



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0913384-4 A2



(22) Data do Depósito: 04/06/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 04/08/2020

(54) Título: EFEITOS ANTITUMORAIS DE COMBINAÇÕES DE CANABINÓIDES

(51) Int. Cl.: A61K 31/353; A61K 31/05; A61K 45/06; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 04/06/2008 GB 0810195.8.

(71) Depositante(es): GW PHARMA LIMITED; OTSUKA PHARMACEUTICAL CO, LTD..

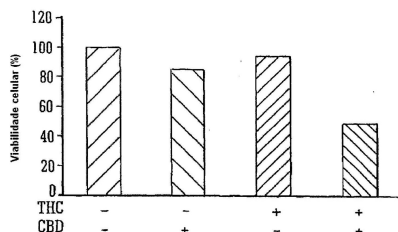
(72) Inventor(es): GUILLERMO VELASCO DIEZ; MANUEL GUZMAN PASTOR; MAR LORENTE; SOFIA TORRES; FATIMA RODRIGUEZ.

(86) Pedido PCT: PCT GB2009050621 de 04/06/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/147439 de 10/12/2009

(85) Data da Fase Nacional: 03/12/2010

(57) Resumo: EFEITOS ANTITUMORAIS DE COMBINAÇÕES DE CANABINÓIDES. A invenção refere-se ao uso de uma combinação de canabinóides, particularmente, tetraidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD), na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer. Em particular, o câncer a ser tratado é um tumor cerebral, mais particularmente, um glioma, ainda mais particularmente, um glioblastoma multiforme (GBM).



EFEITOS ANTITUMORAIS DE COMBINAÇÕES DE CANABINÓIDES

A presente invenção refere-se ao uso de uma combinação de canabinóides na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer. Em particular, o câncer a ser tratado é um tumor cerebral, mais particularmente, um glioma, ainda mais particularmente, um glioblastoma multiforme (GBM) e a combinação de canabinóide preferencial compreendem tetraidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD).

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O câncer é uma doença na qual um grupo de células exibe traços de crescimento descontrolado. Isto significa que as células crescem e se dividem além dos níveis dos limites normais. As células também são capazes de invadir e destruir tecidos circundantes. Além disso, as células cancerígenas, algumas vezes chamadas de metástase, significando que estas se espalham para outros locais no corpo através do sangue ou linfa.

A maioria dos cânceres é causada por anormalidades no material genético das células. Estas anormalidades podem ocorrer devido aos efeitos de carcinógenos. Outras anormalidades genéticas promotoras de câncer podem ser aleatoriamente adquiridas através de erros na replicação de DNA ou são herdadas, e, dessa forma, presentes em todas as células desde o nascimento.

As anormalidades genéticas encontradas no câncer tipicamente afetam duas classes gerais de genes. Os oncogenes promotores de câncer são frequentemente ativados em células cancerígenas, dando a estas células novas propriedades, tais como divisão e crescimento hiperativo, proteção contra morte celular programada, perda de respeito

por limites teciduais normais, e a capacidade de se tornarem estabilizadas em diversos ambientes teciduais. Os genes supressores de tumor são frequentemente inativados em células cancerígenas, resultando na perda de funções normais naquelas células, tais como replicação de DNA acurada, controle sobre o ciclo celular, orientação e adesão no interior de tecidos, e interação com células protetoras do sistema imunológico.

Existem muitos tipos diferentes de câncer e o câncer é usualmente classificado de acordo com o tipo de tecido do qual é originado.

O câncer é usualmente tratado por um ou mais dos seguintes: cirurgia, quimioterapia, terapia com radiação, imunoterapia e terapia com anticorpo monoclonal. O tipo de terapia depende do local e do grau do tumor e do estágio da doença.

A remoção completa do câncer sem dano ao resto do corpo é o objetivo do tratamento. Algumas vezes isto pode ser realizado por cirurgia, mas a propensão de cânceres em invadir tecido adjacente ou se espalhar para sítios distantes por metástase microscópica frequentemente limita sua eficácia. A eficácia da quimioterapia é frequentemente limitada pela toxicidade a outros tecidos no corpo. A radiação também causa dano ao tecido normal.

Os cânceres são conhecidos por afetarem muitas áreas do corpo com os tipos mais comuns de cânceres incluindo: câncer do tubo bílico, câncer de bexiga, câncer ósseo, câncer de intestino (incluindo câncer do cólon e câncer retal), câncer cerebral, câncer de mama, câncer do sistema neuroendócrino (comumente conhecido como um

carcinóide), câncer de cérvix, câncer ocular, câncer do esôfago, câncer da cabeça e de pescoço (este grupo inclui carcinomas que começam nas células que formam o revestimento da boca, nariz, garganta, orelha ou a camada superficial que cobre a língua), sarcoma de Kaposi, câncer renal, câncer da laringe, leucemia, câncer hepático, câncer pulmonar, câncer dos nós de linfa, linfoma de Hodgkin, linfoma de não Hodgkin, melanoma, mesotelioma, mieloma, câncer do ovário, câncer do pâncreas, câncer do pênis, 5 câncer da próstata, câncer de pele, sarcomas de tecido mole, câncer da medula espinhal, câncer do estômago, câncer testicular, câncer de tireóide, câncer vaginal, câncer da vulva e câncer de útero. 10

Um tumor que se desenvolve no cérebro pode destruir ou danificar as células cerebrais através da produção de inflamação, comprimindo outras partes do cérebro, induzindo o edema cerebral (inchaço cerebral) e podendo causar aumento na pressão intracraniana (pressão no interior do crânio). 15

A cada ano, aproximadamente 4300 pessoas no Reino Unido são diagnosticadas com um tumor cerebral. Um tumor cerebral primário é uma massa criada pelo crescimento ou proliferação descontrolada de células no cérebro. Os tumores cerebrais primários malignos são mais propensos a causar problemas através do espalhamento no tecido cerebral normal que circunda os mesmos e causando pressão e dano às áreas circundantes do cérebro. Estes tumores raramente se espalham para fora do cérebro, para outras partes do corpo. Entretanto, os tumores cerebrais secundários ocorrem quando 25 as células cancerígenas de outras partes do corpo, tais 30

como pulmão ou seio se espalham para o cérebro.

A cirurgia é a opção de tratamento escolhida para muitos tumores cerebrais. Alguns podem ser completamente excisados, mas aqueles que são profundos ou que infiltram
5 no tecido cerebral podem ter seu volume reduzido em vez de removidos.

A terapia com radiação e a quimioterapia podem ser recomendadas dependendo do tipo de tumor envolvido.

Os tumores celulares de glioma podem frequentemente
10 ser letais. O crescimento tumoral infiltrador difundido característico de gliomas frequentemente torna a remoção cirúrgica dos mesmos impossível e complicando profundamente o gerenciamento clínico destes pacientes.

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais comum e
15 o tipo mais agressivo de tumor cerebral primário e corresponde a 52% de todos os casos de tumor cerebral primário e 20% de todos os tumores intracranianos.

Diferentes abordagens estão sendo pesquisadas a fim de melhorar a taxa de mortalidade de pacientes diagnosticados
20 com um glioma. Estas incluem terapias que têm como alvo as células de glioma, mas deixam as células normais não danificadas, métodos que limitam o espalhamento das células cancerígenas e tratamentos que bloqueiam as moléculas de sobrevivência dos tumores.

25 Uma área de pesquisa envolve o uso de canabinóides como agentes antitumorais.

Os canabinóides são constituintes ativos de plantas cânabis e concluiu-se que os mesmos demonstram diversas propriedades farmacológicas.

30 Por exemplo, o documento EP1177790 (Guzman et al.)

descreve o tratamento de tumores cerebrais pela administração de um canabinóide natural ou sintético, especificamente THC. Isto reivindica que a ativação de receptores específicos leva à morte seletiva das células transformadas.

Recentemente, o canabinóide CBD tem mostrado que possui propriedades antitumorais (Massi et al. 2004). O trabalho descrito por este documento descreve efeitos antiproliferativos com o uso in-vitro de em linhagens de células de glioma humano U87 e U373 e com o uso in-vivo de células de glioma humano U87 subcutaneamente implantadas em camundongos nus.

Os gliomas malignos são tumores altamente infiltradores e proliferativos, que seguem um padrão característico de crescimento. As células de glioma invadem as estruturas cerebrais normais adjacentes e vasos sanguíneos grandes circundantes.

Além disso, a patente anterior do depositante EP1802274 descreve o uso do canabinóide CBD para impedir o progresso de células cancerígenas que migram de seu local do tumor primário para um sítio secundário.

Adicionalmente, Medical hypothesis (2006) vol. 66, páginas 234 a 246 discute os efeitos clínicos e fisiológicos de THC e CBD e apresenta um raciocínio para sua combinação. Sob "neoplastic disease" (página 242) é atestado que o THC tem benefícios citotóxicos e que CBD também provou apresentar citostático/citotóxico. Sugere-se, em vista dos efeitos analgésicos da combinação CBD:THC no tratamento do câncer, o benefício colateral de THC e CBD na náusea induzida por quimioterapia, e estes efeitos

primários sobre o crescimento e espalhamento do tumor que apresentam um forte argumento para ensaios clínicos adicionais. Entretanto, a generalidade deste ensinamento não poderia prever os benefícios que poderiam ser alcançados em combinação com o que, de outro modo, seria considerado sub-ideal (ou quantidades não efetivas) para o composto sozinho.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, é fornecido o uso de uma combinação de canabinóides na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer.

De preferência, os canabinóides compreendem ao menos tetraidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD).

De preferência, o THC e o CBD estão a uma razão entre 20:1 e 1:20 (THC:CBD).

Mais preferencialmente, o THC e o CBD estão a uma razão entre 5:1 e 1:5 (THC:CBD).

Mais preferencialmente, ainda, o THC e o CBD estão a uma razão entre 2:1 e 1:2, ainda mais preferencialmente, aproximadamente 1:1.

Cada canabinóide é fornecido em uma quantidade terapeuticamente efetiva. As faixas de dosagem para o THC e o CBD podem ser determinadas por referência ao teor de canabinóide que está, de preferência, na faixa entre 5 e 100 mg do total de canabinóides.

O câncer a ser tratado pode ser um tumor cerebral.

Os tumores cerebrais são usualmente classificados de acordo com o local do tumor e o tipo de célula na qual o câncer começou a se desenvolver. Por exemplo, diferentes tipos de tumor cerebral incluem: neuroma acústico,

astrocitoma, linfoma do CNS, ependimoma, hemangioblastoma, meduloblastoma, meningioma, glioma, glioma misto, oligodendroglioma, tumores da região pineal e tumores pituitários.

5 Os gliomas são tumores das células gliais; estas células suportam e protegem as células nervosas no cérebro. Os gliomas compreendem quase metade de todos os tumores cerebrais primários e um quinto de todos os tumores da medula espinhal primários.

10 A combinação de canabinóide da invenção é particularmente útil onde o tumor cerebral for um tumor glioma, mais particularmente, glioblastoma multiforme (GBM).

Os um ou mais canabinóides podem estar presentes como 15 extratos vegetais, como compostos puros ou uma combinação dos dois.

Um extrato vegetal é definido como um extrato de um material vegetal conforme descrito por Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, August 20 2000, do US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research.

O material vegetal é definido como um vegetal ou parte do vegetal (por exemplo, casca, madeira, folhas, caules, 25 raízes, flores, frutos, sementes, bagas ou partes dos mesmos) bem como extrudados.

Mais preferencialmente, o extrato vegetal está na forma de uma substância de droga botânica.

As substâncias de droga botânica são derivadas de 30 plantas cânabis e incluem extratos primários preparados por

tais processos como, por exemplo, maceração, percolação, extração com solventes tais como alcoóis C1 a C5 (por exemplo, etanol), Norflurano (HFA134a), HFA227, dióxido de carbono líquido sob pressão e extração com o uso de um gás quente. Um extrato primário pode ser purificado adicionalmente através da extração, vaporização e cromatografia supercrítica ou subcrítica. Quando os solventes tais como aqueles mencionados acima são usados, o extrato resultante pode conter material solúvel em lipídeo não específico. Isto pode ser removido por uma variedade de processos incluindo "winterização", que envolve resfriamento para -20° C seguido pela filtração para remover cascalho ceroso, extração com dióxido de carbono líquido e destilação.

As substâncias de droga botânica são formuladas em Produtos de Droga Botânica (Botanical Drug Products) que são definidas no Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, August 2000, do US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research como: "A botanical product that is intended for the use as a drug; a drug product that is prepared from a botanical drug substance."

Um ou mais canabinóides podem ser administrados separada, sequencial ou simultaneamente entre si.

Certos aspectos desta invenção são descritos adicionalmente, somente por meio de exemplo, com referência aos desenhos em anexo, nos quais:

A Figura 1 é um gráfico em barras que mostra a viabilidade celular de células humanas de astrocitoma U87 MG após o tratamento com THC, CBD ou uma combinação de THC

e CBD em comparação com um controle;

As Figuras 2a e 2b são gráficos em barras que mostram dados de viabilidade celular *in vivo* em diferentes concentrações em duas linhagens de célula, U87MG (Figura 5 2a) e T98G (Figura 2b); e

As Figuras 3a, 3b e 3c fornecem dados sugestivos do mecanismo de ação da combinação para as células U87MG.

DESCRIÇÃO ESPECÍFICA

Os seguintes exemplos descrevem experimentos 10 empregados para confirmar o efeito de combinações de canabinóides como agentes antitumorais.

Exemplo 1: Efeito de THC e CBD na inibição de crescimento de célula de câncer *in vitro*.

Tetraidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD) na forma 15 de extratos vegetais de cânabis foram dissolvidos em etanol a uma concentração de 100 mM, isto foi armazenado a -20 °C até necessário.

Antes do uso, os extratos vegetais de cânabis foram diluídos adicionalmente até a concentração desejada, 20 assegurando que a concentração de etanol estivesse abaixo de 0,001%.

As células humanas de glioma U87 foram usadas por todo este experimento. As células foram mantidas a 37° C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar.

25 As células foram cultivadas em um frasco de cultura de 75 cm² em Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), que foi suplementado com 4mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais e 10% de soro 30 bovino fetal desativado por calor.

A viabilidade das células humanas de astrocitoma U87 MG foram examinadas em várias concentrações de canabinóide. Os extratos de THC e CBD foram comparados com THC e CBD puros.

5 Resultados:

Tabela 1: Viabilidade celular de células humanas de astrocitoma U87 MG em cultura

	IC50 (canabinóides puros) μM	IC50 (extrato de planta cânabis) μM	IC50 (equivalente de puro de extrato de planta cânabis) μM
THC	0,37	0,64	0,43
CBD	0,47	0,72	0,47

Conforme pode ser visto a partir da Tabela 1 acima, os extratos de THC e CBD se comparam muito favoravelmente em 10 atividade com seus compostos puros correspondentes, quando a quantidade de canabinóide no extrato é ajustada para uma quantidade equivalente de composto puro.

Isto mostra que o THC e o CBD, e seus extratos são efetivos na inibição de crescimento de célula de glioma.

15 Exemplo 2: Efeito de uma combinação de extratos de THC e CBD na inibição de crescimento de célula de câncer in vitro.

Este experimento testou se uma combinação de extratos de THC e CBD foram tão efetivas na inibição do crescimento 20 celular quanto os extratos sozinhos. Os métodos usados foram descrito no Exemplo 1 acima.

Resultados:

A Figura 1 detalha um gráfico em barras que descreve a viabilidade celular de células humanas de astrocitoma U87

MG versus os extratos de THC e CBD sozinhos e em combinação um com o outro.

Conforme pode ser visto, quando o THC e o CBD são usados em combinação, a viabilidade celular é significativamente reduzida em comparação à viabilidade celular após o tratamento com THC ou CBD sozinho.

Estes dados sugerem que o THC e o CBD dos canabinóides seriam mais efetivos no tratamento de tumores quando usados em combinação.

10 Exemplo 3: Efeito de uma combinação de THC e CBD na inibição do crescimento de célula de câncer in vivo.

Este experimento testou se a combinação de extratos de THC e CBD também foi efetiva in vivo.

15 As células humanas de astrocitoma U87 MG foram xenoenxertadas em camundongos nus e os compostos de teste foram injetados peritumoralmente a uma concentração de 15 mg/kg por dia.

Resultados:

20 Tabela 2: Volume de tumor em relação ao tempo zero após 15 dias de tratamento.

	Volume de tumor
Veículo	9,2 ± 0,6
THC puro	5,1 ± 0,4
Extrato de THC	6,6 ± 0,3
Extrato de THC:CBD (1:1)	4,8 ± 0,3

Conforme pode ser observado na Tabela 2 acima, o volume de tumor após o tratamento com a combinação 1:1 de extratos de THC e CBD é significativamente superior ao tratamento com o THC puro ou o extrato de THC sozinho.

25 Estes dados sugerem que o THC e o CBD de canabinóides

seriam mais efetivos no tratamento de tumores quando usados em combinação.

Exemplo 4: Efeito de concentração de canabinóide sobre viabilidade celular em duas linhagens de célula diferentes.

5 A ação de THC, CBD, e uma mistura com razão 1:1 de THC e CBD foi estudada em diferentes concentrações em duas linhagens de célula: U87MG e T98G. Os dados de viabilidade celular são ilustrados nas Figuras 2a e 2b.

Referindo-se à Figura 2a, será observado que doses não 10 efetivas/sub-ideal de THC e CBD em 0,1 ug/ml e 0,25 ug/ml (maior que 90% de viabilidade celular) possibilitam uma diminuição estatisticamente significativa em viabilidade celular em combinação (SAT), cujos dados mostraram uma relação dependente de dose com concentração aumentada 15 (maior citotoxicidade a 0,25 ug/ml).

Resultados similares foram obtidos com a linhagem de célula T98G, (uma linhagem de célula de glioma humana alternativa) conforme é mostrado na Figura 2b.

Exemplo 5: Investigação de mecanismo de ação.

20 THC é conhecido por induzir a morte celular com um uso de uma via de sinalização que envolve o gene ATG1 e pan-caspase. Os resultados de uma investigação, que observa a fosforilação em S6, lipidação em LC3 e o efeito de um inibidor de ATG1 e pan-caspase, são mostrados nas Figuras 25 3a, 3b e 3c respectivamente.

Pode ser visto a partir da Figura 3a que a combinação THC:CBD (comparar com controle C):

- Inibe a atividade de mTORC1 (conforme determinado pelos níveis de fosforilação S6); e

30 - Promove o acúmulo da forma lipídada LC3 (uma

autofagia marcada).

A Figura 3b mostra que a paralisação do gene ATG1 de autofagia essencial, com um inibidor de siRNA (siATG10) seletivo reduz a morte celular induzida em comparação a 5 células transfectadas com um controle siC.

Finalmente, a Figura 3c mostra que as células tratadas com o inibidor de pan-capase Z-VAD também previnem a morte celular induzida.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma combinação de canabinóides, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer.

5 2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ao menos tetraidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD).

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o THC e o CBD estão em uma razão entre
10 20:1 e 1:20 (THC:CBD).

4. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o THC e o CBD estão em uma razão de aproximadamente 1:1.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações
15 1, 2, 3 ou 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o teor de canabinóide está na faixa entre 5 e 100 mg do total de canabinóides presentes.

6. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações
20 1, 2, 3, 4 ou 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que cada canabinóide é usado em um nível que seria considerado sub-ideal se usado sozinho.

7. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações
1, 2, 3, 4, 5 ou 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o câncer a ser tratado é um tumor cerebral.

25 8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor cerebral é um tumor glioma.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor cerebral é um glioblastoma multiforme (GBM).

30 10. Uso, de acordo com a reivindicação 1,

CARACTERIZADO pelo fato de que um ou mais canabinóides estão presentes como extratos vegetais, como compostos puros ou uma combinação dos dois.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10,
5 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o extrato vegetal está na forma de uma substância de droga botânica.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que um ou mais canabinóides são administrados
10 separada, sequencial ou simultaneamente um aos outros.

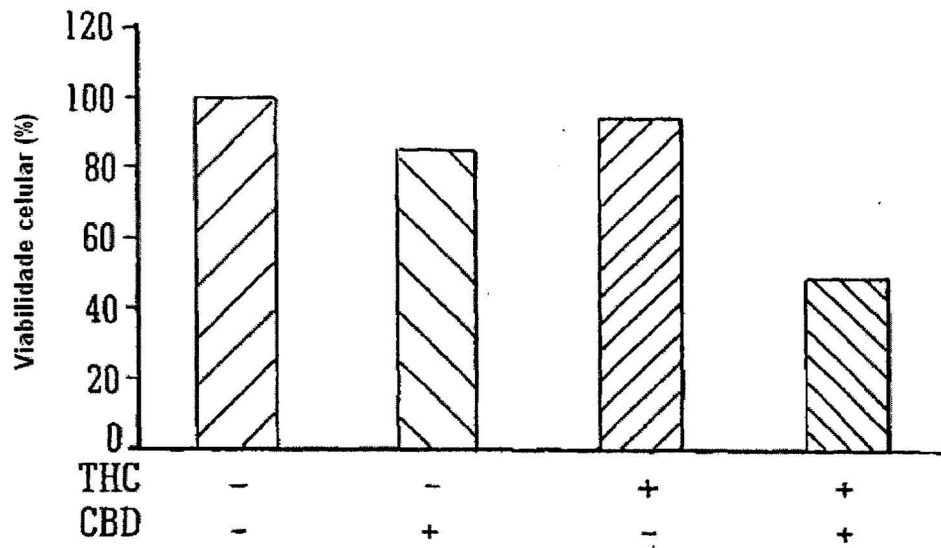


FIG. 1

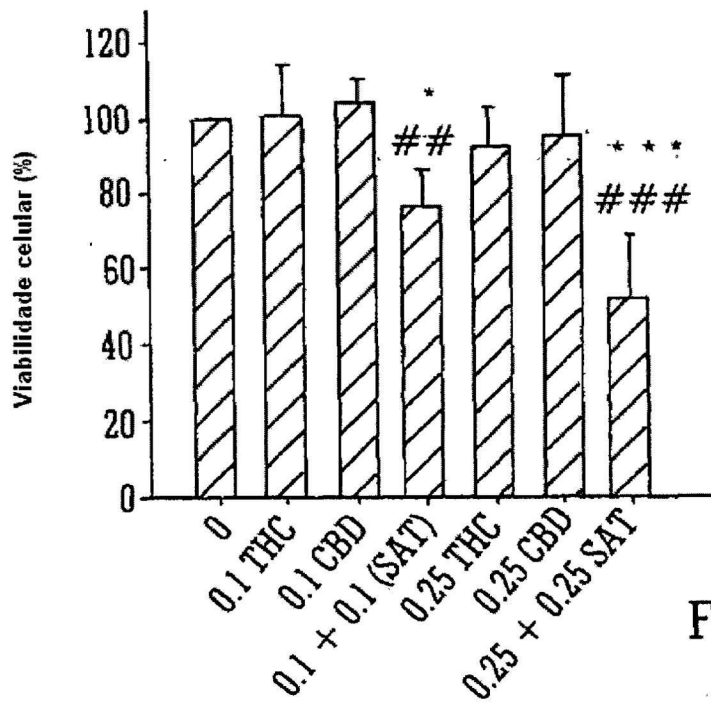


FIG. 2A

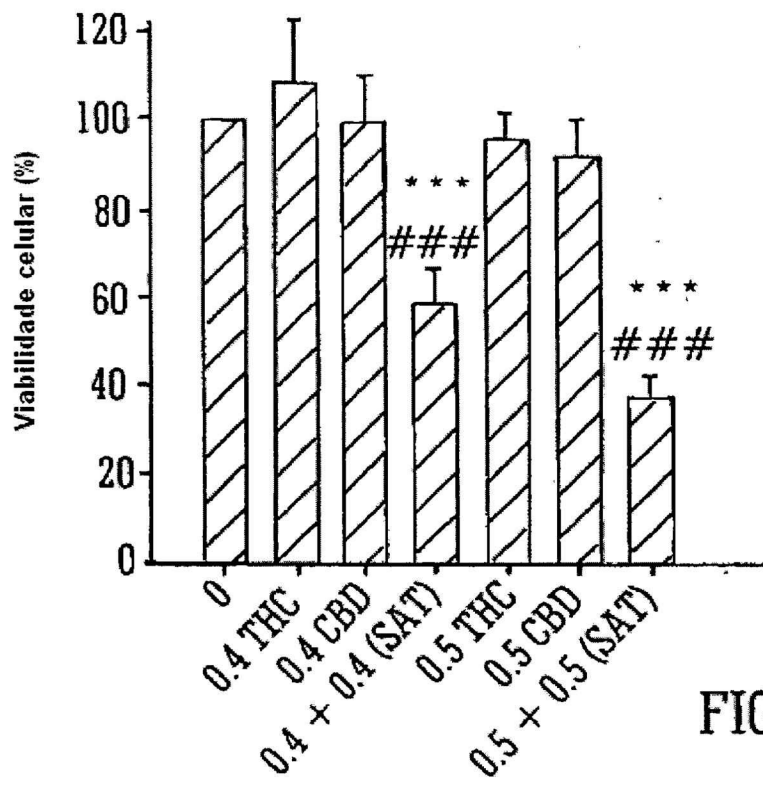


FIG. 2B

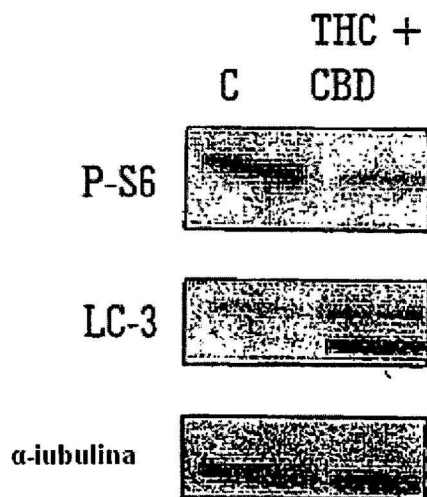


FIG. 3A

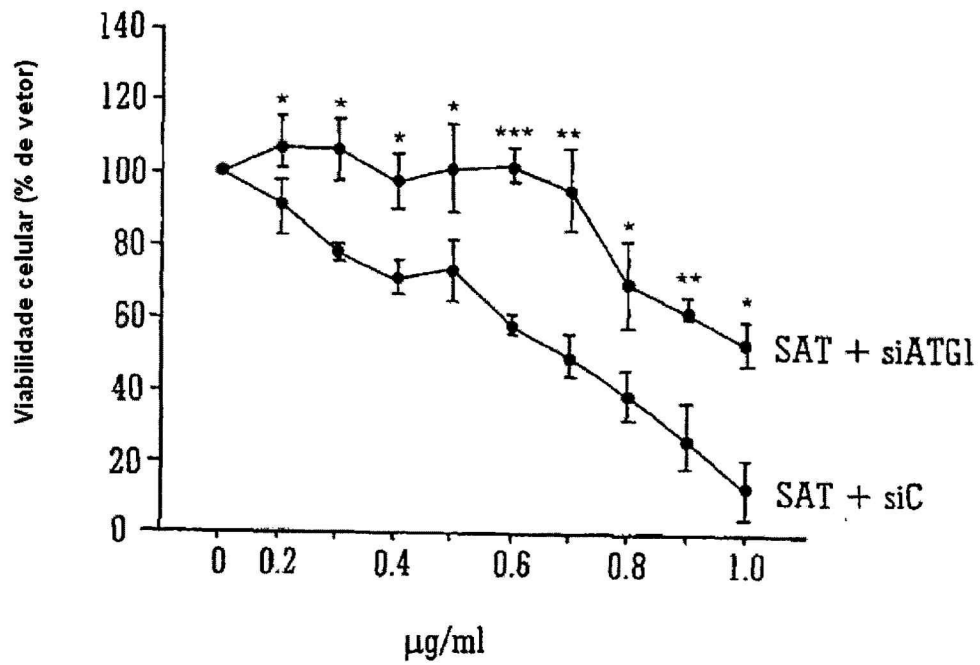


FIG. 3B

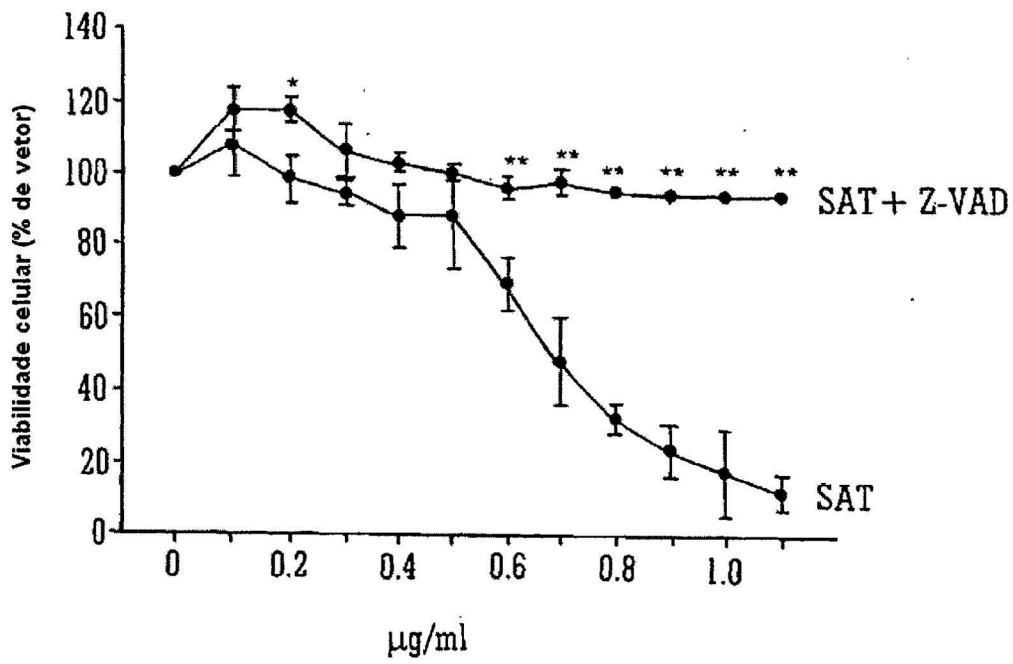


FIG. 3C

RESUMO

EFEITOS ANTITUMORAIS DE COMBINAÇÕES DE CANABINÓIDES

A invenção refere-se ao uso de uma combinação de canabinóides, particularmente, tetraidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD), na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer. Em particular, o câncer a ser tratado é um tumor cerebral, mais particularmente, um glioma, ainda mais particularmente, um glioblastoma multiforme (GBM).