

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 559**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/02** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61P 1/00** (2006.01)  
**A61K 31/05** (2006.01)  
**A61K 31/728** (2006.01)  
**A61P 15/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2021** **PCT/CZ2021/050136**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2022** **WO22105952**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2021** **E 21815896 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025** **EP 4247335**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende cannabidiol y ácido hialurónico**

30 Prioridad:

**19.11.2020 CZ 20200620**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.06.2025**

73 Titular/es:

**CB21 PHARMA, S.R.O. (100.00%)**  
**Purkynova 648/125**  
**61200 Brno, CZ**

72 Inventor/es:

**STORCH, JAN y**  
**PRUSOVA, LENKA**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 3 023 559 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

Composición farmacéutica que comprende cannabidiol y ácido hialurónico

**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene cannabidiol y ácido hialurónico, o una sal del mismo, con un perfil de disolución mejorado y una acción antiinflamatoria mejorada en forma de supositorios.

**Antecedentes de la técnica**

- 10 Los tejidos del canal anorrectal y del ano pueden resultar dañados por fisuras o grietas en la mucosa en diversas enfermedades o problemas. Estas grietas y fisuras se manifiestan con dolor durante o después de la defecación, sangrado, ardor y picor en el recto. También pueden infectarse con facilidad por bacterias intestinales, provocando una úlcera que no cicatriza. Del mismo modo, los daños en la mucosa vaginal pueden causar estados dolorosos, hemorragias, actuar como puerta de entrada de bacterias, virus u hongos y provocar inflamación vaginal.

- 15 Estos estados pueden mejorarse asegurando una hidratación adecuada de los tejidos afectados. Para ello pueden utilizarse tratamientos con supositorios de hialuronato de sodio. Por ejemplo, los supositorios vaginales Cicatridina y los supositorios rectales Proktis-M disponibles en el mercado contienen hialuronato de sodio y extractos de *Centella asiatica*, caléndula, aloe vera y extracto o aceite esencial de árbol de té.

- A pesar de los importantes esfuerzos realizados para normalizarlos, los extractos de plantas tienen composiciones variables. Además, los supositorios contienen una mezcla de extractos de plantas o aceites esenciales, algunos de los cuales pueden contener irritantes de las mucosas. Además, es necesario potenciar las propiedades curativas de dicho preparado y eliminar los estados inflamatorios indeseables.

- 20 Un fitocéutico del que aún hay pocos datos clínicos sobre su efecto en los tejidos pélvicos es el cannabidiol (CBD), un compuesto principal no psicotrópico de un extracto complejo de plantas del género *Cannabis*. El CBD es un agonista del receptor CB2 del sistema endocannabinoide que, al activarse, inhibe la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, macrófagos y neutrófilos/leucocitos del sistema inmunitario de las mucosas. El cannabidiol tiene efectos antioxidantes, analgésicos, antiinflamatorios, antitumorales, antiespasmódicos, ansiolíticos, antieméticos, anticonvulsivos, neuroprotectores y antidiabéticos.

- 30 El cannabidiol es una sustancia lipófila (log P 6-7) con muy baja solubilidad en agua, propensa a la degradación, especialmente en solución, por exposición a la luz, al oxígeno atmosférico y al pH ácido. La biodisponibilidad del cannabidiol depende principalmente de su nivel de absorción a través del tracto gastrointestinal. Las sustancias lipófilas suelen absorberse mal, entre otras causas debido a su escasa solubilidad y/o dispersabilidad en agua. La biodisponibilidad oral de la sustancia activa también depende de la susceptibilidad de la sustancia al denominado efecto de primer paso. Las sustancias absorbidas por el intestino deben pasar primero por el hígado antes de distribuirse al organismo, donde se metabolizan. En general, se supone que el cannabidiol se metaboliza en gran medida en el hígado y, por tanto, su biodisponibilidad oral es baja (S. Zhornitsky, S. Potvin, Pharmaceuticals (2012) 5, 529-552). La formulación que contiene cannabidiol y la vía de administración desempeñan un papel clave en el aumento de la biodisponibilidad del cannabidiol, su solubilidad, su estabilidad química y su tiempo de permanencia en el sistema.

- 35 El documento US 2020/0069606 divulga una formulación analgésica para un uso veterinario, entre otras formas, en forma de supositorios rectales, que comprende cannabinoides y mentol. La formulación se basa en carboximetilcelulosa y glicerina u otro polialcohol.

- 40 El documento US 2018110753 divulga supositorios que comprenden cannabidiol, Witepsol S58, Cetareth 35 e isomalt.

**Divulgación de la invención**

- 45 La invención proporciona una composición farmacéutica que contiene cannabidiol y ácido hialurónico, o una sal del mismo, con un perfil de disolución mejorado y una acción antiinflamatoria mejorada, estando la composición farmacéutica en forma de supositorios.

- 50 Estas composiciones farmacéuticas de la invención están destinadas para su uso en la regeneración, el alivio, la curación de tejidos dañados y el alivio del dolor, en el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo de inflamaciones intestinales, inflamaciones intestinales inespecíficas, inflamaciones vaginales, endometriosis, inflamaciones prostáticas y afecciones tras la extirpación quirúrgica de la próstata, micosis, grietas y lesiones de la mucosa vaginal y anorrectal, hemorroides, proctitis, criptitis, ragad anal, fisuras, fistulas perianales, afecciones tras cirugía proctológica, sequedad vaginal, molestias vaginales, atrofia y distrofia vaginales, coito doloroso, afecciones tras el parto, afecciones tras cirugía ginecológica y distrofia tras quimioterapia.

La presente invención proporciona así una composición farmacéutica en forma de supositorio, que contiene cannabidiol, ácido hialurónico o una sal del mismo, y una base para supositorios que contiene grasa sólida, agua, y al menos un mono(acil C10-C30)glicerol o di(acil C10-C30)glicerol.

5 Preferentemente, la composición farmacéutica contiene del 0,1 al 5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, y del 2 al 30 % p/p de cannabidiol.

Más preferiblemente, la composición farmacéutica contiene del 0,2 al 0,5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, y del 3 al 14 % p/p de cannabidiol.

Aún más preferiblemente, la composición farmacéutica contiene del 0,2 al 0,5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, y del 3 al 6 % p/p de cannabidiol.

10 La sal de ácido hialurónico puede ser preferentemente hialuronato de sodio.

El ácido hialurónico y sus sales pertenecen entre los polisacáridos. Estas sustancias se producen de forma natural en el organismo y suelen encontrarse en varios fluidos corporales, en la piel, en varios tejidos, etc. Estas sustancias se unen a grandes cantidades de agua y pueden proporcionar a los tejidos dañados un entorno húmedo necesario para la regeneración y la cicatrización, pero también para una división celular saludable y para mantener la flexibilidad y elasticidad de los tejidos. Para la liberación completa del ácido hialurónico o de una sal del mismo a partir de la formulación y, por tanto, para lograr el máximo efecto posible, es esencial que esté disuelto en agua, no disperso en forma sólida, como es habitual en otros preparados. Para ello, es esencial que la base para supositorios contenga agua.

20 El cannabidiol es un terpenoide fenólico, generalmente obtenido por extracción de la planta *Cannabis sativa* L., y separación del cannabidiol del extracto. El cannabidiol es insoluble en agua, pero se disuelve en sustancias lipófilas. El cannabidiol tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, regeneradoras y curativas.

En el marco de la presente invención, se ha descubierto que el cannabidiol y el ácido hialurónico, o una sal del mismo, actúan sinérgicamente en el tratamiento de enfermedades y afecciones causadas por la alteración o el daño de la mucosa vaginal, anorrectal y/o anal, incluidas inflamaciones intestinales, inflamaciones intestinales inespecíficas, inflamaciones vaginales, endometriosis, inflamaciones prostáticas y afecciones tras la extirpación quirúrgica de la próstata, micosis, grietas y lesiones en la mucosa vaginal y anorrectal, hemorroides, proctitis, criptitis, ragad anal, fisuras, fistulas perianales, afecciones tras cirugía proctológica, sequedad vaginal, molestias vaginales, atrofia y distrofia vaginales, coito doloroso, afecciones tras el parto, afecciones tras cirugía ginecológica, distrofia tras quimioterapia. Esta combinación de principios activos es muy adecuada para un uso terapéutico seguro, ya que no es irritante y no presenta toxicidad alguna a las dosis administradas.

30 La base para supositorios contiene al menos un mono(acil C10-C30)glicerol o di(acil C10-C30)glicerol, grasa sólida (adepts solidus) y agua.

Preferentemente contiene mono(acil C10-C30)glicerol que es monoestearato de glicerol.

35 En una realización preferida, el contenido de agua en la composición farmacéutica está dentro del intervalo del 5 al 20 % p/p, más preferiblemente del 7 al 15 % p/p, aún más preferiblemente del 9 al 12 % p/p.

El monoacilglicerol o los monoacilgliceroles, la grasa sólida (adepts solidus) y el agua demostraron ser un sistema de formulación adecuado para supositorios que contienen cannabidiol y ácido hialurónico, o una sal del mismo. Este sistema de formulación permite una buena homogeneización de los principios activos en el supositorio, una buena formulación del supositorio y un buen perfil de disolución de los principios activos. Al mismo tiempo, este sistema de formulación permite una aplicación cómoda, suave y segura de los supositorios.

40 En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende del 0,1 al 5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, del 2 al 30 % p/p de cannabidiol, del 2 al 10 % p/p de monoestearato de glicerol, del 5 al 15 % p/p de agua, siendo el resto (hasta el 100 % p/p) grasa sólida.

45 En una realización más preferida, la composición farmacéutica comprende del 0,2 al 0,5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, del 3 al 14 % p/p de cannabidiol, del 2 al 10 % p/p de monoestearato de glicerol, del 5 al 15 % p/p de agua, siendo el resto (hasta 100 % p/p) grasa sólida.

En una realización aún más preferida, la composición farmacéutica comprende del 0,2 al 0,5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, del 3 al 6 % p/p de cannabidiol, del 2 al 5 % p/p de monoestearato de glicerol, del 7 al 12 % p/p de agua, siendo el resto (hasta 100 % p/p) grasa sólida.

50 Los supositorios incluyen supositorios rectales y supositorios vaginales.

El peso de una dosis unitaria (un supositorio) es de 1 a 5 g, preferentemente de 2 a 3 g.

Otro aspecto de la invención es la composición farmacéutica según la presente invención para su uso como medicamento.

Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención es para su uso en la regeneración y/o la curación de tejidos dañados, la mitigación y/o el alivio del dolor y la inflamación, y el alivio de los síntomas asociados con la menopausia y/o el síndrome premenstrual.

5 Más específicamente, la composición farmacéutica de la invención es para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de inflamaciones intestinales, inflamaciones intestinales inespecíficas, inflamaciones vaginales, endometriosis, inflamaciones prostáticas y afecciones tras la extirpación quirúrgica de la próstata, micosis, grietas y lesiones en la mucosa vaginal y anorrectal, hemorroides, proctitis, criptitis, ragad anal, fisuras, fístulas perianales, afecciones tras cirugía proctológica, sequedad vaginal, molestias vaginales, atrofia y distrofia vaginales, coito doloroso, afecciones tras el parto, afecciones tras cirugía ginecológica y distrofia tras quimioterapia.

10 El uso farmacéutico comprende la administración de los supositorios a un sujeto humano o animal que necesite tratamiento.

Los regímenes de administración especialmente adecuados son un supositorio diario, dos supositorios diarios o un supositorio cada dos días.

#### Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1: Toxicidad del CBD en la línea celular Caco-2.

Figura 2: Toxicidad del CBD en la línea celular Ishikawa.

Figura 3: Producción de IL-6 por las células Caco-2 tras una incubación con LPS.

Figura 4: Producción de IL-8 por las células Caco-2 tras una incubación con LPS.

Figura 5: Producción de IL-6 por las células Ishikawa tras una incubación con LPS.

20 Figura 6: Producción de IL-8 por las células Ishikawa tras una incubación con LPS.

Figura 7: Curvas de disolución que muestran la liberación de hialuronato de sodio a partir de las composiciones de los ejemplos 1 y 2.

#### Ejemplos

Ejemplo 1: Composición y fabricación de supositorios

25 La dosis unitaria (un supositorio) tiene la siguiente composición:

Hialuronato de sodio	6,6	mg
Cannabidiol (CBD)	100,0	mg
Monoestearato de glicerol	66,0	mg
Grasa sólida (adepts solidus)	1814,0	mg
Agua (aqua purificata)	213,4	mg

30 La base para supositorios (monoestearato de glicerol, grasa sólida y agua) se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 30 °C, y se combina con hialuronato de sodio y cannabidiol que se agitan dentro de la base para supositorios. La mezcla resultante se vierte en moldes para supositorios y se deja enfriar o, como alternativa, se deja enfriar y se forman supositorios con la mezcla fría. Pueden formarse supositorios rectales o vaginales.

Ejemplo 2: Composición de los supositorios (ejemplo comparativo)

La dosis unitaria (un supositorio) tiene la siguiente composición:

Hialuronato de sodio	6,6	mg
Cannabidiol (CBD)	100,0	mg
Grasa sólida (adepts solidus)	2093,4	mg

El proceso de fabricación es el mismo que en el ejemplo 1, pero la base para supositorios consiste únicamente en grasa sólida.

Ejemplo 3: Ensayos de cannabidiol con células intestinales humanas (Caco-2) y células de mucosa uterina (Ishikawa)

Se utilizaron células intestinales Caco-2 y células endometriales Ishikawa humanas en un estudio *in vitro* del efecto del cannabidiol (CBD) y el hialuronato de sodio. En la primera fase del experimento, se determinó la concentración segura de CBD a partir de los resultados de las mediciones de MTT, una prueba para determinar la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) al formazán correspondiente. La prueba se realizó según M.D. Maines, L.G. Costa, D.J. Reed, *et al.*, Current protocols in toxicology, Nueva York, John Wiley & Sons (1998). Los resultados de las pruebas se muestran en las figuras 1 y 2.

Las células sembradas en una placa de 96 pocillos a una concentración de  $3 \times 10^4$  células/ml, 100  $\mu$ l/pocillo, que se dejaron adherir durante 24 horas, se incubaron posteriormente durante 24 horas con CBD en un intervalo de concentración de 100 a 0,78  $\mu$ mol/l disuelto en un medio de cultivo sin suero que contenía MEM ("Minimum Essential Medium Eagle", medio esencial mínimo de Eagle) suplementado con glutamina 2 mM, NEAA al 1 % ("Non essential Amino Acid", aminoácidos no esenciales), y penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml. Al final del periodo de incubación, se añadieron 100  $\mu$ l de mezcla de MTT (0,5 mg/ml en medio de cultivo sin suero) durante un periodo de 2 horas. Una vez finalizado el periodo de incubación y aspirada la mezcla de MTT, se añadieron 100  $\mu$ l de DMSO con  $\text{NH}_3$  (al 1 %, v/v). La absorbancia se midió a 540 nm (INFINITE M200 PRO Tecan, Schoeller). Los resultados se representan como porcentaje del control (células cultivadas únicamente con medio de cultivo sin suero). El ensayo se realizó por triplicado.

Basándose en los valores de MTT, se seleccionaron dos concentraciones subtóxicas de CBD (3 y 5  $\mu$ mol/l) y se utilizaron para determinar su efecto antiinflamatorio en células intestinales (Caco-2) y endometriales (Ishikawa) humanas.

Las células (Caco-2, Ishikawa) se sembraron en placas de 6 pocillos en medio de cultivo que contenía MEM (medio esencial mínimo de Eagle) suplementado con glutamina 2 mM, NEAA al 1 % (aminoácidos no esenciales), FBS al 10 % ("Fetal Bovine Serum", suero bovino fetal), penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml y se dejaron adherir durante un mínimo de 24 horas y luego se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia. A continuación, se enjuagaron con PBS (2 ml) y se trataron con LPS (*E. coli*) 2  $\mu$ g/ml en medio de cultivo sin suero, 2 ml por pocillo 3 veces al cabo de 3 horas. Tras las últimas 3 horas de incubación, se añadieron a las células las sustancias de ensayo (CBD, CBD + HA en medio de cultivo sin suero) y las muestras se incubaron durante 22 horas más. A continuación, se extrajo el medio de cultivo y se congeló a -80 °C para la determinación posterior de las citocinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) mediante ELISA (kit de revelado de ELISA en humanos, n.º de catálogo 900-K16 y 900-K18, PeproTech, Baria, República Checa). Los resultados se expresan en relación con un control K (células cultivadas únicamente con medio de cultivo sin suero), en forma de porcentaje del control, expresado como media  $\pm$  EEM. La medición se realizó en tres experimentos independientes. KL son células cultivadas con LPS. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Las citocinas desempeñan un papel clave en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias, y se ha demostrado que la IL-6 es la más importante. La IL-6 está implicada en el desarrollo de inflamaciones intestinales idiopáticas, tales como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa (Involvement of IL-6 in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer, R. Atreya, M. F. Neurath, Clin. Rev. Allergy Immunol., 2005, 28, 187) y es un parámetro clínicamente pertinente que se correlaciona con la actividad inflamatoria. Lo mismo ocurre con la IL-6 y la endometriosis (An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression, Y.J. Kang, I.C. Jeung, A. Park, Y.J. Park, H. Jung, T.D. Kim, H.G. Lee, I. Choi, S.R. Yoon, Hum. Reprod., 2014, 29, 2176). También se ha descubierto que otra citocina cuya concentración en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis está aumentada y su nivel se correlaciona con la gravedad de la enfermedad es la IL-8. También se afirma que la IL-8 desempeña un papel que afecta al crecimiento y mantenimiento del tejido endometrial ectópico no sólo por quimioatracción, sino también afectando directamente a la proliferación celular endometrial (Local Cytokines in Endometrial Tissue: The Role of Interleukin-8 in the Pathogenesis of Endometriosis, A. Arici, Ann. N. Y. Acad. Sci., 2002, 955, 101).

En un experimento tras la inducción de inflamación en células intestinales humanas (Caco-2) y endometriales (Ishikawa) mediante LPS y la posterior administración de ambas dosis de cannabidiol, se obtuvo una disminución significativa de los niveles de IL-6 en ambos modelos celulares (figura 3 y 5). Además, en el caso de las células Caco-2, se observó un efecto sinérgico de la combinación de CBD:HA en la reducción de la concentración de IL-6 (figura 3). Para las células IL-8 y Caco-2 (figura 4), su concentración se encuentra al mismo nivel utilizando una dosis más alta de CBD. En las células endometriales de Ishikawa, los niveles de IL-8 vuelven a disminuir con las dos dosis de CBD utilizadas. Sin embargo, las observaciones de los inventores contradicen el artículo Cannabidiol and Palmitoylethanolamide are anti-inflammatory in the acutely inflamed human colon, D. G. Couch, Ch. Tasker, E. Theophilidou, J. Lund, S. E. O'Sullivan, Clin. Sci. (Lond.), 2017, 131, 2611, cuyos autores observaron el efecto contrario en el caso de la IL-6 y el modelo Caco-2, es decir, un aumento de su concentración en más de un 70 % respecto al valor original tras la inducción de la inflamación. En conclusión, los experimentos de los inventores mostraron el efecto antiinflamatorio de ambas dosis de cannabidiol, demostrablemente en la perspectiva temporal más larga de 24 horas

de incubación. Además, se demostró un efecto sinérgico del CBD con el hialuronato de sodio para las células Caco-2 y la IL-6.

#### Ejemplo 4: Prueba de disolución - liberación de hialuronato de sodio

Se utilizó un procedimiento de disolución en cesta para determinar la liberación de hialuronato de sodio de las formulaciones de los ejemplos 1 y 2, correspondiente a una dosis de 6,6 mg/unidad de dosis. La temperatura del medio fue de  $37 \pm 0,5$  °C, la velocidad de la cesta fue de 100/min. El supositorio se colocó en una cesta y se introdujo en un recipiente con tampón fosfato de pH 7,0. Se tomaron muestras a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 45 minutos. El volumen eliminado se compensó añadiendo el tampón. Las curvas de disolución se muestran en la figura 7. La velocidad de liberación de hialuronato de sodio de la formulación del ejemplo 1 es significativamente más rápida, a partir de los 15 minutos, en comparación con la formulación del ejemplo 2. Después de 45 minutos, todo el hialuronato de sodio se liberó de la formulación 1, mientras que de la formulación 2 sólo se liberó el 20 % del hialuronato de sodio. Los resultados demuestran que, para una liberación eficaz del hialuronato de sodio, es esencial que la formulación contenga agua (véase el ejemplo 1). El hialuronato de sodio sólo dispersado en un medio lipófilo no muestra propiedades de disolución adecuadas (véase el ejemplo 2).

#### Ejemplo 5: Ensayo de irritabilidad cutánea

La prueba se realizó de acuerdo con la norma ČSN EN ISO 10993-10: 2010, parte 10. Se ensayaron muestras de supositorios preparados según el ejemplo 1. Se realizaron pruebas a 30 voluntarios humanos. Se aplicaron 50 mg del material de ensayo sobre un disco de gasa de 1,8 cm de diámetro de una cámara cerrada (IQ Ultra Patch Test Chambers, Chemotechnical Diagnostics Sweden) en la parte superior externa del brazo humedecido con agua. Se mantuvo el tiempo de exposición prescrito. Tras retirar la almohadilla y evaluar la prueba, se enjuagó la piel y se limpió con agua corriente. La observación clínica y la clasificación se realizaron inmediatamente después de la retirada de la gasa, y a intervalos de 2 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la retirada de la gasa.

Además, se aplicó un control positivo de laurilsulfato de sodio al 20 % (en peso) en una cantidad de 0,4 ml sobre un disco de gasa de 1,8 cm de diámetro de una cámara cerrada (IQ Ultra Patch Test Chambers, Chemotechnical Diagnostics Sweden) en la parte externa del brazo humedecido con agua. Se utilizó el tiempo de exposición prescrito. Tras retirar la almohadilla y evaluar la prueba, se enjuagó la piel y se limpió con agua corriente. La observación clínica y la clasificación se realizaron inmediatamente después de la retirada de la gasa, y a intervalos de 2 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la retirada de la gasa.

La reacción se clasifica mediante los números 0 - sin reacción; 1 - reacción débilmente positiva; 2 - reacción ligeramente positiva; 3 - reacción fuertemente positiva.

Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

Ninguno de los 30 voluntarios mostró ninguna reacción cutánea adversa al producto de ensayo. La totalidad de los 30 voluntarios mostraron una reacción cutánea al control positivo.

Tabla 1: Ensayo de irritabilidad cutánea - supositorios de prueba

Voluntario			Intervalo de lectura					
			TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 15 min/30 min/1 h/2 h/3 h/4 h					
			Clasificación de las reacciones cutáneas tras:					Reacción
Orden	Edad	Sexo	0 h	2 h	24 h	48 h	72 h	sí/no
1	45	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
2	40	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
3	39	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
4	40	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
5	54	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
6	42	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO

# ES 3 023 559 T3

Voluntario			Intervalo de lectura					
			TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 15 min/30 min/1 h/2 h/3 h/4 h					
			Clasificación de las reacciones cutáneas tras:					Reacción
Orden	Edad	Sexo	0 h	2 h	24 h	48 h	72 h	sí/no
7	43	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
8	50	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
9	44	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
10	47	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
11	53	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
12	37	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
13	34	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
14	27	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
15	44	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
16	35	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
17	47	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
18	49	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
19	69	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
20	45	F	000000	000000	000000	000000	000000	NO
21	42	M	000000	000000	000000	000000	000000	NO
22	46	M	000000	000000	000000	000000	000000	NO
23	42	M	000000	000000	000000	000000	000000	NO
24	45	M	000000	000000	000000	000000	000000	NO
25	54	M	000000	000000	000000	000000	000000	NO
26	54	M	000000	000000	000000	000000	000000	NO
27	51	M	000000	000000	000000	000000	000000	NO
28	36	M	000000	000000	000000	000000	000000	NO
29	49	M	000000	000000	000000	000000	000000	NO
30	29	M	000000	000000	000000	000000	000000	NO
Número total de reacciones			000000	000000	000000	000000	000000	30/30

# ES 3 023 559 T3

Tabla 2: Ensayo de irritabilidad cutánea - control positivo

Voluntario			Intervalo de lectura					
			TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 15 min/30 min/1 h/2 h/3 h/4 h					
			Clasificación de las reacciones cutáneas tras:					Reacción
Orden	Edad	Sexo	0 h	2 h	24 h	48 h	72 h	sí/no
1	45	F	001111	000111	000011	000001	000000	SÍ
2	40	F	000001	000001	000000	000000	000000	SÍ
3	39	F	00112	000111	000011	000000	000000	SÍ
4	40	F	000112	001222	001122	000111	000011	SÍ
5	54	F	000111	000012	000011	000011	000000	SÍ
6	42	F	000011	000112	000011	000001	000000	SÍ
7	43	F	000001	000111	000111	000001	000000	SÍ
8	50	F	000011	000012	000001	000000	000000	SÍ
9	44	F	000001	000111	000111	000001	000000	SÍ
10	47	F	011122	001112	001112	000011	000001	SÍ
11	53	F	000011	000011	000001	000000	000000	SÍ
12	37	F	000000	000001	000000	000000	000000	SÍ
13	34	F	001111	011111	000111	000011	000000	SÍ
14	27	F	000112	000111	000011	000001	000000	SÍ
15	44	F	000012	000111	000011	000001	000000	SÍ
16	35	F	001111	000011	000001	000000	000000	SÍ
17	47	F	000122	000112	000111	000011	000001	SÍ
18	49	F	000011	000011	000001	000000	000000	SÍ
19	69	F	000001	001111	000111	000001	000001	SÍ
20	45	F	000112	000111	000011	000000	000000	SÍ
21	42	M	000001	000012	000011	000001	000000	SÍ
22	46	M	011111	011112	000111	000011	000001	SÍ
23	42	M	000011	000011	000001	000000	000000	SÍ



Voluntario			Intervalo de lectura					
			TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 15 min/30 min/1 h/2 h/3 h/4 h					
			Clasificación de las reacciones cutáneas tras:					Reacción
Orden	Edad	Sexo	0 h	2 h	24 h	48 h	72 h	sí/no
24	45	M	000112	001111	000011	000001	000000	SÍ
25	54	M	000011	000111	000111	000011	000000	SÍ
26	54	M	000111	001222	000112	000001	000001	SÍ
27	51	M	000011	000011	000001	000000	000000	SÍ
28	36	M	000011	000111	000001	000000	000000	SÍ
29	49	M	001112	000111	000011	000001	000000	SÍ
30	29	M	000001	000001	000000	000000	000000	SÍ
Número total de reacciones			0/2/6/14/23/29	0/2/7/19/27/30	0/0/2/10/20/27	0/0/0/1/7/18	0/0/0/0/1/6	30/30

## Ejemplo 6: Ensayo de citotoxicidad

En el ensayo de citotoxicidad se utilizaron fibroblastos de ratón Balb/c 3T3-L1 (ECACC 86052701). Las células se cultivaron en medio D-MEM (modificación de Dulbecco del medio mínimo esencial de Eagle, Lonza) que contenía antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 ug/ml), enriquecido con suero de ternera inactivado al 10 %, pH 7,2.

Se ensayaron supositorios preparados según el ejemplo 1. El control positivo (PK) fue laurilsulfato de sodio (SLS), y el control celular fue medio de cultivo sin suero.

El extracto de supositorio se preparó en la proporción de 0,2 g de muestra por 1 ml de agente extractor (D-MEM libre de suero) según la norma ČSN EN ISO 10993-12 (2012). La extracción se realizó durante 24 horas a 37 °C, en un matraz de cultivo cerrado en condiciones asépticas de acuerdo con la norma ČSN EN ISO 10993-5 (2012). El extracto resultante al 100 % se diluyó de nuevo con medio de cultivo sin suero.

Se utilizaron placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 8x12 pocillos para cultivar las células. Las células se suspendieron en una concentración de  $10^5$  células en 1 ml del medio de cultivo, inoculando 0,1 ml de la suspensión en 1 pocillo. Condiciones de cultivo 37 °C, 7,5 % de CO<sub>2</sub>. El precultivo para obtener una monocapa de cultivo celular se realizó 24 horas antes de la exposición al material de ensayo. Los cultivos se establecieron en cuartetos para los extractos de ensayo y para los controles. Tras 24 horas de precultivo, el medio de cultivo y 0,2 ml del extracto de la muestra problema, o su dilución en serie, respectivamente. A continuación, se cultivó durante 24 horas a 37 °C, 7,5 % de CO<sub>2</sub> y se tiñó con rojo neutro (0,2 ml de solución de rojo neutro por pocillo, incubación durante 3 horas, solución de fijación de etanol/ácido acético). Una vez finalizado el cultivo, se determinó cuantitativamente (fluorimétricamente) la citotoxicidad a partir de la incorporación de rojo neutro como colorante vital.

El procedimiento fluorimétrico para determinar la citotoxicidad se basa en la incorporación de un colorante vital en células vivas y la detección de fluorescencia en un sistema de filtro de excitación (530 nm) y emisión (590 nm) utilizando luz fría. El grado de citotoxicidad se expresa en porcentaje de la fluorescencia detectada en el cultivo que contiene el extracto de ensayo en relación con el cultivo de control en ausencia del extracto de ensayo. La fluorescencia se detecta en unidades FSU de intensidad de fluorescencia. Para la cuantificación, la viabilidad del cultivo se calcula del siguiente modo:

Viabilidad del cultivo (%) = (FSU promedio de la muestra de ensayo - FSU promedio del blanco)/(FSU promedio del control - FSU promedio del blanco)

Los valores medios de fluorescencia para cada grupo representan el valor promedio de fluorescencia de los cuatro pocillos después de restar el valor promedio de fluorescencia de los ocho pocillos con solución de fijación (blanco). El control es un medio de cultivo sin suero.

La prueba se repitió dos veces. Los datos de ambas repeticiones figuran en las tablas siguientes:

Prueba 1

Dilución de la muestra	Fluorescencia media (FSU)	% en relación con el control
VZ 3/19/182		
10 %	2894,9	104,3
25 %	2927,9	105,5
50 %	2227,9	80,3
100 %	1757,9	63,3
PK - SLS		
1 µg/ml	2743,4	98,8
10 µg/ml	891,1	32,1
20 µg/ml	113,9	16,0

Prueba 2

Dilución de la muestra	Fluorescencia media (FSU)	% en relación con el control
VZ 3/19/182		
10 %	3558,8	110,4
25 %	3459,8	107,4
50 %	3465,3	107,5
100 %	2046,8	63,5
PK - SLS		
1 µg/ml	3187,8	98,9
10 µg/ml	542,5	16,8
20 µg/ml	326,3	10,1

5

Con la concentración máxima del extracto y el tiempo de contacto de 24 horas, se descubrió un ligero grado de citotoxicidad en la línea celular de ratón *in vitro*, y, con diluciones adicionales, el extracto fue completamente tolerado por el cultivo celular. Debido al mayor tiempo de contacto en comparación con el tiempo de contacto habitual en el uso de supositorios, el uso en células libres y la eliminación de la liberación gradual (las células se cultivaron directamente en el extracto completo), la leve citotoxicidad *in vitro* de la composición puede considerarse segura, con respecto a otras pruebas positivas. Además, se supone que la citotoxicidad en este ensayo se debe, al menos en parte, al medio lipófilo.

10

# REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica en forma de supositorio, que contiene cannabidiol, ácido hialurónico, o una sal del mismo, y una base para supositorios que contiene grasa sólida, agua y al menos un mono(acil C10-C30)glicerol o di(acil C10-C30)glicerol.
- 5 2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, que contiene del 0,1 al 5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, y del 2 al 30 % p/p de cannabidiol.
3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, que contiene del 0,2 al 0,5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, y del 3 al 14 % p/p de cannabidiol.
- 10 4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, que contiene del 0,2 al 0,5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, y del 3 al 6 % p/p de cannabidiol.
5. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la sal de ácido hialurónico es hialuronato de sodio.
6. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene del 5 al 20 % p/p, preferentemente del 7 al 15 % p/p de agua.
- 15 7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la base para supositorios contiene grasa sólida, agua y monoestearato de glicerol.
8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, que contiene del 0,1 al 5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, del 2 al 30 % p/p de cannabidiol, del 2 al 10 % p/p de monoestearato de glicerol, del 5 al 15 % p/p de agua, siendo el resto grasa sólida.
- 20 9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, que contiene del 0,2 al 0,5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, del 3 al 14 % p/p de cannabidiol, del 2 al 10 % p/p de monoestearato de glicerol, del 5 al 15 % p/p de agua, siendo el resto grasa sólida.
10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, que contiene del 0,2 al 0,5 % p/p de ácido hialurónico o una sal del mismo, del 3 al 6 % p/p de cannabidiol, del 2 al 5 % p/p de monoestearato de glicerol, del 7 al 12 % p/p de agua, siendo el resto grasa sólida.
- 25 11. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso como medicamento.
12. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en la regeneración y/o la curación de tejidos dañados, o en el alivio y/o la mitigación del dolor y la inflamación, o en el alivio de los síntomas asociados con la menopausia y/o el síndrome premenstrual.
- 30 13. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre inflamaciones intestinales, inflamaciones intestinales inespecíficas, inflamaciones vaginales, endometriosis, inflamaciones prostáticas y afecciones tras la extirpación quirúrgica de la próstata, micosis, grietas y lesiones en la mucosa vaginal y anorrectal, hemorroides, proctitis, criptitis, ragad anal, fisuras, fístulas perianales, afecciones tras cirugía proctológica, sequedad vaginal, molestias vaginales, atrofia y distrofia vaginal, coito doloroso, afecciones tras el parto, afecciones tras cirugía ginecológica y distrofia tras quimioterapia; en la prevención y/o el tratamiento de reacciones cutáneas/en tejidos inducidas por la radiación; o en la preparación del endometrio para que sea receptivo tras la implantación de uno o más embriones en la cavidad uterina en tecnologías de reproducción asistida.
- 35 14. Una composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que el uso incluye una pauta posológica seleccionada entre un supositorio diario, dos supositorios diarios y un supositorio cada dos días.
- 40

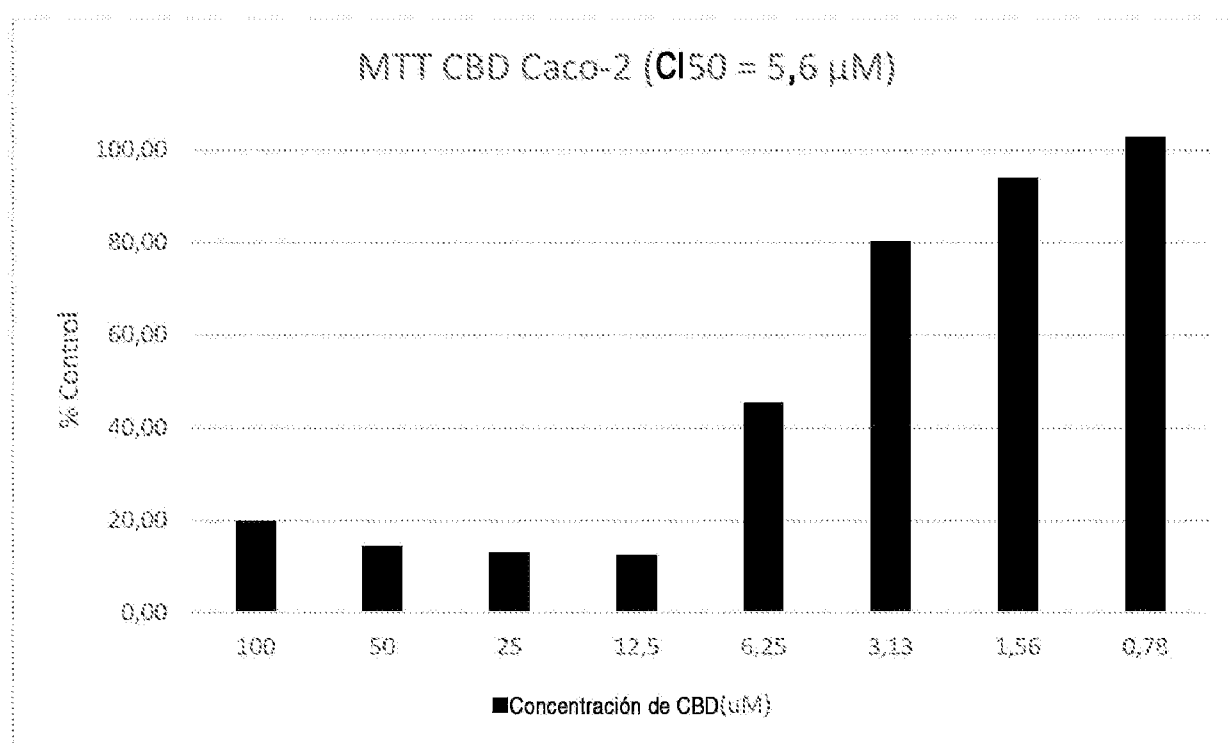


Fig. 1

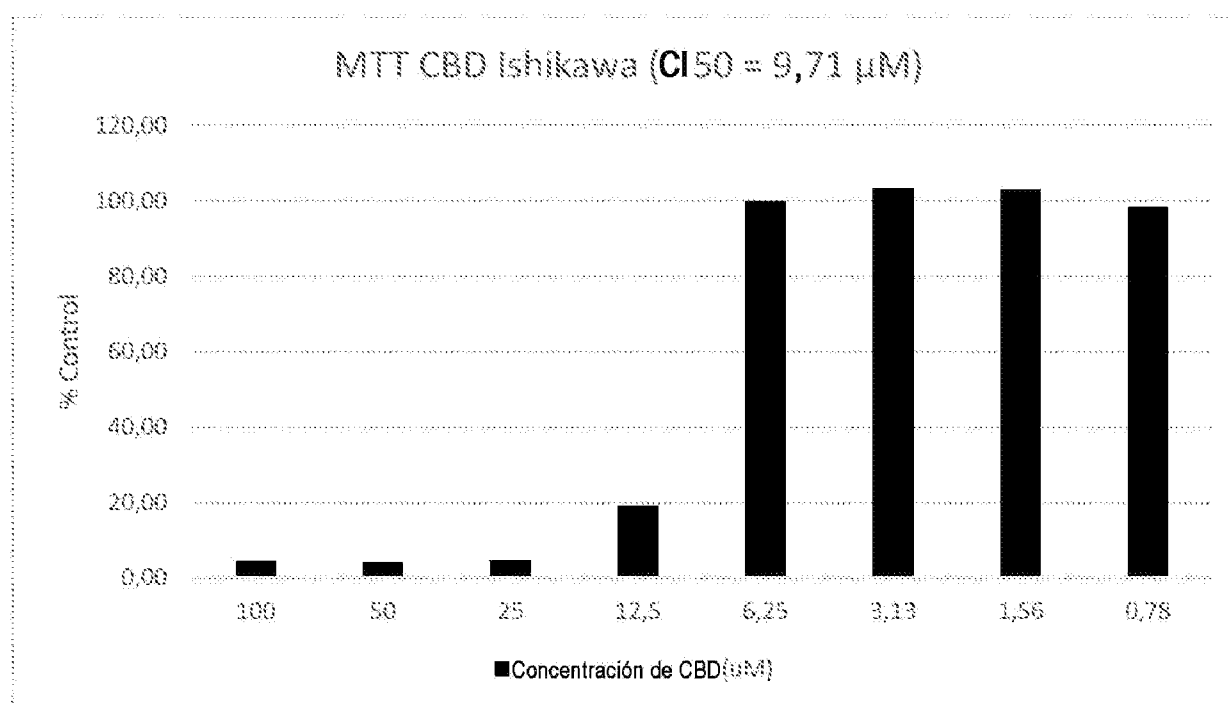


Fig. 2

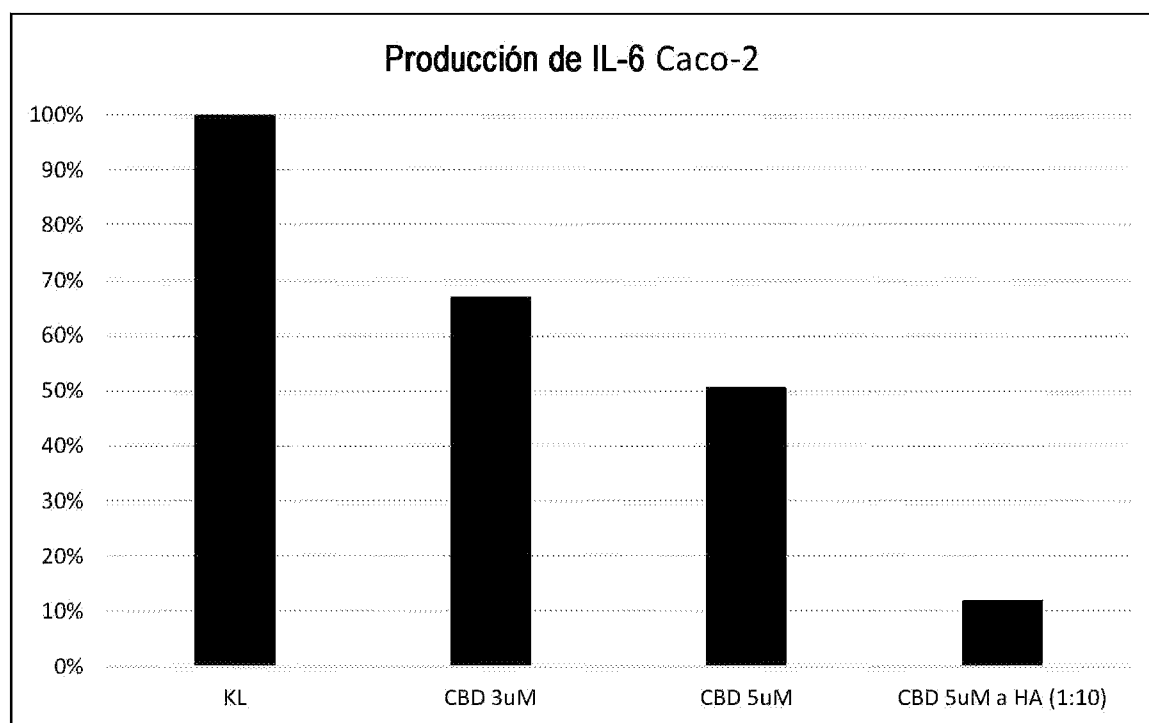


Fig. 3

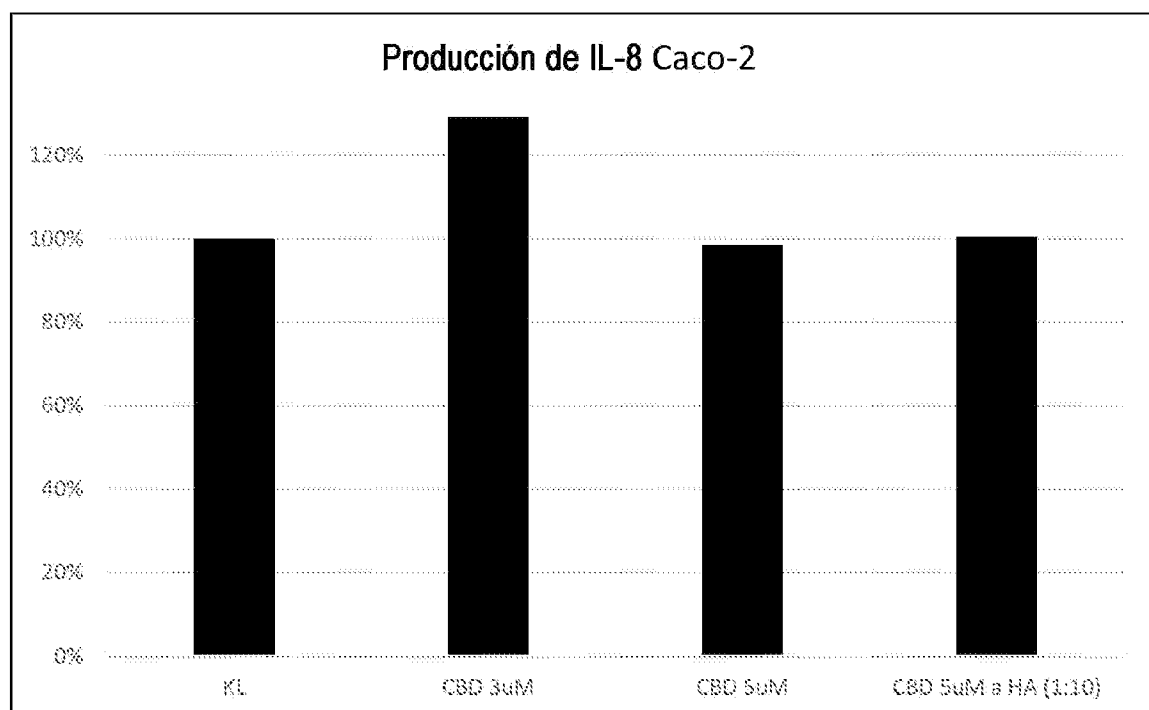


Fig. 4

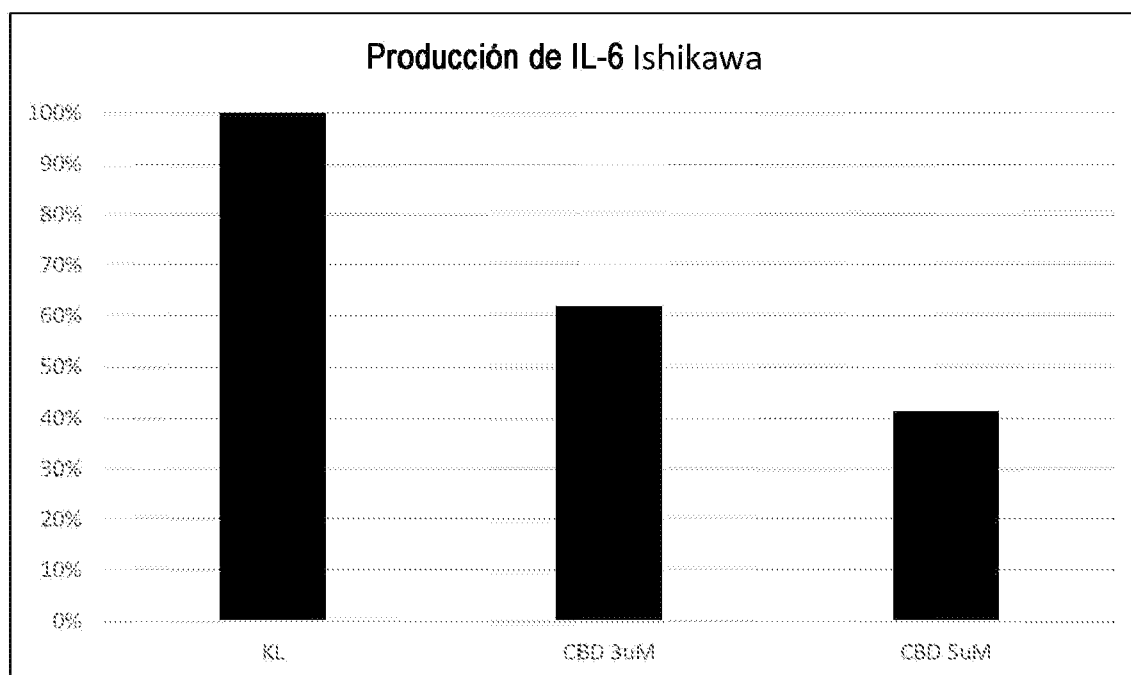


Fig. 5

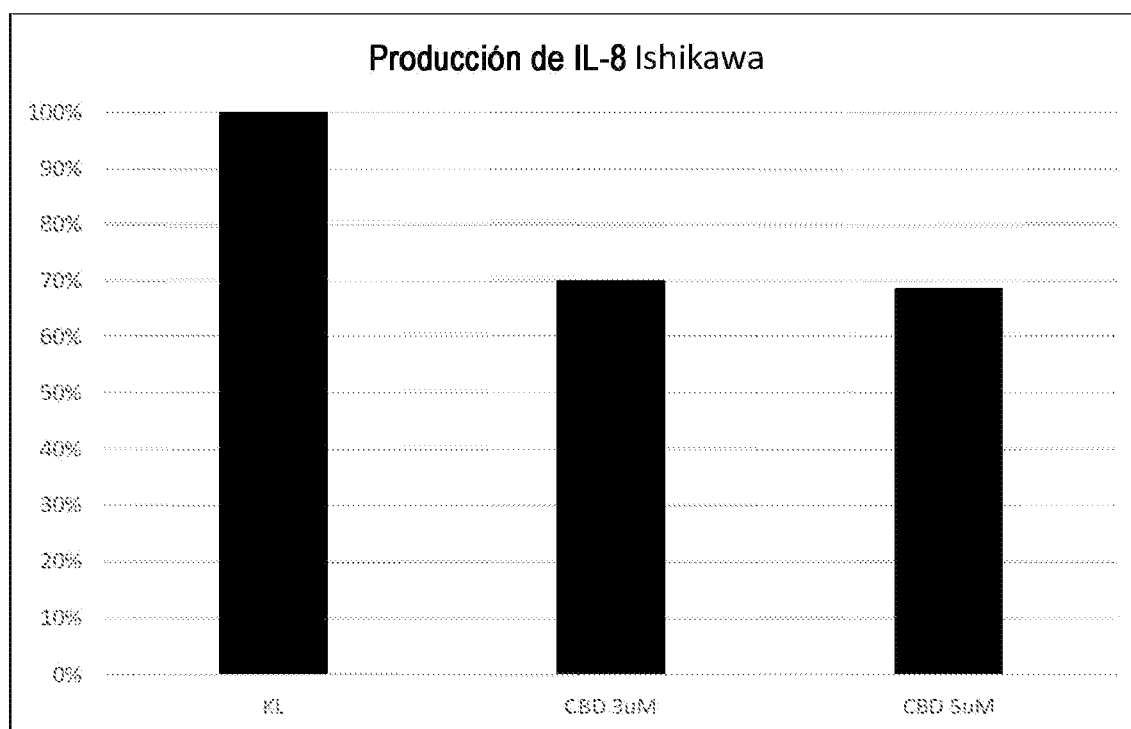


Fig. 6

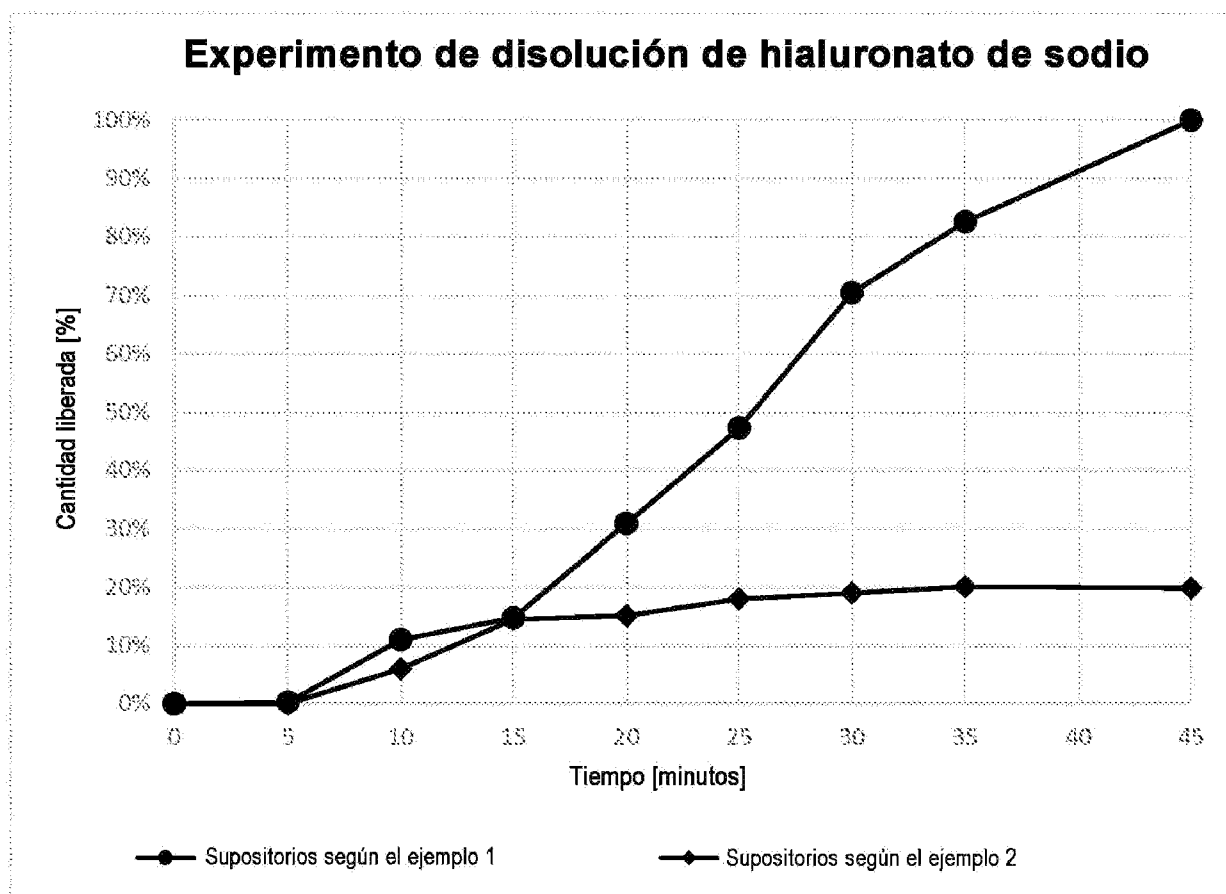


Fig. 7