (7 días) de ligandos de cannabinoides: imagen superior izquierda: Control + Vehículo; imagen superior derecha: PVR + Vehículo; imagen inferior izquierda: PVR + CBD-DMH; e imagen inferior derecha: PVR + CBD +  $\beta$ C.

La Figura 9 es un gráfico que compara el número de parpadeos con una aplicación tópica ocular de capsaicina 1  $\mu$ M para cauterizado frente a simulación. El aumento del parpadeo en el ojo cauterizado indica un mayor nivel de dolor.

La Figura 10 muestra gráficos que muestran que la cauterización química provoca hipersensibilidad de la córnea a la capsaicina: (A) Número medio de parpadeos registrados durante 1 minuto después de la aplicación tópica ocular única de capsaicina 1  $\mu$ M. El ojo cauterizado mostró un aumento estadísticamente significativo en los parpadeos en comparación con el control simulado (n=6, p<0,05); y (B) Los datos de la Figura 10A se graficaron como puntos individuales para demostrar la hipersensibilización corneal.

La Figura 11 es un gráfico de resultados que muestra que el tratamiento tópico ocular con CBD-DMH al 5 % reduce la hipersensibilidad de un modo comparable al AINE tópico ocular. Número medio de parpadeos registrados durante 1 minuto después de una sola aplicación tópica ocular de capsaicina 1  $\mu$ M. El ojo cauterizado se trató con 3 dosis de vehículo, CBD-DMH al 5 % o AINE tópico (suspensión oftálmica de Napafenac al 0,1 %).

La Figura 12 es un gráfico de resultados que muestra que el tratamiento tópico ocular con CBD-DMH al 5 % elimina la hipersensibilidad de la córnea producida por la cauterización química. Número medio de parpadeos registrados durante 1 minuto después de la aplicación tópica ocular única de capsaicina 1  $\mu$ M. El ojo cauterizado tratado con 3 dosis de CBD-DMH al 5 % eliminó la hipersensibilidad a la capsaicina (n=8, p>0,05).

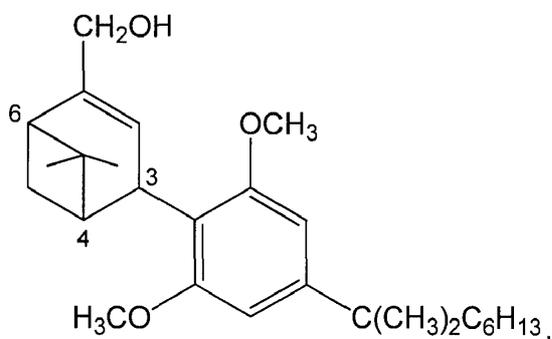
La Figura 13 muestra gráficos que muestran los resultados de estudios *in vitro* de CBD y CBD-DMH: A: Las células HEK 293A transfectadas transitoriamente con hCB2 se trataron con 0,001 - 10  $\mu$ M del compuesto indicado  $\pm$  CBD-DMH o CBD 1  $\mu$ M durante 10 minutos. Después de 10 minutos de tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se usaron en ensayos de transferencia In-cell<sup>TM</sup> para la detección de quinasa regulada por señal extracelular fosforilada y total (ERK) de acuerdo con los procedimientos descritos en Laprairie y otros, (2014 J Biol Chem); B: Las células HEK 293A transfectadas transitoriamente con hCB2 se trataron con 0,001 - 10  $\mu$ M del compuesto indicado  $\pm$  CBD-DMH o CBD 1  $\mu$ M durante 10 minutos. Después de 10 minutos de tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se usaron en ensayos de transferencia In-cell<sup>TM</sup> para la detección de PLC $\beta$ 3 fosforilado y total de acuerdo con los procedimientos descritos en Laprairie y otros, (2014 J Biol Chem); C: Las células reporteras HEK-CRE que expresan establemente luciferasa de luciérnaga bajo el control regulador de un promotor que contiene elementos de respuesta a AMPc en serie y transfectadas transitoriamente con hCB2 se trataron con forskolina 10  $\mu$ M durante 30 minutos seguido de 0,001 - 10  $\mu$ M del compuesto indicado  $\pm$  CBD-DMH o CBD 1  $\mu$ M durante 30 minutos adicionales. Después de 30 minutos de tratamiento, las células se lisaron y se midió la actividad de AMPc a 405 nm (RLU, unidades de luz relativas). Las curvas de concentración frente a respuesta se ajustaron mediante análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism, versión 5.0). Los datos se muestran como la media  $\pm$  S.E.M de 4 experimentos independientes.

**Descripción detallada**

La divulgación se refiere al uso de un agente dirigido a CB2, un agente cannabimimético o una combinación de estos, opcionalmente un agente cannabimimético no psicotrópico para el tratamiento de la inflamación ocular o dolor neuropático ocular en un sujeto. Por ejemplo, la divulgación proporciona el tratamiento de la inflamación ocular o dolor neuropático ocular en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar ocularmente al sujeto que lo necesita un agente dirigido a CB2 o un agente cannabimimético, opcionalmente un agente cannabimimético no psicotrópico. El agente es opcionalmente un cannabinoide, tal como un cannabinoide no psicotrópico o un cannabinoide sintético. En ciertas realizaciones, el fitocannabinoide no psicotrópico es un fitocannabinoide tal como  $\beta$ -cariofileno o cannabidiol [CBD] y el cannabinoide sintético es HU-433, HU-308 o CBD-DMH. Una combinación de dos o más de los anteriores también puede usarse para el tratamiento. El agente dirigido a CB2 es opcionalmente un agente agonista de CB2, un agente agonista parcial de CB2 o un modulador alostérico positivo de CB2. La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas oculares que contienen los agentes dirigidos a CB2 y/o agentes cannabimiméticos tales como agentes cannabimiméticos no psicotrópicos.

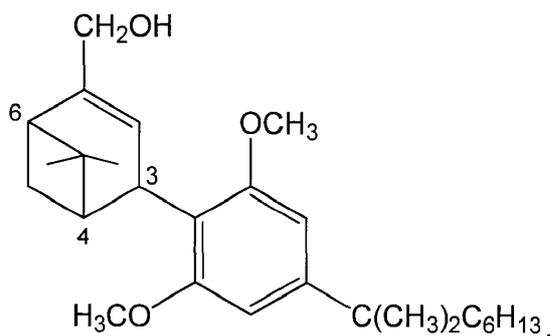
**I. Definiciones**

El término "HU-433" como se usa en la presente memoria se refiere a un agonista cannabinoide sintético de la estructura química:



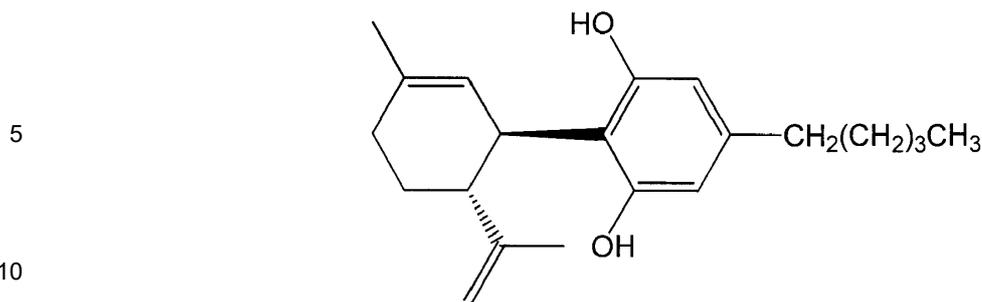
en el que las configuraciones CIP de las posiciones marcadas "3", "4" y "6" en la estructura química anterior son R, R y R, respectivamente.

El término "HU-308" como se usa en la presente memoria se refiere a un agonista cannabinoide sintético de la estructura química:

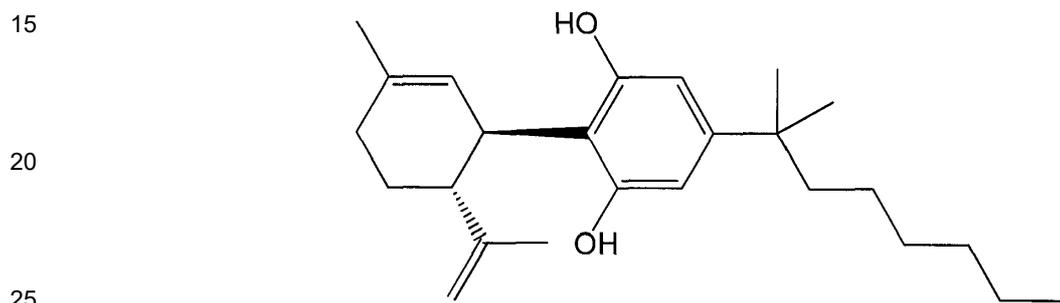


en el que las configuraciones CIP de las posiciones marcadas "3", "4" y "6" en la estructura química anterior son S, S y S, respectivamente.

Los términos "cannabidiol" o "CBD", como se usan en la presente memoria se refieren a un fitocannabinoide no psicotrópico de la estructura química:



El término "CBD-DMH", como se usa en la presente memoria se refiere a un cannabinoide sintético de la estructura química:



Los términos " $\beta$ -cariofileno", " $\beta$ c" o "Beta-C" como se usan en la presente memoria se refieren a un fitocannabinoide no psicotrópico de la estructura química:



45

50

En realizaciones de la presente divulgación, los compuestos descritos en la presente memoria tienen al menos un centro asimétrico. Cuando los compuestos poseen más de un centro asimétrico, pueden existir como diastereómeros. Debe entenderse además que, si bien la estereoquímica de los compuestos puede ser como se muestra en cualquier compuesto dado en la presente memoria, tales compuestos también pueden contener ciertas cantidades (por ejemplo, menos del 20 %, opcionalmente menos del 10 %, opcionalmente menos del 5 %, opcionalmente menos del 1 %) de compuestos que tienen estereoquímica alternativa. Se apreciará que, por ejemplo, se conoce que (+)-CBD y (+)-CBD modificados son psicoactivos; es decir, pueden unirse al receptor CB1.

El término "sujeto" como se usa en la presente memoria incluye todos los miembros del reino animal, incluidos los mamíferos, y se refiere adecuadamente a los seres humanos.

## II. Composiciones farmacéuticas

55

La presente divulgación incluye una composición que comprende un agente dirigido a CB2 y/o un agente cannabimimético tal como un agente cannabimimético no psicotrópico. Tales agentes se formulan adecuadamente en composiciones farmacéuticas oculares para la administración ocular a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración ocular a un ojo.

60

65

Por ejemplo, se determinan el perfil de solubilidad, el coeficiente de partición, el perfil de velocidad de pH,  $pK_a$ , la estabilidad en disolventes farmacéuticos, la interacción fármaco-excipientes y el efecto de la humedad, la temperatura, la luz y el oxígeno en un agente tal como Beta-C, CBD, CBD-DMH u otros CBD modificados. Opcionalmente, todos los excipientes usados en la formulación son "Generalmente considerados como seguros" (GRAS) y están aprobados por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) y Health Canada para el suministro ocular. También se determinan la caracterización biofarmacéutica, el desarrollo, la optimización y la validación de procedimientos analíticos. En consecuencia, la presente divulgación incluye una composición farmacéutica ocular que comprende un agente dirigido a CB2, un agente cannabimimético (tal como un agente

cannabimimético no psicotrópico) o una combinación de estos y un portador adecuado para la administración ocular a un ojo.

5 La selección de un agente adecuado tal como un fitocannabinoide no psicotrópico y/o un derivado de cannabinoide sintético para su uso en las composiciones de la divulgación puede realizarla un experto en la técnica.

10 Por ejemplo, tanto el CBD como el  $\beta$ -cariofileno son útiles como agentes para tratar el dolor y la inflamación; carecen de psicoactividad y tienen un amplio margen de seguridad. También es útil para tratar el dolor y la inflamación el derivado de CBD, dimetilheptilo de CBD (CBD-DMH), un análogo de CBD (también denominado a veces en la presente memoria como un ejemplo de "CBD modificado"). El cannabinoide sintético HU-308 ha demostrado una acción antiinflamatoria útil en modelos preclínicos de uveítis y vitreorretinopatía proliferativa y en endotoxemia experimental, donde disminuye la adherencia de leucocitos intestinales, mejora la perfusión capilar intestinal, reduce la liberación de citocinas proinflamatorias y reduce los niveles de solubilidad de las moléculas de adhesión.

15 Los inventores han obtenido reducción de la inflamación en modelos experimentales de inflamación y dolor ocular. HU-433 es más potente que HU-308 para reducir la inflamación ocular en la uveítis experimental así como para mitigar la inflamación en modelos experimentales de sepsis. Los modelos de dolor neuropático y afecciones inflamatorias dolorosas del ojo se prueban para demostrar una actividad anti-dolor y antiinflamatoria útil de HU-433.

20 Un experto en la técnica apreciará que ciertos agentes pueden estar comprendidos tanto en el término "agente dirigido a CB2" como en el término "agente cannabimimético", ya que esos términos se usan en la presente memoria. Por ejemplo, CBD-DMH es un modulador alostérico positivo de CB2 que es un ejemplo de un agente dirigido a CB2 como se usa ese término en la presente memoria. CBD-DMH también es un ejemplo de un agente cannabimimético, ya que ese término se usa en la presente memoria.

25 En una realización de la presente divulgación, el agente activo en la composición farmacéutica ocular es un agente dirigido a CB2. Como se usa en la presente memoria, el término "agente dirigido a CB2" se refiere a un agente que se une, activa y/o aumenta la activación del receptor CB2. Opcionalmente, el agente dirigido a CB2 es un agente agonista de CB2, un agente agonista parcial de CB2, un modulador alostérico positivo de CB2 o una combinación de estos. Un experto en la técnica apreciará que el término "CB2" como se usa en la presente memoria en términos tales como "agente dirigido a CB2", "agente agonista de CB2", "agente agonista parcial de CB2", "modulador alostérico positivo de CB2" y similar se refiere al receptor CB2.

30 Por ejemplo, el agente agonista de CB2 puede ser HU-433, HU-308 o  $\beta$ -cariofileno. Por ejemplo, el agente agonista parcial de CB2 puede ser CBD. Por ejemplo, el modulador alostérico positivo de CB2 puede ser CBD-DMH.

35 En una realización, el agente dirigido a CB2 o el agente cannabimimético (tal como un agente cannabimimético no psicotrópico) es un cannabinoide. En otra realización, el cannabinoide es un cannabinoide no psicotrópico. Por ejemplo, el cannabinoide no psicotrópico puede ser un fitocannabinoide, un cannabinoide sintético o una combinación de estos.

40 En una realización de la presente divulgación, el fitocannabinoide es  $\beta$ -cariofileno, cannabidiol o una combinación de estos. Por ejemplo, el fitocannabinoide puede ser  $\beta$ -cariofileno. Por ejemplo, el fitocannabinoide puede ser cannabidiol. Por ejemplo, el fitocannabinoide puede ser una combinación de  $\beta$ -cariofileno y cannabidiol.

45 En otra realización de la presente divulgación, el cannabinoide sintético es HU-433, HU-308, un CBD modificado (tal como CBD-DMH) o combinaciones de estos. Por ejemplo, el cannabinoide sintético puede ser HU-433. Por ejemplo, el cannabinoide sintético puede ser HU-308. Por ejemplo, el cannabinoide sintético puede ser un CBD modificado tal como CBD-DMH u otro cannabinoide sintético que sea un CBD modificado con actividad comparable a CBD-DMH.  
50 En una realización, el CBD modificado es CBD-DMH. En otra realización, el cannabinoide sintético es una combinación de HU-433, HU-308 y/o un CBD modificado, opcionalmente CBD-DMH.

55 La selección de un portador adecuado para la administración ocular a un ojo puede ser realizada por un experto en la técnica.

60 Por ejemplo, los fitocannabinoides, incluidos el THC y el CBD, son típicamente poco solubles en agua, amorfos, altamente viscosos e inestables en soluciones ácidas y cuando se exponen al calor, aire y luz (Thumma, Majumdar y otros, 2008). Beta-C y CBD-DMH también comparten la mayoría de estas características. A pesar de estas propiedades THC y CBD así como otros cannabinoides se han formulado para administración sistémica, pero con poca biodisponibilidad oral. Los inventores proporcionan en la presente memoria formulaciones para compuestos tales como Beta-C, CBD, CBD-DMH y HU-433 que pueden actuar, por ejemplo, localmente con un efecto sistémico mínimo o nulo. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas oculares de la presente divulgación pueden ser adecuadas para la administración ocular tópica, periocular o intravítrea a un ojo.

65 La caracterización biofarmacéutica de estos sistemas de suministro de fármacos oculares muestra el alcance de, por ejemplo, la absorción de Beta-C, CBD, CBD-DMH y HU-433 después de la aplicación. Las muestras de plasma se

recolectan y analizan mediante el uso de los procedimientos de ensayo de LC/MS validados para determinar la farmacocinética ocular y la distribución en múltiples especies (incluidos conejos y cerdos). Adicionalmente, la permeabilidad ocular *in vitro* ([www.absorption.com/ocular](http://www.absorption.com/ocular)) y la posible irritación ocular de los productos químicos y el excipiente usado se determinan mediante la prueba de ojo de conejo Draize (Draize, Woodard y otros 1944); el procedimiento estándar para evaluar el potencial de irritación/corrosión ocular de una sustancia con fines de regulación.

El ojo presenta una oportunidad única para el suministro directo localizado de fármacos, que incluye el suministro corneal y transescleral (periocular) de fármacos basados en fitocannabinoides, tales como CBD, CBD modificado (por ejemplo, CBD-DMH) y combinaciones de estos (por ejemplo, CBD + Beta-C).

En las enfermedades oculares dolorosas y/o inflamatorias del segmento anterior, como la uveítis y el dolor neuropático corneal, los fármacos pueden aplicarse en varios vehículos (emulsiones, geles, gotas líquidas, etc.) a la córnea como formulaciones oculares o introducidas a través de la ruta periocular desde un fármaco conjuntival o depósito yuxtaescleral posterior para alcanzar estructuras tisulares del segmento anterior y humor acuoso, y estructuras posteriores (retina, nervio óptico, epitelio pigmentario retiniano, coroides y vítreo), respectivamente (Conway, 2008).

La encapsulación liposómica de cannabinoides y otros compuestos descritos en la presente memoria puede, por ejemplo, mejorar la biodisponibilidad y la eficacia ocular en comparación con la inyección sistémica de fármacos. Por ejemplo, las terapias de fitocannabinoides no psicotrópicas adecuadas para el contacto con la superficie ocular y la aplicación periocular (transescleral) en la enfermedad ocular inflamatoria proporcionan, por ejemplo, una terapia inmunomoduladora útil con menos efectos secundarios que los agentes inmunosupresores utilizados actualmente.

Las formulaciones liposomales son portadores de fármacos establecidos, seguros y eficaces para el suministro de fármacos lipofílicos poco solubles (Agarwal y otros, 2014). Por ejemplo, se han usado en la formulación de fármacos para el suministro prolongado controlado con los aumentos resultantes en la eficacia clínica en comparación con el medicamento solo. Por ejemplo, los liposomas se han usado para suministrar un fitocannabinoide (ver, por ejemplo: Szczesniak y otros, 2006).

Un experto en la técnica apreciará que las formulaciones de liposomas que son útiles para el suministro de un fitocannabinoide tal como  $\Delta^9$ -THC también puede ser útil para la administración de otros compuestos tales como los cannabinoides y otros compuestos descritos en la presente memoria de las composiciones farmacéuticas oculares de la presente divulgación.

En consecuencia, en una realización, el portador adecuado para la administración ocular a un ojo comprende un liposoma.

Opcionalmente, los componentes lipídicos en las formulaciones de liposomas son fosfolípidos y colesterol; los excipientes son tocoferol, antioxidantes, agentes inductores de viscosidad y/o conservantes. La selección de componentes adecuados puede ser realizada por un experto en la técnica.

Por ejemplo, los fosfolípidos pueden ser fosfatidilcolinas, lisofosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilinositoles o combinaciones de estos. Opcionalmente, el fosfolípido comprende, consiste esencialmente en o consiste en dipalmitoilfosfatidilcolina. Opcionalmente, los fosfolípidos se proporcionan en mezclas con agentes modificadores seleccionados del grupo que consiste en colesterol, estearilaminas, ácido esteárico y tocoferoles.

En una realización, el fosfolípido y el colesterol están presentes en una relación molar de 20:1 a 1:1. En otra realización, el fosfolípido y el colesterol están presentes en una relación molar de 10:1 a 5:4. En una realización adicional, el fosfolípido y el colesterol están presentes en una relación molar de 9:1 a 6:4. Opcionalmente, el fosfolípido y el colesterol están presentes en una relación molar de 9:1 o 7:3 o 6:4. Por ejemplo, el fosfolípido y el colesterol están presentes en una relación molar de 9:1. Por ejemplo, el fosfolípido y el colesterol están presentes en una relación molar de 7:3. Por ejemplo, el fosfolípido y el colesterol están presentes en una relación molar de 6:4.

En una realización, la composición farmacéutica ocular contiene el agente dirigido a CB2 y/o el agente cannabimimético en una cantidad de 0,01 % a 10 % en peso, basado en el peso de la composición total.

El uso de una plataforma de suministro combinado con formación de complejos de ciclodextrina e incorporación de liposomas puede evitar el uso de solventes orgánicos para solubilizar compuestos hidrofóbicos y permite atrapar el complejo fitocannabinoide lipofílico en el núcleo acuoso de los liposomas. Por lo tanto, este enfoque no solo puede aumentar la solubilidad y la estabilidad del fármaco, sino que también puede evitar la liberación acelerada del fármaco que puede ocurrir después de la incorporación más habitual del fármaco hidrofóbico en el componente lipídico liposomal (Maestrelli y otros, 2010; 2005). En consecuencia, las composiciones farmacéuticas oculares de la presente divulgación, por ejemplo, aquellas que comprenden CBD, CBD modificado (por ejemplo, CBD-DMH) y combinaciones de CBD también pueden suministrarse mediante el uso de formulaciones liposomales de ciclodextrina en fármaco. Por ejemplo, un enfoque de formulación combinada de formación de complejos de

- 5 ciclodextrina y atrapamiento en liposomas puede usarse para suministrar formulaciones oculares de CBD y combinaciones de CBD. Alternativamente, el uso de la "técnica de doble carga" puede explotarse para cargar el fármaco-ciclodextrina en el núcleo acuoso de los liposomas y el fármaco solo en la fase lipídica de los liposomas proporcionando, por ejemplo, un inicio rápido y una acción prolongada (Maestrelli y otros, 2010). Otra ventaja asociada con el uso de ciclodextrina en la formulación liposomal para el suministro de fitocannabinoides puede ser que la formación de complejos de ciclodextrina puede mejorar la penetración del fármaco en las rutas oculares (Loftsson & Duchene, 2007; Loftsson & Stefansson, 2002). En consecuencia, el portador adecuado para la administración ocular a un ojo comprende un liposoma de ciclodextrina.
- 10 En ciertos estudios *in vivo* de la presente divulgación, se usó una emulsión de aceite en agua para suministrar fitocannabinoides y cannabinoides al ojo. Tales emulsiones comprendían aceite de soja ya sea en una formulación viscosa (>20 % de aceite) o menos viscosa (<20 % de aceite). También se usó un tensioactivo de copolímero en bloques (Pluronic™ 668) en algunas de las formulaciones probadas.
- 15 En consecuencia, en otra realización, el portador adecuado para administración ocular a un ojo comprende una formulación de emulsión de aceite en agua.
- Por ejemplo, la fase oleosa de la formulación de la emulsión de aceite en agua comprende un aceite, que puede ser un aceite vegetal tal como, pero sin limitarse a, aceite de soja. En una realización, el aceite comprende, consiste esencialmente en o consiste en aceite de soja. Opcionalmente, el aceite comprende uno o más aceites de triglicéridos de cadena media (MCT) (es decir, un aceite de triglicéridos en el que la cadena de carbohidratos tiene 8-12 carbonos) o combinaciones de un aceite de MCT y un aceite vegetal. Los aceites de MCT están disponibles comercialmente. Ejemplos de tales aceites de MCT incluyen TCR (nombre comercial de Societe Industrielle des Oleagineaux, Francia para una mezcla de triglicéridos en la que aproximadamente el 95 % de las cadenas de ácidos grasos tienen 8 o 10 carbonos) y MIGLYOL™ 812 (un triéster mixto de glicerina y de ácidos caprílicos y cápricos).
- 20 Las formulaciones de emulsión de aceite en agua de la presente divulgación también comprenden un emulsionante. Los emulsionantes adecuados incluyen un fosfolípido o una mezcla de fosfolípidos. Por ejemplo, los fosfolípidos de yema de huevo purificada, los fosfolípidos de aceite de soja u otras mezclas de fosfolípidos purificados pueden ser emulsionantes útiles.
- 25 Además, las formulaciones de emulsión de aceite en agua de la presente divulgación incluyen un tensioactivo. Por ejemplo, el tensioactivo puede ser un condensado de óxido de alquileo no iónico de un compuesto orgánico que contiene uno o más grupos hidroxilo. Los tensioactivos adecuados incluyen, pero sin limitarse a, TYLOXAPOL™, compuestos vendidos bajo el nombre comercial TWEEN™ y PLURONIC™ F-68 (un copolímero de polioxietileno y polioxipropileno). Los tensioactivos TYLOXAPOL y TWEEN están aprobados por la FDA para uso en seres humanos.
- 30 El componente acuoso de las formulaciones de emulsión de aceite en agua de la presente divulgación es la fase continua de la emulsión y puede ser agua, solución salina o cualquier otra solución acuosa adecuada que pueda, por ejemplo, proporcionar una preparación isotónica y de pH controlado.
- 35 Las formulaciones de emulsión de aceite en agua de la presente divulgación, por ejemplo, usadas en las composiciones farmacéuticas oculares de cannabinoides pueden comprender de 0,5 a 50 % de aceite, de 0,1 a 10 % de emulsionante y de 0,05 a 5 % de tensioactivo. Opcionalmente, para obtener una composición no viscosa, la concentración de la fase no acuosa generalmente no debe exceder el 25 %. Para formulaciones más viscosas esta concentración aumenta. El agente está opcionalmente presente en una cantidad de 0,05 a 5 % en peso de la composición.
- 40 El suministro de fármacos tanto corneal como transescleral en el ojo puede, por ejemplo, evitar las complicaciones asociadas con las inyecciones intraoculares invasivas y también aprovechar la permeabilidad relativamente alta de las estructuras de la esclera a las macromoléculas (Hughes y otros, 2005; Lobo y otros, 2012; Ranta y Urtti, 2006). Además, el uso de soluciones viscosas o nanopartículas y liposomas se ha utilizado de manera efectiva a través tanto de rutas corneales como transesclerales para obtener el suministro sostenido de fármacos en las estructuras oculares durante hasta 2 semanas (Conway, 2008; Souto y otros, 2010; Natarajan y otros, 2012).
- 45 Los inventores demuestran que las terapias de combinación sinérgica con otros constituyentes del cannabis, por ejemplo, las que actúan en los receptores CB2 pueden producir efectos antiinflamatorios y analgésicos.
- 50 Otra realización de la invención se refiere a formulaciones que contienen HU-433, un potente análogo de CB2, CBD-DMH, un potente derivado de CBD y/u otros CBD modificados. Los productos diseñados para tratar el dolor neuropático y la uveítis se proporcionan de manera útil como con las otras realizaciones analizadas en la presente memoria. Estos agentes cannabinoides tales como HU-433 y CBD-DMH pueden proporcionar una acción útil de CB2 para el tratamiento del dolor neuropático ocular y la uveítis.
- 55 En consecuencia, la divulgación proporciona una formulación ocular de cannabinoides (por ejemplo, Beta-cariofileno [también denominado en la presente memoria Beta-C o βc], Cannabidiol [CBD], cannabidiol-dimetilheptilo [CBD-
- 60
- 65

DMH] u otros CBD modificados, HU-308 y HU-433, individualmente o en combinaciones de dos o más de los anteriores) para el tratamiento de enfermedades oculares.

La divulgación también incluye una composición farmacéutica ocular que comprende un agente dirigido a CB2, un agente cannabimimético (tal como un agente cannabimimético no psicotrópico) o una combinación de estos y un portador adecuado para la administración ocular a un ojo de la presente divulgación para su uso para el tratamiento ocular de la inflamación ocular o dolor neuropático ocular en un sujeto. Se apreciará que las realizaciones para tales composiciones farmacéuticas oculares para su uso se pueden variar como se analiza en la presente memoria para las composiciones farmacéuticas oculares de la presente divulgación y los procedimientos y usos de la presente divulgación, según sea apropiado.

Por ejemplo, en una realización, la divulgación proporciona una formulación de fitocannabinoides (por ejemplo, derivados de CBD, o una combinación de CBD +  $\beta$ -cariofileno) para la administración a la córnea y/u otros depósitos oculares para el tratamiento de enfermedades oculares que provocan inflamación en un sujeto, tal como intraocular (uveítis) o extraocular (hiperalgesia neuropática corneal).

Las terapias oculares de combinación de CBD o derivados de CBD con  $\beta$ -cariofileno, un agonista de CB<sub>2</sub>, puede mejorar la eficacia del CBD en el tratamiento de la enfermedad ocular inflamatoria y neuropática.

### III. Procedimientos y usos

Sin estar unidos por la teoría, los cannabimiméticos, opcionalmente los cannabimiméticos que se dirigen a CB2, tales como los fitocannabinoides que se dirigen a CB2 (por ejemplo, CBD, que es un agonista parcial de CB2) y los cannabinoides sintéticos que se dirigen a CB2 (por ejemplo, CBD modificados tales como CBD-DMH que es un modulador alostérico positivo de CB2) puede, por ejemplo, ser efectivo para reducir los marcadores de inflamación. Por ejemplo, tales compuestos pueden reducir la señalización de citocinas proinflamatorias, el estrés oxidativo y/o inhibir las células inmunitarias activadas (microglía); todos los cuales también son características del daño tisular visto en modelos experimentales de inflamación ocular aguda y crónica, y que se exacerban en animales que carecen de receptores CB2.

Los efectos oculares antiinflamatorios e inmunomoduladores del CBD en modelos experimentales se lograron con dosis de 5-10 mg/kg de CBD, que es comparable a la de las dosis terapéuticas utilizadas en seres humanos para aliviar el dolor neuropático y la espasticidad asociada con la esclerosis múltiple (Oreja-Guevara, 2012a,b). Los inventores proporcionan los primeros estudios que abordan específicamente el uso de CBD para la inflamación y el dolor ocular.

Existe una ventana terapéutica sustantiva para la eficacia y la excelente tolerabilidad, respectivamente, para el fitocannabinoide, CBD, en el tratamiento de enfermedades oculares inflamatorias. Sin limitarse a la teoría, el CBD parece ejercer sus acciones a través de la modulación del sistema endocannabinoide, así como dianas del sistema no endocannabinoide que pueden modular colectivamente las vías de señalización celular implicadas en la inflamación y el dolor. El CBD no es psicotrópico y su farmacología versátil subraya su utilidad para las combinaciones con otros agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores, incluido el terpenoide,  $\beta$ -cariofileno, que actúa en CB2. Por lo tanto, estas propiedades farmacológicas del CBD pueden, por ejemplo, proporcionar una combinación útil de productos fitoterapéuticos (es decir, CBD y/o derivados de CBD (también denominados en la presente memoria CBD modificados) +  $\beta$ -cariofileno) para acciones mejoradas. La plataforma de administración de esta formulación se basa opcionalmente en formulaciones liposomales, optimizadas para el ojo.

La invención proporciona la primera divulgación del  $\beta$ -cariofileno usado en el ojo en seres humanos. El  $\beta$ -cariofileno es útil, por ejemplo, para la terapia de combinación con CBD para la enfermedad inflamatoria y neuropática ocular. Una ventaja adicional puede ser, por ejemplo, que las propiedades fisicoquímicas del  $\beta$ -cariofileno sean similares a las del CBD de modo que ambos compuestos se suministren fácilmente juntos mediante el uso del fármaco propuesto, por ejemplo en preparaciones de ciclodextrina o liposomas.

Los inventores demuestran en la presente memoria las propiedades antiinflamatorias y analgésicas de nuevas formulaciones oculares tales como las que comprenden CBD y otros cannabinoides en modelos experimentales de enfermedad inflamatoria ocular. Por lo tanto, la divulgación proporciona procedimientos de tratamiento de la inflamación mediante la administración de cannabinoides al ojo de un sujeto.

Los modelos experimentales de uveítis e hiperalgesia corneal se usan para demostrar el suministro local de formulaciones de CBD (por ejemplo, CBD, combinación de CBD +  $\beta$ -cariofileno) y cannabinoides (CBD-DMH, HU-308, HU-433) para el tratamiento de la inflamación y dolor ocular. Estos modelos están establecidos y los inventores tienen una experiencia considerable con su uso para estudios farmacológicos de diversos agentes, incluidos los cannabinoides, así como estudios preclínicos sobre el suministro y tolerabilidad de fármacos cannabinoides oculares.

En consecuencia, la presente divulgación incluye el tratamiento de la inflamación ocular o el dolor neuropático ocular en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar ocularmente al sujeto que lo necesita un agente dirigido a CB2, un agente cannabimimético o una combinación de estos. Opcionalmente, se incluye el tratamiento de la inflamación ocular. En otra realización, se incluye el tratamiento del dolor neuropático ocular. En una realización adicional, se incluye el tratamiento de la inflamación ocular y el dolor neuropático ocular.

La presente divulgación también incluye un uso ocular de un agente dirigido a CB2, un agente cannabimimético o una combinación de estos para el tratamiento de inflamación ocular o dolor neuropático ocular en un sujeto que lo necesita. Opcionalmente, el uso es para el tratamiento de la inflamación ocular. En otra realización de la divulgación, el uso es para el tratamiento del dolor neuropático ocular. En una realización adicional, el uso es para el tratamiento de la inflamación y el dolor ocular neuropático ocular.

La presente divulgación incluye además el uso de un agente dirigido a CB2, un agente cannabimimético o una combinación de estos para la preparación de un medicamento ocular para el tratamiento de la inflamación ocular o el dolor neuropático ocular en un sujeto que lo necesite. Opcionalmente, el uso es para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la inflamación ocular. En otra realización, el uso es para la preparación de un medicamento para el tratamiento del dolor neuropático ocular. En una realización adicional, el uso es para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la inflamación ocular y el dolor neuropático ocular.

En una realización, el dolor neuropático ocular es dolor neuropático ocular visceral. En otra realización, la inflamación ocular es provocada por el sujeto que tiene una enfermedad ocular.

En una realización, la enfermedad ocular provoca inflamación intraocular. Opcionalmente, la enfermedad ocular es uveítis, uveorretinitis o vitreorretinopatía proliferativa. En otra realización, la enfermedad ocular provoca inflamación extraocular. Opcionalmente, la enfermedad ocular es inflamación o neuropatología corneal.

En otra realización, la enfermedad ocular provoca dolor y pérdida de visión, y el agente reduce el dolor y/o reduce la pérdida de visión.

La dosificación del agente dirigido a CB2 y/o el agente cannabimimético (tal como el agente cannabimimético no psicotrópico) puede variar dependiendo de muchos factores tales como las propiedades farmacodinámicas de estos compuestos, el modo de administración, la edad, la salud y el peso del sujeto, la naturaleza y el alcance de la inflamación ocular o el dolor neuropático ocular, la frecuencia del tratamiento, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, y la tasa de depuración del compuesto en el sujeto a tratar. Un experto en la técnica puede determinar la dosificación apropiada en función de los factores anteriores. Por ejemplo, el agente dirigido a CB2 y/o el agente cannabimimético tal como un fitocannabinoide (por ejemplo, CBD, CBD +  $\beta$ -cariofileno) y formulaciones oculares sintéticas que contienen cannabinoides (por ejemplo, HU-433, HU-308, CBD-DMH) pueden suministrarse a través de la córnea y las vías transesclerales (perioculares) a varias dosis, opcionalmente 0,1-10 % p/v.

Los regímenes de dosificación incluyen tratamientos de dosis única así como dosificación múltiple. El agente dirigido a CB2 y/o el agente cannabimimético pueden administrarse inicialmente en una dosis adecuada que puede ajustarse según sea necesario, dependiendo de la respuesta clínica.

Opcionalmente, el agente se administra tópicamente al ojo; es decir, el agente es para uso tópico ocular. En otra realización, el agente se administra intravítreamente al ojo; es decir, el agente es para uso intravítreo. En una realización adicional de la presente divulgación, el agente se administra periocularmente al ojo; es decir, el agente es para uso periocular.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente divulgación:

### **Ejemplos**

Estos datos se han generado mediante el uso de varios modelos animales diferentes como se explica en las secciones de procedimientos. Estos pueden dividirse en modelos de inflamación ocular y modelos de dolor neuropático ocular.

#### **Ejemplo 1: Efectos del agonista del receptor CB2, HU-433 sobre la uveítis inducida por endotoxina**

##### **I. Propósito**

Este estudio demostró el papel antiinflamatorio del agonista del receptor cannabinoide 2 (CB2R), HU-433, en la inflamación intraocular en un modelo de uveítis inducida por endotoxina (EIU) en ratas.

##### **II. Introducción**

Histología tisular e inmunohistoquímica: La inflamación ocular se acompaña de edema tisular, migración de células inmunitarias a los sitios de lesión y patología. La histología permite acceder a la estructura del tejido para el edema y la disolución estructural, junto con evidencia de extravasación plasmática (indicativo de cambios patológicos en la estructura microvascular). El uso de anticuerpos contra las proteínas expresadas por las células inmunitarias, incluidos los neutrófilos, los macrófagos y las microglías, permite la identificación de los tipos de células inmunitarias reclutados en los sitios de daño tisular en los tejidos oculares anterior y posterior.

Imagen intravital para la medición cuantitativa en tiempo real de la adhesión y migración de leucocitos: El daño o lesión del tejido produce alteraciones en el flujo sanguíneo capilar y la estructura microvascular, así como la adhesión y transmigración de células inmunitarias (leucocitos) del vaso sanguíneo para acumularse en el sitio de la lesión del tejido (inflamación). Esta es una respuesta del huésped necesaria para resolver la lesión, sin embargo, el escalado de la respuesta inflamatoria o las respuestas inflamatorias persistentes pueden provocar daños en los tejidos (Ley, Laudanna y otros 2007). La cuantificación de los leucocitos que se adhieren a las células que recubren la luz de los vasos sanguíneos (endotelio) se lleva a cabo dinámicamente en la microvasculatura iridial mediante microscopía intravital para visualizar directamente en tiempo real o histológicamente en la retina post mortem, la adhesión de los leucocitos y la diapédesis.

Evaluación de marcadores proinflamatorios (citocinas, moléculas de adhesión): Los niveles de moléculas de adhesión y mediadores proinflamatorios (citocinas) se analizan mediante inmunoensayo de los niveles de proteína respectivos para proporcionar una evaluación del estado inmunitario.

Enfoques tales como histología/patología tisular, MIV y análisis de citocinas proporcionan una medida de la respuesta inflamatoria. Los fármacos inmunomoduladores y antiinflamatorios reducen la adhesión de leucocitos y los marcadores proinflamatorios y el daño tisular y promueven la resolución de la inflamación (Sanz y Kubes 2012).

### III. Materiales y procedimientos

El modelo de uveítis inducida por endotoxina (EIU) es un modelo animal ampliamente usado de uveítis derivada de bacterias humanas, que implica la inflamación del tracto uveal. El tracto uveal comprende la capa media del ojo, que incluye el iris, el cuerpo ciliar y la úvea.

Se indujo EIU en ratas Lewis macho mediante inyección intravítrea de 100 ng de lipopolisacárido (LPS, *Escherichia coli*) en solución salina. Se administraron tratamientos del agonista del receptor cannabinoide 2 (CB2R), HU-433, en presencia y ausencia del antagonista selectivo, AM630. Los tratamientos con cannabinoides implicaron HU-433 intravenoso (i.v.) (0,001-1 mg/kg), AM630 (2,5 mg/kg i.v.) y AM630 + HU-433, administrados 15 minutos después de la inyección intravítrea de LPS. Se usó microscopía intravital (IVM) para observar la adhesión leucocito-endotelial cada hora después de la inducción de EIU durante un período de 6 horas.

### IV. Resultados y discusión

Los datos de la Figura 1 se recolectaron de experimentos mediante el uso de un modelo animal de inflamación ocular llamado uveítis inducida por endotoxina. Se ha demostrado que este modelo provoca inflamación dentro del ojo. El nivel de inflamación se cuantifica contando el número de leucocitos adherentes en la microcirculación del iris. Los leucocitos deben adherirse a la microvasculatura durante más de 30 s (medidos como leucocitos adherentes por mm<sup>2</sup>). Las imágenes se realizaron en un mínimo de 4 cuadrantes dentro del ojo, 4 vasos cada cuadrante, 6 horas después de que se indujera la inflamación.

La Figura 1A es una imagen representativa de la microcirculación del iris después de una inyección de solución salina en el ojo (control); los leucocitos son los puntos blancos dentro de la vasculatura negra. La Figura 1B es una imagen representativa de la microcirculación del iris después de la inyección de lipopolisacárido (LPS) en el ojo. LPS es un agente inflamatorio derivado de bacterias gramnegativas. El LPS provoca un aumento significativo en el número de leucocitos que se adhieren a la vasculatura en comparación con la inyección de solución salina.

HU-433 a dosis de 0,01 y 0,1 mg/kg (Figuras 2-4) redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) la adhesión leucocito-endotelial (inflamación) 6 horas después de la inducción de EIU. Esta disminución en la adhesión de leucocitos fue abolida cuando los animales se trataron con el antagonista de CB2R AM630 antes del tratamiento con HU-308 en EIU. El uso del antagonista de CB2R solo provocó un aumento significativo en el número de leucocitos adherentes a la microvasculatura ( $p < 0,01$ ).

La Figura 2A es una imagen representativa de la inflamación dentro del iris que puede compararse con el tratamiento posterior con HU-433 (Figura 2B).

La figura 3 es la curva de respuesta a la dosis de HU-433 usada para tratar la inflamación ocular en el presente estudio. Se demostró (Figura 3) que HU-433 (0,1 mg/kg) pudo reducir significativamente ( $p < 0,05$ ) el número de leucocitos adherentes en la microcirculación del iris. Estos datos también se representan como la disminución promedio de los leucocitos adherentes en comparación con LPS solo con diferentes dosis de HU-433 (Figura 4).

La activación de CB2R mediante el uso de cannabinoides, HU-433 reduce el reclutamiento de leucocitos al iris y disminuye la liberación local de mediadores inflamatorios durante la EIU aguda. Los medicamentos dirigidos al CB2R son útiles como agentes terapéuticos para la uveítis y la disminución de la inflamación ocular aguda.

## 5 **Ejemplo 2: Efectos de la administración del cannabinoide sintético, CBD-DMH sobre la uveítis inducida por LPS**

### I. Materiales y procedimientos

10 Compuesto analizado: CBD-DMH

Sujetos: Se examinaron dos grupos experimentales de EIU diferentes en ratones BALB/c:

15 Grupo (A): Microscopía intravital (IVM) a las 5 horas después de la inyección intravítrea de solución salina (control)

Grupo (B): IVM a las 5 horas después de la inducción de EIU y la administración i.v. del control de vehículo farmacológico (1 vez, 0,2 ml de etanol al 30 % en solución salina justo después de la inyección intravítrea)

20 Grupo (C): IVM a las 5 horas después de la inducción de EIU y la administración i.v. de cannabinoides (1 vez, 0,2 ml 10 mg/kg de CBD-DMH justo después de la inyección intravítrea).

25 Inyección intravítrea de LPS para inducir uveítis: La cepa de animales elegida para estos experimentos se basó en las pruebas preliminares realizadas y las literatura publicada (ver, por ejemplo: Toguri y otros, 2014). La cepa de ratones elegida fue BALB/c y se usaron ratas Lewis. Los animales se anestesiaron antes de la inducción de la uveítis. Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 5 % en oxígeno al 100 %. Las ratas se anestesiaron con 65 mg·kg<sup>-1</sup> de pentobarbital sódico. La profundidad de la anestesia se controló mediante una prueba de pellizco del dedo del pie. Se inmovilizó la cabeza del animal y se pinchó la esclera del ojo izquierdo con una aguja de calibre 30 en el cuadrante dorsonasal aproximadamente al nivel del ecuador. Los ratones recibieron un total de 250 ng de LPS (E. coli 026:B6; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canadá) en 2 µl de solución salina al 0,9 % estéril. Las ratas recibieron un total de 100 ng de LPS en 5 µl de solución salina estéril al 0,9 %. Las inyecciones intravítreas se realizaron bajo control microscópico con una jeringa Hamilton (Hamilton Company, Reno, Nevada, Estados Unidos), con una aguja 30 G1/6. Para evitar tocar la lente o provocar cualquier daño en el ojo, la punta de la aguja se dirigió hacia el polo posterior y solo la punta biselada (2-3 mm) ingresó a la cavidad vítrea. La aguja se mantuvo en su lugar después de 35 la inyección durante 5 segundos para evitar fugas del LPS desde el sitio de inyección (esclerostomía). La esclerostomía se cerró con adhesivo tisular para evitar cualquier fuga. Los animales con sangrado o hinchazón después de la inyección fueron excluidos del estudio.

40 Obtención de imágenes in vivo: La técnica de microscopía intravital (IVM) se usó para investigación *in vivo* del reclutamiento de leucocitos. El video microscopio de fluorescencia intravital se centró en la microcirculación iridial, lo que permitió obtener imágenes de las interacciones leucocitos-endoteliales. En toda la IVM, la cabeza del animal se mantuvo estacionaria. El iris se dividió en cuatro cuadrantes iguales dibujando dos líneas superficiales, a lo largo y a lo ancho. IVM se llevó a cabo en cada uno de estos cuadrantes. En cada video, se observó el reclutamiento de leucocitos y se registró durante 30 segundos cada uno. El análisis de los datos se realizó fuera de línea.

45 Análisis de IVM: Se grabaron varios videos de cada cuadrante durante 30 segundos. La adhesión de leucocitos fue el parámetro analizado. Los leucocitos adherentes se definieron como el número de leucocitos durante el período de observación de 30 s que no se separaron de la superficie endotelial cilíndrica. El número de leucocitos adherentes dentro de cada segmento del vaso se calculó midiendo el diámetro y la longitud del segmento del vaso estudiado, 50 asumiendo una geometría cilíndrica del vaso sanguíneo. Los leucocitos adherentes se expresaron como el número de células por mm<sup>2</sup> de superficie endotelial.

55 Análisis de datos de IVM: Los resultados se analizaron mediante el uso del software Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos). Todos los datos se expresan como medias ± error medio estándar (SEM). Se evaluó la importancia de los grupos mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con una prueba post hoc de Dunnett, comparando todos los grupos experimentales con el grupo tratado con vehículo. La importancia se consideró a p<0,05.

### 60 II. Resultados y discusión

65 La Figura 5 muestra imágenes representativas de la microvasculatura y los leucocitos adherentes: (A) inyección de solución salina; (B) inyección de LPS; y (C) una disminución en el número de leucocitos adherentes con CBD-DMH. La inflamación se cuantificó mediante la medición de leucocitos adherentes al endotelio 6 horas después de la inyección de LPS (Figura 5D).

La Figura 6 muestra un gráfico de barras de mediciones de IVM que examinan el número medio de leucocitos adherentes para los grupos de la Figura 5.

**Ejemplo 3: Efectos de la administración de CBD-DMH, CBD o una combinación de CBD+βC en un modelo PVR-dispasa de PVR**

I. Antecedentes

Después de una cirugía de desprendimiento de retina o un traumatismo ocular, del 5-10 % de los pacientes pueden desarrollar vitreorretinopatía proliferativa (PVR) (Yanoof y Duker, 2009). Actualmente no hay tratamientos no quirúrgicos para PVR que puedan clasificarse en 3 etapas principales: una etapa inflamatoria con activación y migración de células inmunitarias, incluidos neutrófilos, macrófagos y microglía, una etapa proliferativa temprana y una etapa proliferativa tardía. En la etapa inflamatoria temprana, el trauma ocular puede provocar desgarros y pliegues de la retina y desprendimiento de retina. La falta de resolución de la inflamación da como resultado la proliferación y remodelación de astrocitos, la formación de membrana epirretiniana y el desprendimiento de retina con fibrosis resultante.

Pueden generarse lesiones experimentales de PVR mediante el uso de inyecciones intravítreas de la enzima proteolítica, dispasa (3 µl de 0,1 - 0,3 U/µl de dispasa). Esto da como resultado una respuesta inflamatoria crónica con el desarrollo de desgarros y pliegues de la retina dentro de 1-3 semanas después de la inyección (técnica modificada de Frenzel y otros, 1998). El modelo Dispasa PVR proporciona un modelo útil para la inflamación ocular posterior crónica, la astrogliosis y la fibrosis.

II. Materiales y procedimientos

Animales: Se usaron ratones machos C57Blk/6 (20-25 g; Charles Rivers, QC, Canadá) para los experimentos. Los animales fueron alojados en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con acceso ilimitado a alimentos y agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los estándares y procedimientos del Consejo Canadiense de Cuidado Animal y el comité de cuidado animal de la Universidad Dalhousie.

Inyecciones intravítreas: La PVR se indujo en animales C57Blk/6 con una inyección intraocular de dispasa (Sigma), una proteasa neutra que escinde la membrana basal, en el cuadrante dorsolateral del ojo izquierdo. La dispasa se diluyó a la concentración de 0,2 U/µl en una solución salina de Ringer estéril. Se realizaron inyecciones intraoculares (2 µl) bajo un microscopio con una jeringa Hamilton unida a una aguja de 30 G. Los animales de control recibieron 2 µl de solución salina Ringer estéril.

Tratamiento con fármaco: Los animales se trataron con inyecciones intraperitoneales diarias de ligandos cannabinoides: CBD-DMH (10 mg/kg), CBD (10 mg/kg) y CBD (10 mg/kg) + β-Cariofileno (20 mg/kg), durante un período de siete días. Una semana después de la inducción de PVR, los ratones se sacrificaron por una sobredosis i.p. de pentobarbital de sodio (250 mg/kg), los ojos fueron inoculados y preparados para la tinción histológica o inmunohistoquímica.

Puntuación clínica: La morfología externa de los ojos se evaluó mediante puntuación clínica a los 7 días después de la inyección intraocular. La gravedad de la PVR se determinó en una escala de 0-5, con 0 (sin enfermedad) a 5 (ojo completamente degenerado) como se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1: Puntuación clínica para la evaluación de PVR murina experimental**

Etapa clínica	Descripción
0	Sin signos clínicos de la enfermedad.
0,5	Vasos del iris dilatados
1	Vasos sanguíneos hinchados en el iris; miosis anormal esporádica
2	Pupila parcialmente cubierta con fibrina, cámara anterior nebulosa
3	Exudado en cámara anterior, pero pupila aún visible
4	Exudado con hemorragia (cámara anterior opaca), pupila completamente oscurecida
5	Sin exudado en la cámara anterior, configuración pupilar anormal, iris degenerado

Los datos se analizaron mediante análisis ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Kruskal-Wallis. p<0,05 se consideró significativo.

**Histología:** La morfología de la anatomía interna del ojo se visualizó mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E). La gravedad de la enfermedad se calificó con un microscopio óptico y se evaluó con el sistema de puntuación de 0 (sin enfermedad) a 4 (tejido ocular gravemente dañado) como se detalla en la Tabla 2.

5

**Tabla 2: Puntuación de histopatología para PVR murina experimental**

10

15

20

Histopatología	Descripción
0	Sin enfermedad, arquitectura retiniana normal
0,5	Infiltración celular inflamatoria leve en la retina, sin daño tisular
1	Infiltración, pliegues de la retina y desprendimientos focales de la retina, pocos granulomas pequeños en coroides y retina
2	Infiltración moderada, pliegues de la retina, desprendimiento, daño focal de fotorreceptores, granulomas, perivaculitis
3	Infiltración de moderada a marcada, daño extenso de fotorreceptores. Exudado con hemorragia (cámara anterior opaca), pupila completamente oscurecida
4	Inflamación severa y/o daño retiniano de espesor completo con exudados serosos y neovascularización subretiniana, lesiones granulomatosas grandes

25

30

Immunohistoquímica: Los ojos se inocularon y se sumergieron en paraformaldehído (PFA) al 4 % en tampón fosfato 0,1 M durante 24 h. A continuación, los ojos se transfirieron a sacarosa al 30 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para la crioprotección. Se cortaron secciones sagitales simétricas (14 µm) de todo el ojo en un microtomo de congelación y se recolectaron en los portaobjetos de microscopio. Para la tinción inmunohistoquímica, los portaobjetos se lavaron en PBS (3x15 min), y a continuación se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con suero de cabra normal al 10 % (Vector Labs). Esta etapa fue seguida por la incubación durante la noche de secciones, a 4 °C, con los anticuerpos primarios: anti Iba1 de conejo (Wako Chemicals, CA; 1:100), anti-proteína ácida fibrilar glial de conejo (GFAP; marcador de astrocitos) (Chemicon, Temecula, CA 1:1.000). Se usaron anticuerpos etiquetados con fluorescencia anti-IgG de conejo de cabra CY<sup>TM3</sup> (1:500, Jackson ImmunoResearch Laboratories) para la visualización de Iba1 y GFAP. Los recuentos de microglía se realizaron bajo microscopía de fluorescencia.

35

III. Resultados y discusión

40

La vitreorretinopatía proliferativa (PVR) es un modelo de inflamación ocular que se produce con cambios externos e internos en el ojo. Esta inflamación es provocada por la inyección intraocular de dispasa. Se probaron varios tratamientos diferentes con cannabinoides en este modelo. La inflamación se cuantificó por puntuación clínica (Figura 7A), histología (Figura 7B) e inmunohistoquímica (Figura 7C). La puntuación clínica, la histología y la inmunohistoquímica se explican en la presente memoria bajo el procedimiento PVR.

45

CBD-DMH disminuyó significativamente las puntuaciones clínicas y las puntuaciones histológicas recibidas en el modelo de PVR, lo que indica su capacidad para reducir la inflamación ocular. La inmunohistoquímica se usó para estudiar la activación de las células inmunitarias (microglía) en la retina.

50

55

CBD-DMH, CBD solo y CBD + βc pudieron disminuir el número de células inmunitarias activadas (Figura 7C). Si bien no desea estar limitado por la teoría, esto podría proporcionar evidencia de un mecanismo potencial de cómo CBD-DMH, CBD y CBD + βc disminuyen la inflamación.

Un aumento en la microglía Iba1+ se asocia con neuroinflamación. Iba1 es específico de MG (Daisuke y otros, 2001). Mediante el uso de la etiqueta inmunohistoquímica selectiva, Iba1, para las células inmunitarias retinianas activadas, microglía, puede verse que los animales de control tratados sin patología retiniana tratados con vehículo farmacológico, existe un etiquetado muy escaso para las células positivas para Iba1 (Iba1+) (Figura 8, arriba izquierda). En contraste, en animales con PVR experimental, las retinas tratadas con vehículo tienen una extensa tinción con Iba1+ para microglía activada (Figura 8, arriba a la derecha). El marcaje con Iba1+ se reduce sustancialmente en animales con PVR experimental y tratados con CBD-DMH (Figura 8, abajo a la izquierda) y también (pero en menor medida) con CBD + beta-C (Figura 8, abajo a la derecha). Estos resultados indican que el derivado sintético de cannabidiol CBD-DMH y CBD + beta-C son capaces de reducir las células inmunitarias activadas que contribuyen a la respuesta inflamatoria y la patología en PVR.

60

**Ejemplo 4: Ejemplo 3: Efectos de la administración de CBD-DMH en la hiperalgesia corneal**

65

I. Antecedentes

El modelo de cauterización química de la inflamación corneal y la hiperalgesia es un modelo establecido para observar la sensibilización y el dolor corneales. La cauterización química de la córnea murina mediante el uso de

nitrate de plata t3pico produce inflamaci3n inespec3fica seguida de sensibilizaci3n conductual cr3nica a est3mulos qu3micos posteriores (modificado de Wenk y Honda, 2003).

5 La prueba de parpadeo del reflejo corneal proporciona una evaluaci3n conductual de la sensibilizaci3n corneal y la hiperalgesia (umbral de dolor disminuido). La hiperalgesia (definida como una mayor capacidad de respuesta a est3mulos dolorosos) se mide cuantificando el n3mero y la frecuencia de una respuesta protectora de parpadeo en el ojo tratado (parpadeo inducido por est3mulo) en relaci3n con los ojos no sensibilizados de control (Wenk y Honda 2003). Los agentes antiinflamatorios y los agentes que act3an en las dianas de los nervios nociceptivos pueden reducir el desarrollo de la sensibilizaci3n corneal y la actividad hiperalg3sica (respuesta de parpadeo protector reducida en respuesta al irritante nocivo).

10 II. Resultados y discusi3n

15 Mediante el uso de un modelo caracterizado por Wenk & Honda, 2003, se us3 la cauterizaci3n qu3mica mediante la aplicaci3n de nitrate de plata a la c3rnea para crear un modelo de hipersensibilidad corneal. La hipersensibilidad se determin3 evaluando los parpadeos a una aplicaci3n t3pica ocular de capsaicina 1 μM. La respuesta de parpadeo es una medida del nivel de hiperalgesia corneal. El aumento del parpadeo en respuesta a la capsaicina en un ojo cauterizado indica un mayor nivel de dolor (Figura 9). Hubo un aumento significativo en los parpadeos a capsaicina 1 μM en el ojo qu3mico cauterizado en comparaci3n con el ojo de control simulado (Figura 10). La aplicaci3n t3pica ocular del AINE Nevanac™ (suspensi3n oft3lmica de Nepafenac) elimin3 esta hipersensibilidad (Figura 11).

20 La evaluaci3n de CBD-DMH demostr3 que este elimina a3n m3s esta hipersensibilidad, mostrando una disminuci3n estad3sticamente significativa de parpadeos a capsaicina 1 μM cuando est3 en el ojo qu3mico cauterizado en comparaci3n con el ojo de control simulado (Figura 12). Beta-C tambi3n se ha probado en este modelo y parece que tambi3n produce una reducci3n de la hiperalgesia.

25 Sumario de los Ejemplos 1-4

30 La Tabla 3 proporciona un sumario de los modelos, tratamientos y dosis usados en los estudios descritos anteriormente de la divulgaci3n.

Tabla 3

Figura	Modelo	Tratamiento	Dosis
Figura 1	Uve3tis inducida por endotoxina	LPS + HU-433	1, 0,1, 0,01, 0,001 mg/kg
Figura 2	Uve3tis inducida por endotoxina	LPS + HU-433	0,1 mg/kg
Figura 3	Uve3tis inducida por endotoxina	LPS + HU-433	1, 0,1, 0,01, 0,001 mg/kg
Figura 4	Uve3tis inducida por endotoxina	LPS + HU-433	1, 0,1, 0,01, 0,001 mg/kg
Figura 5	Uve3tis Experimental	LPS+CBD-DMH	
Figura 6	Uve3tis Experimental	LPS+CBD-DMH	
Figura 7	PVR	CBD-DMH	10 mg/kg
		CBD	10 mg/kg
		CBD+βC	10 mg/kg + 20 mg/kg
Figura 8	PVR	CBD-DMH	10 mg/kg
		CBD+βC	10 mg/kg + 20 mg/kg
Figura 9	Hiperalgesia corneal	-	-
Figura 10	La cauterizaci3n qu3mica provoca hipersensibilidad corneal a la capsaicina.		
Figura 11	Hiperalgesia corneal	CBD-DMH	soluci3n al 5 %
Figura 12	Hiperalgesia corneal	CBD-DMH	soluci3n al 5 %

60 **Ejemplo 5: Otros modelos animales de inflamaci3n intraocular**

Modelos con receptor desactivado: Los modelos gen3ticos de receptor nulo (murino) est3n disponibles para las siguientes dianas del receptor: CB<sub>2</sub>; Los receptores desactivados (-/-) se usan como controles para una validaci3n adicional de las dianas farmacol3gicas en modelos de inflamaci3n y dolor ocular neurop3tico.

65 **Ejemplo 6: an3lisis *in vitro* de CBD y CBD-DMH**

## I. Materiales y procedimientos

Los procedimientos se modifican de LaPrairie y otros, 2014 a, b.

## 5 Cultivo de células

Las células HEK se mantuvieron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) y 10<sup>4</sup> U.ml<sup>-1</sup> Pen/Strep.

## 10 Fármacos

Las reservas de fármacos se compusieron en DMSO [CBD, CBD-DMH y CP 55,940] y se diluyeron a concentraciones finales de disolvente de 0,1 %. CBD y CP 55.940 fueron adquiridos de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido).

15 CP 55,940 es un agonista completo (ortostérico) de CB1 y CB2, que se usa comúnmente en estudios de la actividad de compuestos en estos receptores. Este agonista se une a CB1 y CB2 para activar al máximo el receptor y las rutas de señalización acopladas a proteína G con las alteraciones resultantes en las moléculas de señalización aguas abajo y los cambios funcionales.

## 20 Transferencia On- e In-cell™

Para los análisis de transferencia In-cell™, las células se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4 % y se lavaron tres veces con PBS 0,1 M durante 5 minutos cada una. Las células se incubaron con solución de bloqueo (PBS 0,1 M, suero de cabra normal al 5 %, TritónX-100 al 0,3 %, en dH<sub>2</sub>O) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se trataron con anticuerpo primario diluido en tampón de dilución de anticuerpos [PBS 0,1 M, BSA al 1 % (p/v), TritónX-100 al 0,3 %, en dH<sub>2</sub>O] durante la noche a 4 °C. Las soluciones de anticuerpos primarios fueron: pERK1/2(Tyr205/185) (1:200), ERK1/2 (1:200), pPLCβ3(S537) (1:500), PLCβ3 (1:1.000) o β-actina (1:2.000; Santa Cruz Biotechnology). Las células se lavaron tres veces con PBS 0,1 M durante 5 minutos cada una. Las células fueron incubadas en IR<sup>CW800dye</sup> (1:500; Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, Estados Unidos) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con PBS 0,1 M durante 5 minutos cada una. Las células se dejaron secar al aire durante la noche.

Los datos de In-cell™ se recolectaron mediante el uso del sistema y el software Odyssey Imaging (versión 3.0; Li-Cor, Lincoln, NE, Estados Unidos).

## 35 Análisis estadístico

La bondad de ajuste a los modelos de regresión no lineal se probó en GraphPad (v. 5.0, Prism). Las curvas de concentración frente a respuesta (CRC) se muestran en cada figura de acuerdo con el modelo con el mejor ajuste. Se obtuvieron estadísticas farmacológicas a partir de modelos de regresión no lineal. Los análisis estadísticos fueron análisis de varianza de dos vías (ANOVA), como se indicó, mediante el uso de GraphPad. La homogeneidad de la varianza se confirmó mediante el uso de la prueba de Bartlett. El nivel de significación se estableció en  $P < 0,001$  o  $< 0,01$ , como se indica. Los resultados se informan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) o la media y el intervalo de confianza del 95 %, como se indica, de al menos 4 experimentos independientes.

## 45 II. Resultados y discusión

Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 13A-C y las Tablas 4-6. Los resultados indican que CBD-DMH es un modulador alostérico positivo (Christopoulos y Kenakin, 2002) de la señalización de proteína G dependiente de CB<sub>2</sub> y mejora la potencia y la eficacia del agonista ortostérico CB<sub>2</sub>, CP55940, para activar las vías de señalización de la proteína G acoplada a CB<sub>2</sub> (resumidas en las Tablas 4-6). CBD-DMH no activa CB<sub>2</sub> en ausencia del agonista ortostérico, CP55940. En estos ensayos, el CBD es un agonista parcial de la señalización de proteína G dependiente de CB<sub>2</sub> (resumida en las Tablas 4-6).

55 Las siguientes tablas muestran los valores de CE<sub>50</sub> media y E<sub>Máx</sub>/E<sub>Mín</sub> para los efectos de CBD-DMH y CBD en la fosforilación de ERK G $\alpha_{i/c}$  dependiente de CP55,940, la fosforilación de AMPc y PLCβ3 G $\alpha_q$ .

Tabla 4: ERK ( $G\alpha_{i/o}$ )

		EC <sub>50</sub> (nM) ± SEM	E <sub>máx</sub> (%) ± SEM*	
5 10 15	CB <sub>2</sub>	CP55,940 + CBD-DMH 1 μM	135,70 ± 22,58	117,17 ± 12,01
		CP55,940 + CBD 1 μM	865,40 ± 6,62	97,36 ± 7,09
		CBD-DMH	-	-
		CBD	1.286,00 ± 22,98	-
		CBD-DMH + CP55,940 500 nM	39,90 ± 64,98	113,11 ± 22,96
		CBD + CP55,940 500 nM	348,70 ± 78,69	46,83 ± 12,33
		*Calculado como un porcentaje de la respuesta máxima al agonista CP 55,940		

Tabla 5: PLCβ3 ( $G\alpha_q$ )

		EC <sub>50</sub> (nM) ± SEM	E <sub>máx</sub> (%) ± SEM*	
20 25 30	CB <sub>2</sub>	CP55,940 + CBD-DMH 1 μM	185,30 ± 18,43	114,37 ± 17,06
		CP55,940 + CBD 1 μM	609,50 ± 5,93	95,98 ± 12,36
		CBD-DMH	-	-
		CBD	977,90 ± 7,80	51,68 ± 7,04
		CBD-DMH + CP55,940 500 nM	196,70 ± 9,24	102,01 ± 6,32
		CBD + CP55,940 500 nM	699,30 ± 11,80	43,59 ± 3,98
		*Calculado como un porcentaje de la respuesta máxima al agonista CP 55,940		

Tabla 6: AMPc

		EC <sub>50</sub> (nM) ± SEM	E <sub>min</sub> (%) ± SEM†	
35 40 45	CB <sub>2</sub>	CP55,940 + CBD-DMH 1 μM	48,27 ± 37,49	153,24 ± 23,13
		CP55,940 + CBD 1 μM	31,39 ± 31,37	103,01 ± 12,64
		CBD-DMH	-	-
		CBD	237,30 ± 47,55	928,15 ± 24,61
		CBD-DMH + CP55,940 500 nM	241,85 ± 48,33	475,19 ± 11,91
		CBD + CP55,940 500 nM	353,96 ± 49,37	423,98 ± 88,16
		†Calculado como un porcentaje de la inhibición máxima de AMPc en respuesta al agonista CP 55,940		

50 Si bien la presente divulgación se ha descrito con referencia a lo que actualmente se consideran ejemplos, debe entenderse que la divulgación no se limita a los ejemplos divulgados. Se contemplan cambios en la forma y la sustitución de equivalentes ya que las circunstancias pueden sugerir o hacerlo conveniente. Estos cambios deben entenderse dentro del espíritu y el ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se han empleado términos específicos en la presente memoria, tales términos están destinados en un sentido descriptivo y no con fines de limitación.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad en la misma medida que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual fuera indicada específicamente e individualmente para ser incorporada como referencia en su totalidad.

60

### Referencias

Agarwal R., Iezhitsa I., Agarwal P., Abdul Nasir N.A., Razali N., Alyautdin R., Ismail N.M., Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. Drug Deliv. Agosto de 2014 12:1-17.

65 Belmonte, C., M. C. Acosta y J. Gallar (2004). "Neural basis of sensation in intact and injured corneas." Exp Eye Res 78(3): 513-525.

- Berenbaum, M. C. (1989). "What is synergy?" *Pharmacol Rev* 41(2): 93-141.
- Conway, B. R. (2008). "Recent patents on ocular drug delivery systems." *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2(1): 1-8.
- Christopoulos, A. y T. Kenakin (2002). "G protein-coupled receptor allostereism and complexing." *Pharmacol Rev* 54(2): 323-374.
- 5 Daisuke Ito, Kortaro Tanaka, Shigeaki Suzuki, Tomohisa Dembo, y Yasuo Fukuuchi, "Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain" *Stroke*. 2001;32:1208-1215.
- Draize, J. H., G. Woodard y H. O. Calvery (1944). "Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes." *J Pharmacol and Exp Therapeutics* 82: 377-390.
- 10 Frenzel, E. M., K. A. Neely, A. W. Walsh, J. D. Cameron y D. S. Gregerson (1998). "A new model of proliferative vitreoretinopathy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(11): 2157-2164.
- Fride E, Feigin C, Ponde DE, Breuer A, Hanus L, Arshavsky N, Mechoulam R. (2004). "(+)-Cannabidiol analogues which bind cannabinoid receptors but exert peripheral activity only." *Eur J Pharmacol* 506(2): 179-188.
- Friedman, N. J. (2010). "Impact of dry eye disease and treatment on quality of life." *Curr Opin Ophthalmol* 21(4): 310-316.
- 15 Hanus, L., A. Breuer, S. Tchilibon, S. Shiloah, D. Goldenberg, M. Horowitz, R. G. Pertwee, R. A. Ross, M. R y E. Frider (1999). "HU-308: A specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor." *Proc Nat Acad Sci* 96: 14228-14233.
- Hohmann, A. G. y R. L. Suplita, 2da (2006). "Endocannabinoid mechanisms of pain modulation." *AAPS J* 8(4): E693-708.
- 20 Hsieh, G. C., M. Pai, P. Chandran, B. A. Hooker, C. Z. Zhu, A. K. Salyers, E. J. Wensink, C. Zhan, W. A. Carroll, M. J. Dart, B. B. Yao, P. Honore y M. D. Meyer (2011). "Central and peripheral sites of action for CB(2) receptor mediated analgesic activity in chronic inflammatory and neuropathic pain models in rats." *Br J Pharmacol* 162(2): 428-440.
- Hughes, P. M., O. Olejnik, J. E. Chang-Lin y C. G. Wilson (2005). "Topical and systemic drug delivery to the posterior segments." *Adv Drug Deliv Rev* 57(14): 2010-2032.
- 25 Jabs, D. A., R. B. Nussenblatt y J. T. Rosenbaum (2005). "Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop." *Am J Ophthalmol* 140(3): 509-516.
- Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM (2014a). Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the type 1 cannabinoid receptor (*Brit. J. Pharmacol.* Submitted).
- 30 Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Dupré DJ, Denovan-Wright EM (2014b). Type 1 Cannabinoid Receptor Ligands Display Functional Selectivity in a Cell Culture Model of Striatal Medium Spiny Projection Neurons. *J Biol Chem* E-pub ahead of print.
- Lee, R. W. y A. D. Dick (2012). "Current concepts and future directions in the pathogenesis and treatment of non-infectious intraocular inflammation." *Eye (Lond)* 26(1): 17-28.
- 35 Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky y S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." *Nat Rev Immunol* 7(9): 678-689.
- Lobo, C. (2012). "Pseudophakic cystoid macular edema." *Ophthalmologica* 227(2): 61-67.
- Loftsson, T. y D. Duchene (2007). "Cyclodextrins and their pharmaceutical applications." *Int J Pharm* 329(1-2): 1-11.
- 40 Loftsson, T. y E. Stefánsson (2002). "Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye." *Acta Ophthalmol Scand* 80(2): 144-150.
- Maestrelli, F., M. L. Gonzalez-Rodriguez, A. M. Rabasco, C. Ghelardini y P. Mura (2010). "New "drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes" formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics." *Int J Pharm* 395(1-2): 222-231.
- 45 Maestrelli, F., M. L. Gonzalez-Rodriguez, A. M. Rabasco y P. Mura (2005). "Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery." *Int J Pharm* 298(1): 55-67.
- McPartland, J. M. y E. B. Russo (2001). "Cannabis and cannabis extracts, greater than the sum of their parts?" *J Cannabis Ther* 1(3-4): 103-132.
- 50 Mechoulam, R. y Hanus, L. (2002). "Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects." *Chem Phys Lipids* 121(1-2): 35-43.
- Natarajan J.V., Ang M., Darwitan A., Chattopadhyay S., Wong T.T., Venkatraman S.S., Nanomedicine for glaucoma: liposomes provide sustained release of latanoprost in the eye. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:123-31.
- 55 Oreja-Guevara C., Treatment of spasticity in multiple sclerosis: new perspectives regarding the use of cannabinoids. *Rev Neurol*. Octubre de 2012a 1;55(7):421-30.
- Oreja-Guevara C., Clinical efficacy and effectiveness of Sativex, a combined cannabinoid medicine, in multiple sclerosis-related spasticity. *Expert Rev Neurother*. Abril de 2012;12(4 Supl):3-8.
- Pflugfelder, S. C. (2008). "Prevalence, burden, and pharmacoconomics of dry eye disease." *Am J Manag Care* 14(3 Supl): S102-106.
- 60 Rahn, E. J. y A. G. Hohmann (2009). "Cannabinoids as pharmacotherapies for neuropathic pain: from the bench to the bedside." *Neurotherapeutics* 6(4): 713-737.
- Ranta, V. P. y A. Urtti (2006). "Transscleral drug delivery to the posterior eye: prospects of pharmacokinetic modeling." *Adv Drug Deliv Rev* 58(11): 1164-1181.
- 65 Rosenthal, P., I. Baran y D. S. Jacobs (2009). "Corneal pain without stain: is it real?" *Ocul Surf* 7(1): 28-40.

- Rosenthal, P. y D. Borsook (2012). "The corneal pain system. Part I: the missing piece of the dry eye puzzle." *Ocul Surf* 10(1): 2-14.
- Russo, E. B. (2011). "Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects." *Br J Pharm* 163: 1344-1364.
- 5 Sanz, M. J. y P. Kubes (2012). "Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking." *Eur J Immunol* 42(2): 278-283.
- Souto, E. B., S. Doktorovova, E. Gonzalez-Mira, M. A. Egea y M. L. Garcia (2010). "Feasibility of lipid nanoparticles for ocular delivery of anti-inflammatory drugs." *Curr Eye Res* 35(7): 537-552.
- 10 Szczesniak, A. M., M. E. Kelly, S. Whynot, P. N. Shek y O. Hung (2006). "Ocular hypotensive effects of an intratracheally delivered liposomal delta9-tetrahydrocannabinol preparation in rats." *J Ocul Pharmacol Ther* 22(3): 160-167.
- Thumma, S., S. Majumdar, M. A. Elsohly, W. Gul y M. A. Repka (2008). "Preformulation studies of a prodrug of Delta9-tetrahydrocannabinol." *AAPS PharmSciTech* 9(3): 982-990.
- 15 Toguri, J. T., C. Lehmann, R. B. Laprairie, A. M. Szczesniak, J. Zhou, E. M. Denovan-Wright y M. E. Kelly (2014). "Anti-inflammatory effects of cannabinoid CB(2) receptor activation in endotoxin-induced uveitis." *Br J Pharmacol* 171(6): 1448-1461.
- Wagner, H. y G. Ulrich-Merzenich (2009). "Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals." *Phytomedicine* 16(2-3): 97-110.
- 20 Ward, S. J., M. D. Ramirez, H. Neelakantan y E. A. Walker (2011). "Cannabidiol prevents the development of cold and mechanical allodynia in paclitaxel-treated female C57Bl6 mice." *Anesth Analg* 113(4): 947-950.
- Wenk, H. N. y C. N. Honda (2003). "Silver nitrate cauterization: characterization of a new model of corneal inflammation and hyperalgesia in rat." *Pain* 105(3): 393-401.
- WO 2010041253 A1: Bab, I., R. Mechoulam, A. Breuer y N. Mussai. "Compositions comprising cb receptor agonists, uses thereof and methods for their preparation." Published: 15 de abril de 2010.
- 25 Yanoof M y Duker JS, (2009). *Ophthalmology*. Mosby Elsevier.
- Yawn, B. P., P. C. Wollan, J. L. St Sauver y L. C. Butterfield (2013). "Herpes zoster eye complications: rates and trends." *Mayo Clin Proc* 88(6): 562-570.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un agente dirigido a CB2 para su uso en el tratamiento de la inflamación ocular y/o el dolor neuropático ocular en un sujeto que lo necesite en el que el agente dirigido a CB2 es CBD-DMH y en el que dicho uso comprende la administración ocular de dicho agente al sujeto.
- 10 2. El agente dirigido a CB2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el CBD-DMH es para su uso en combinación con un agente agonista de CB2 y un agente agonista parcial de CB2, en donde el agente agonista de CB2 es HU-433, HU-308 o  $\beta$ -cariofileno y el agente agonista parcial de CB2 es CBD.
- 15 3. El agente dirigido a CB2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el agente dirigido a CB2 es para su uso en el tratamiento de la inflamación ocular.
4. El agente dirigido a CB2 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la inflamación ocular es provocada por una enfermedad ocular.
- 20 5. El agente dirigido a CB2 para su uso ocular de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad ocular provoca inflamación intraocular.
6. El agente dirigido a CB2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la enfermedad ocular es uveítis, uveorretinitis o vitreorretinopatía proliferativa.
- 25 7. El agente dirigido a CB2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad ocular es inflamación corneal.
8. El agente dirigido a CB2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el sujeto tiene una enfermedad ocular que provoca dolor y pérdida de visión, y el agente reduce el dolor y/o reduce la pérdida de visión.
- 30 9. El agente dirigido a CB2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el agente dirigido a CB2 es para su uso en el tratamiento del dolor neuropático ocular.
10. El agente dirigido a CB2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso tópico ocular.
- 35 11. El agente dirigido a CB2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sujeto es un ser humano.
- 40 12. Una composición farmacéutica ocular para su uso en el tratamiento de la inflamación ocular y/o el dolor neuropático ocular que comprende un agente dirigido a CB2 y un portador adecuado para la administración ocular a un ojo, en el que dicho agente dirigido a CB2 es CBD-DMH.
- 45 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la composición comprende además un agente agonista de CB2 y un agente agonista parcial de CB2, en la que el agente agonista de CB2 es  $\beta$ -cariofileno, HU-433 o HU-308 y el agente agonista parcial de CB2 es CBD.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en la que el portador comprende un liposoma.
- 50 15. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la que la composición es una composición farmacéutica ocular tópica.

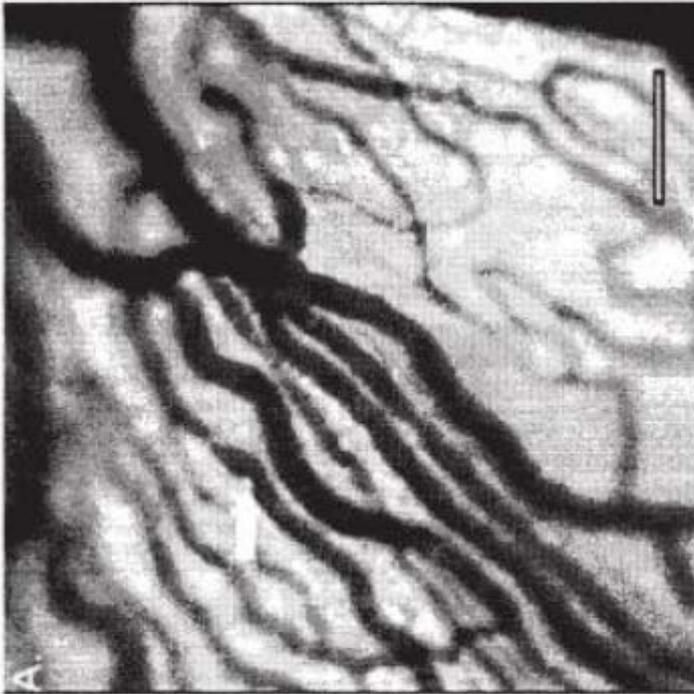
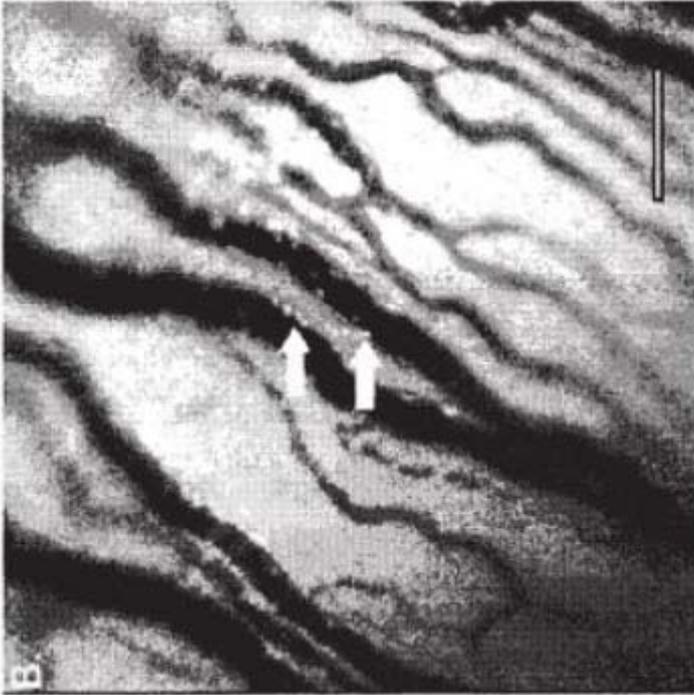


Figura 1

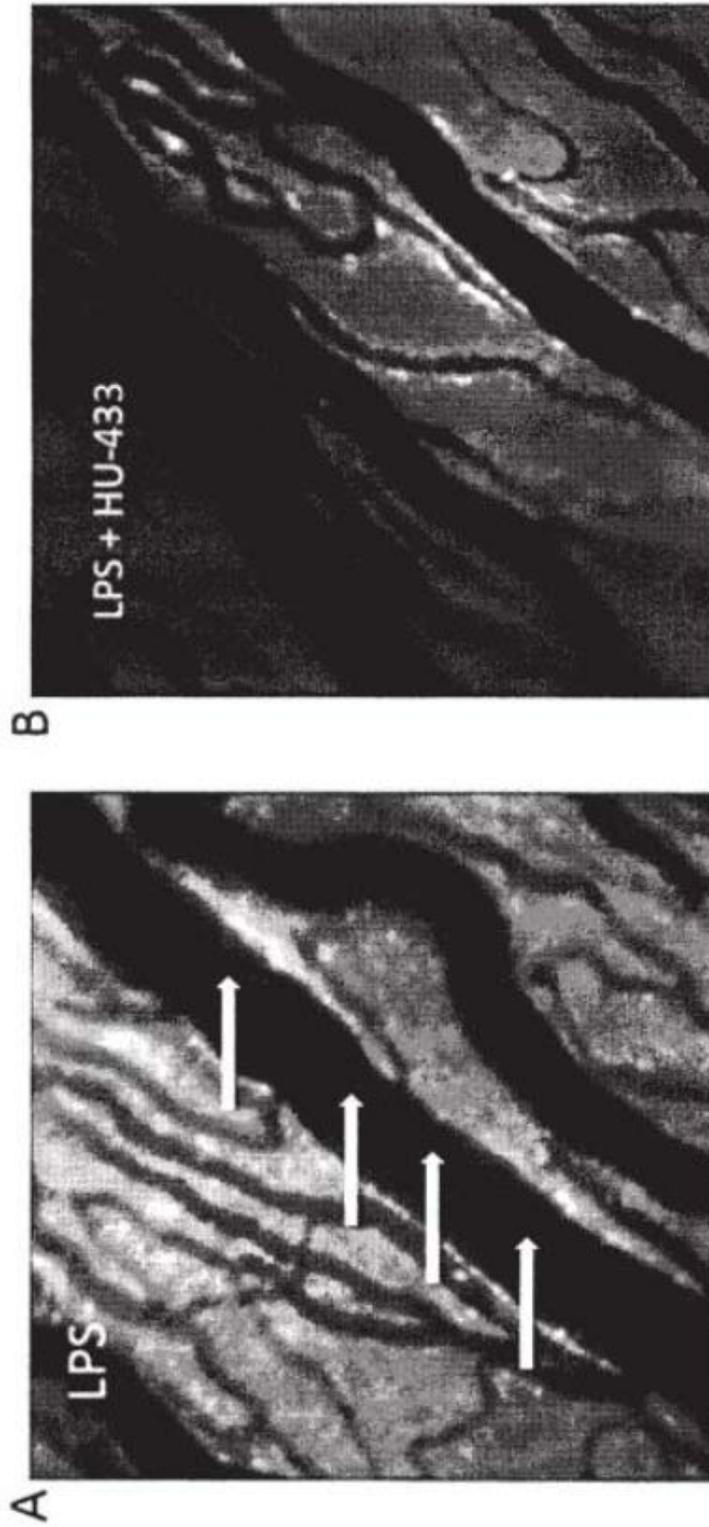


Figure 2

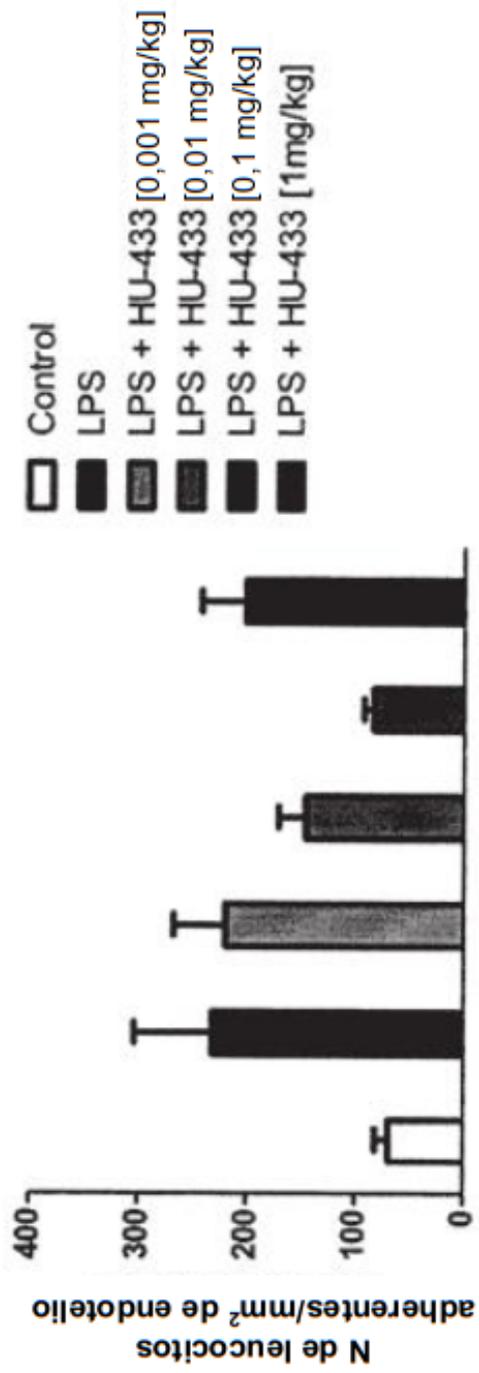


Figura 3

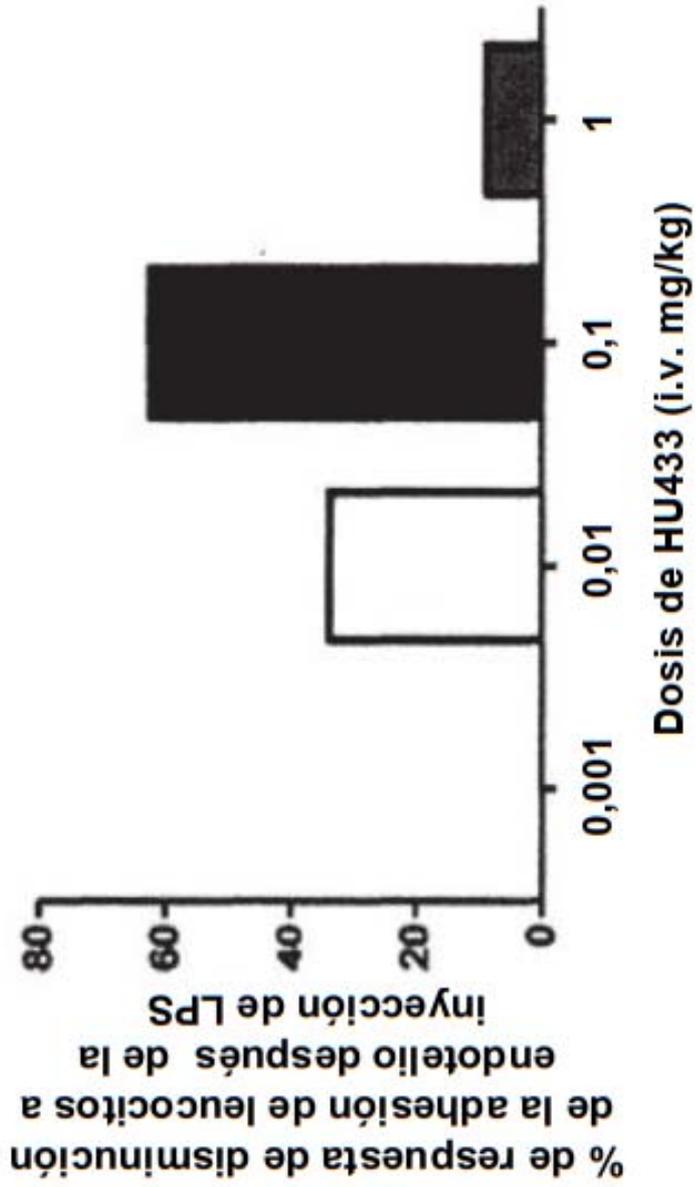


Figura 4

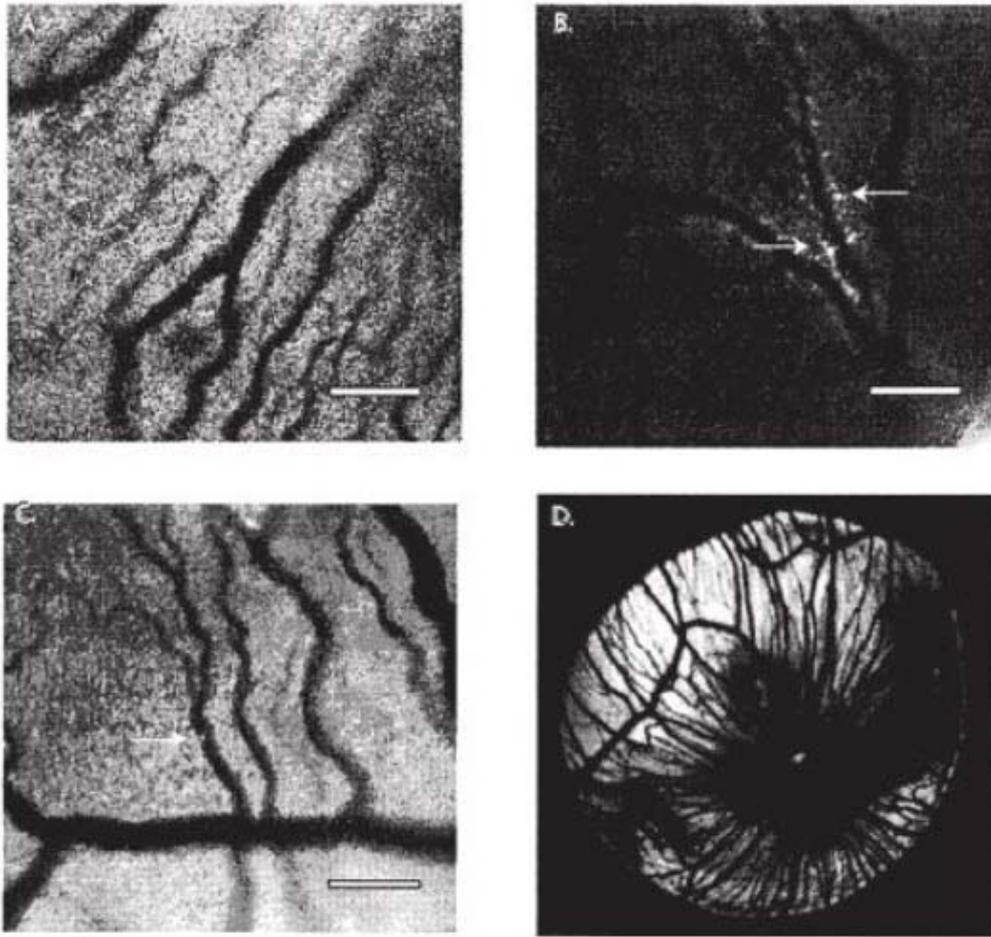


Figura 5

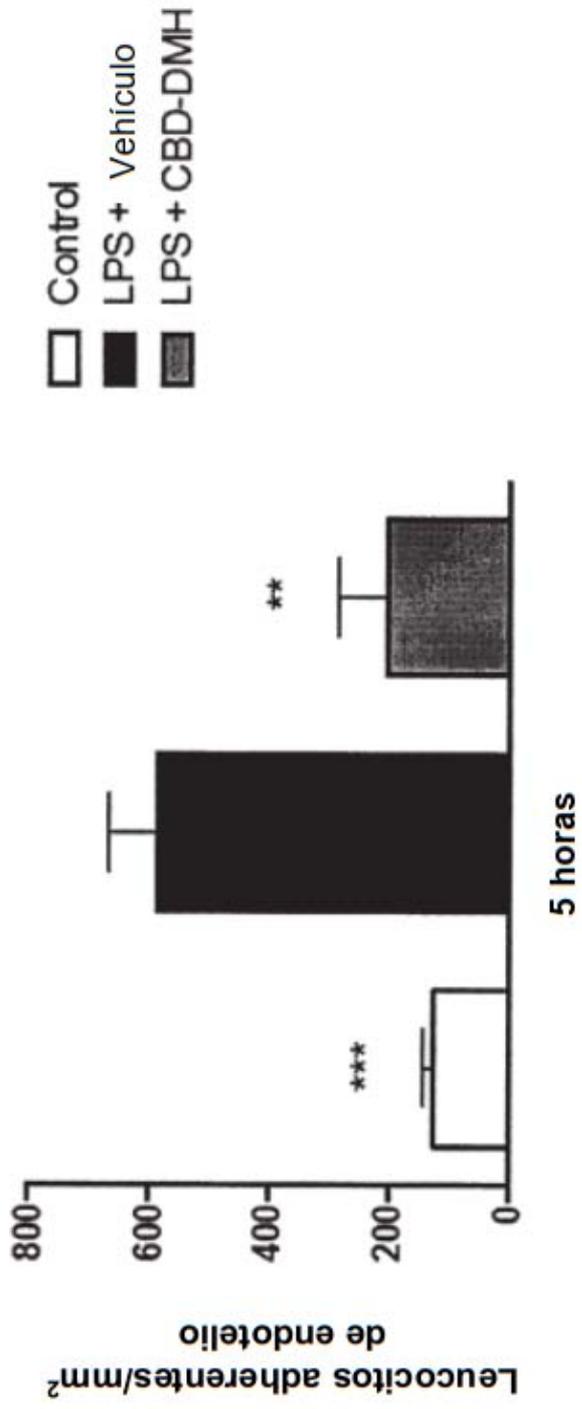


Figura 6

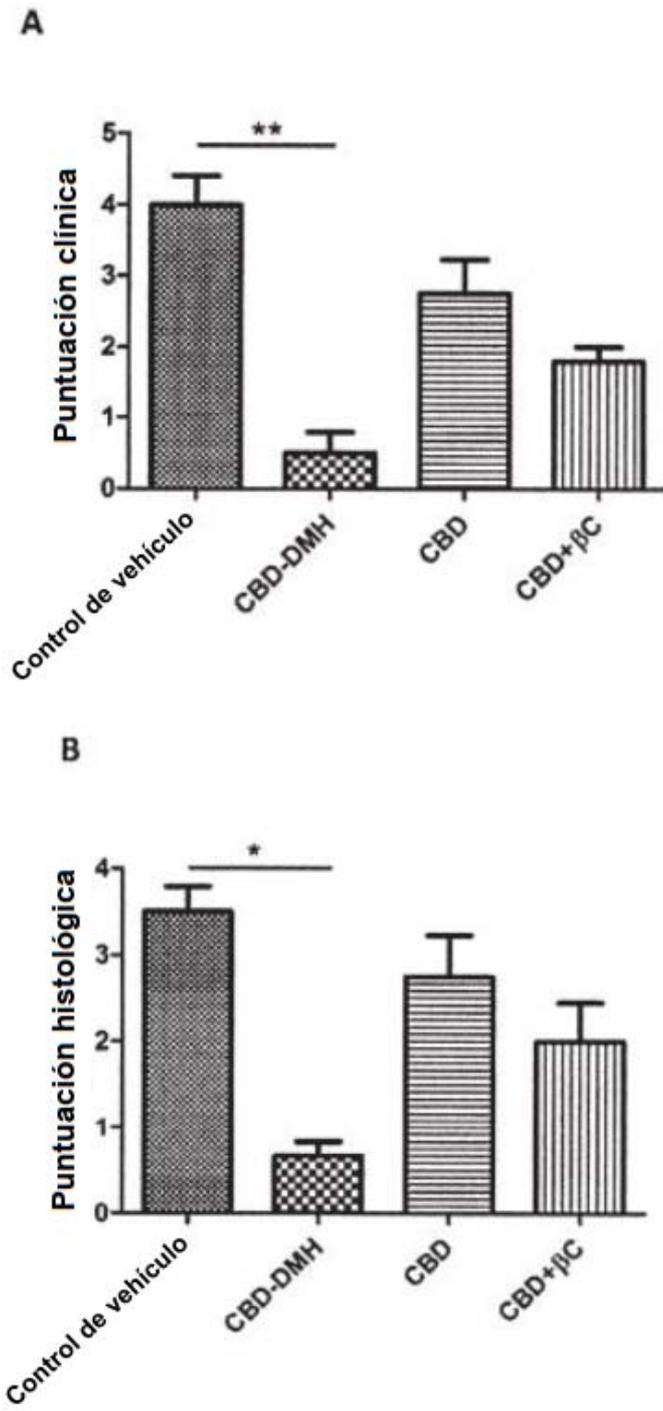


Figura 7

C

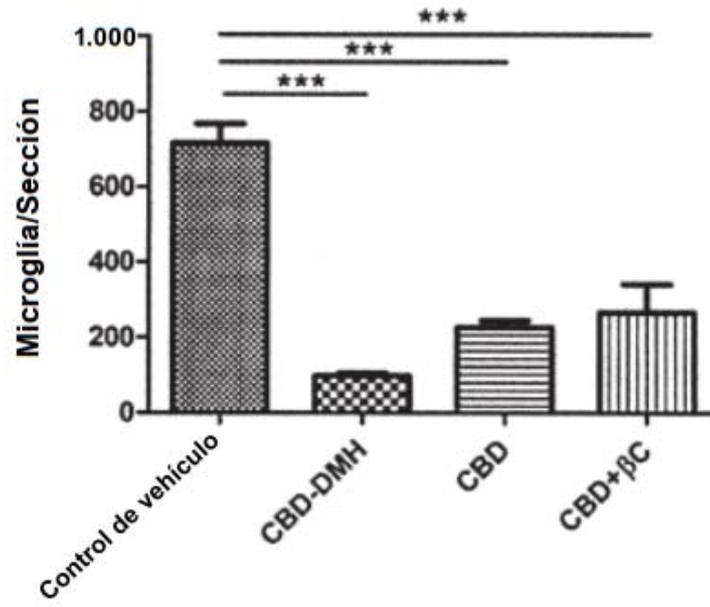


Figura 7 (continuación)

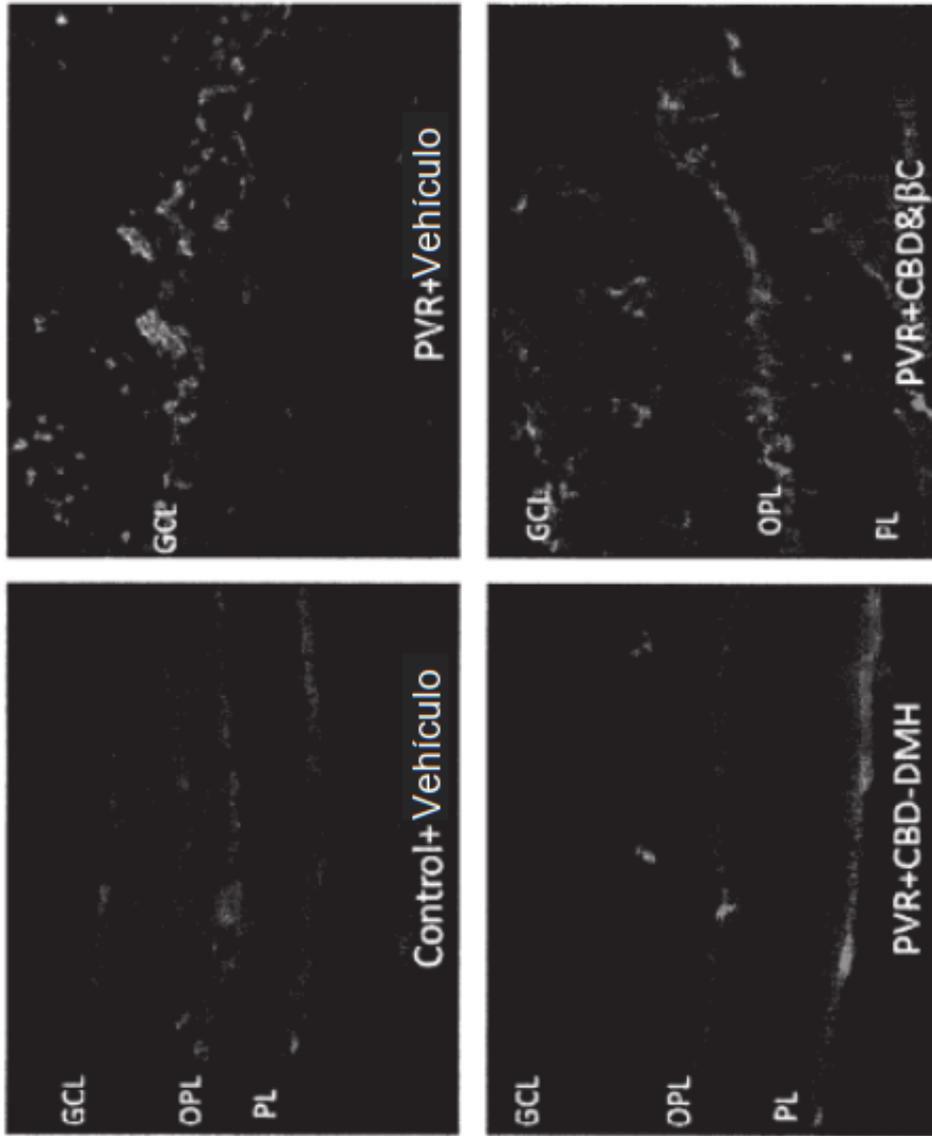


Figura 8

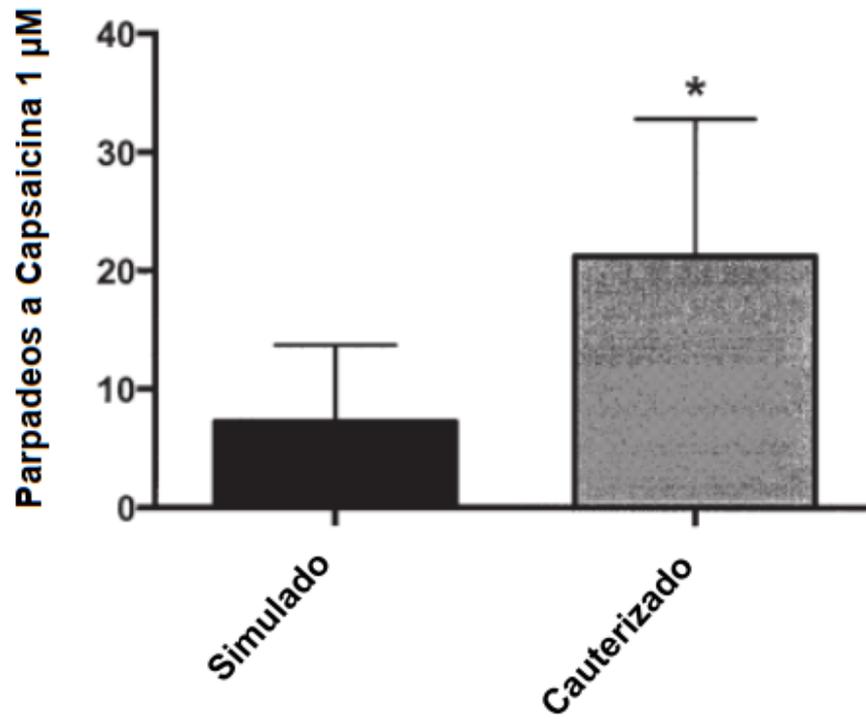


Figura 9

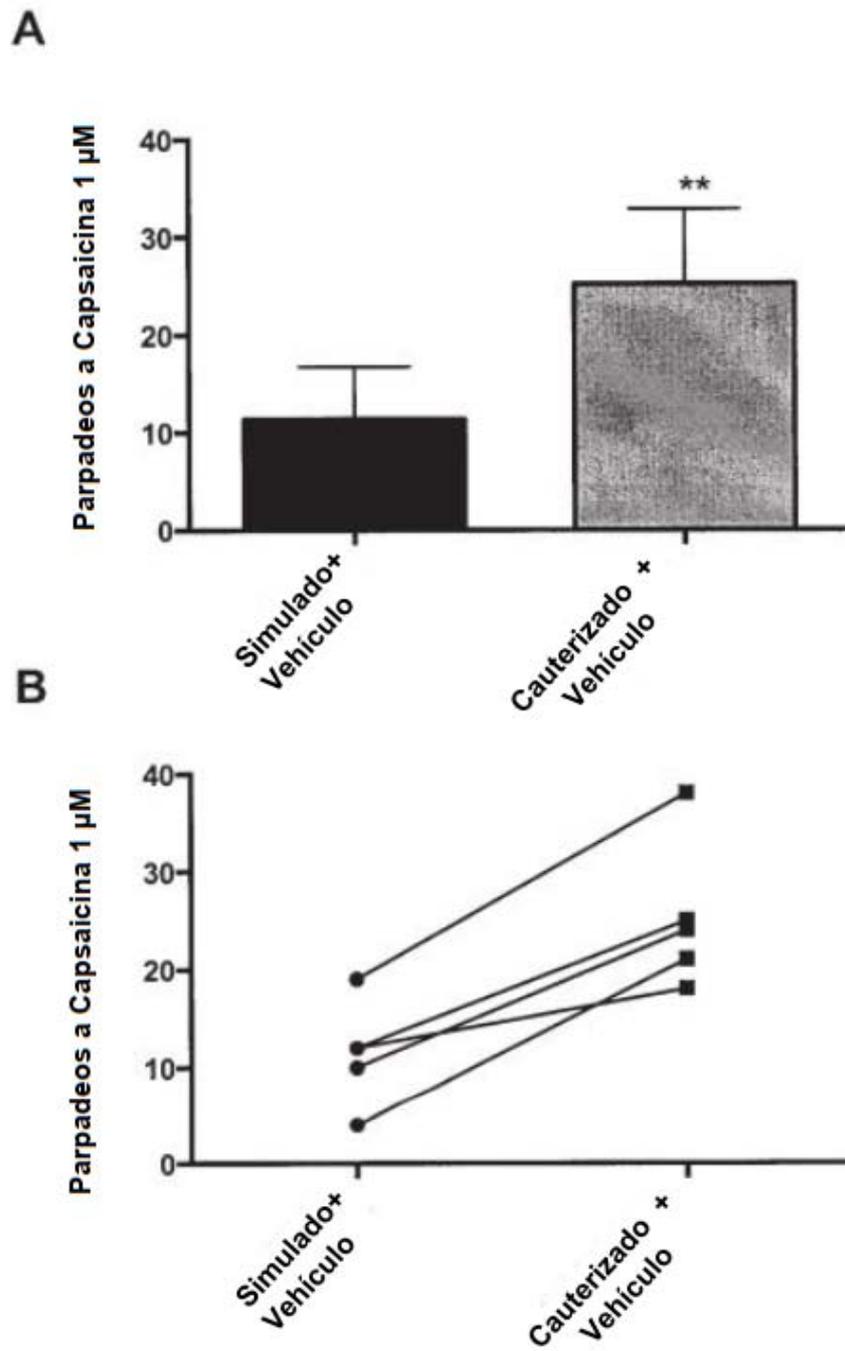


Figura 10

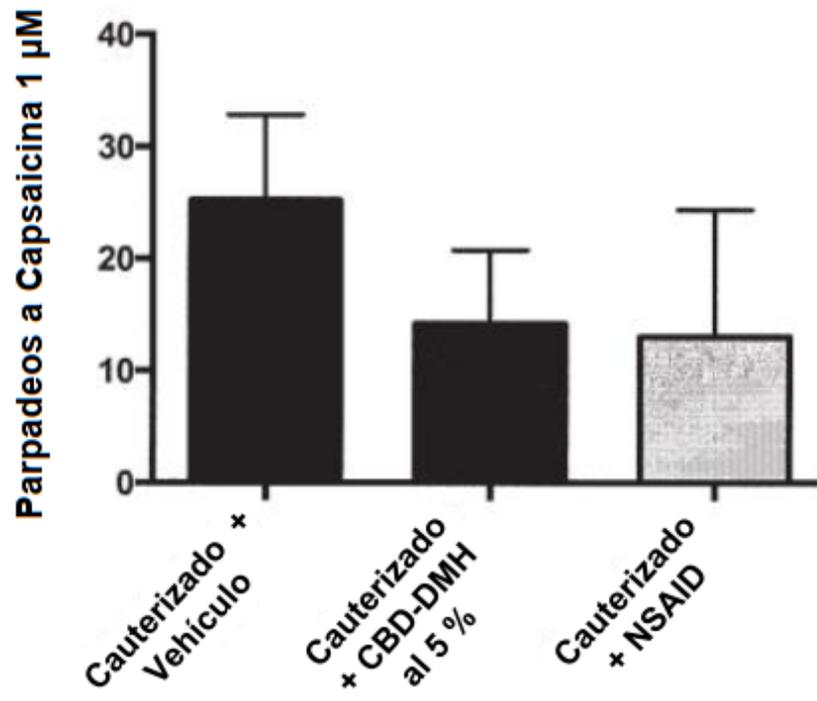


Figura 11

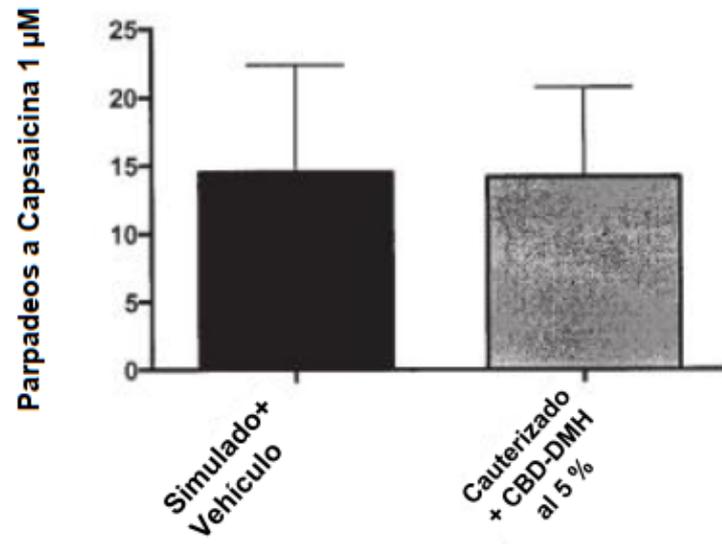
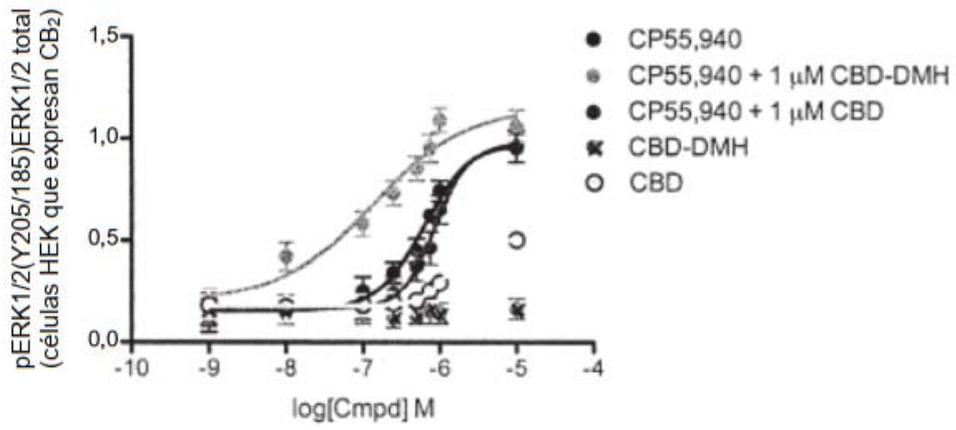


Figura 12

**A**



**B**

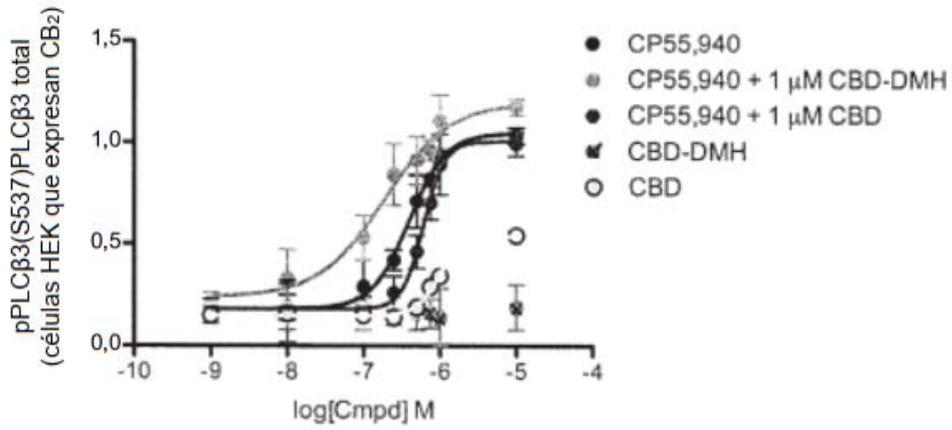


Figura 13

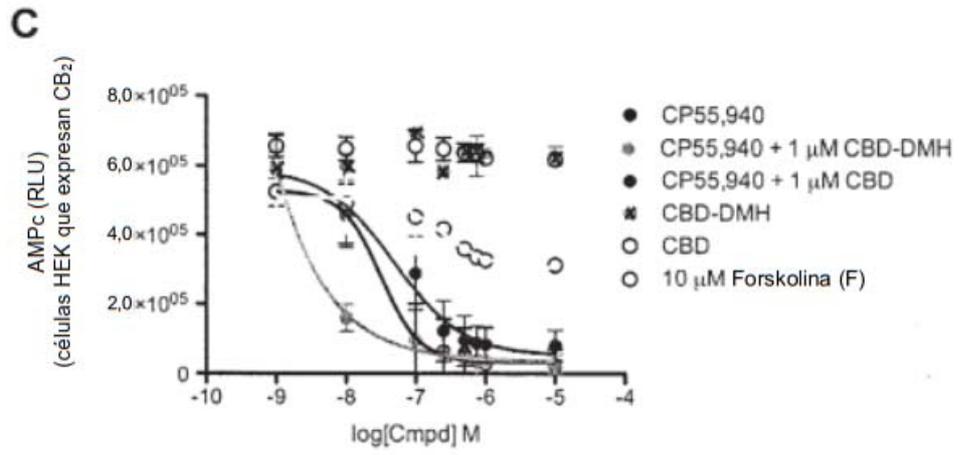


Figura 13 (continuación)