



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 414**

51 Int. Cl.:
A61K 36/18 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05788521 .2**
96 Fecha de presentación : **30.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1802274**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Uso de cannabidiol en la inhibición de la migración de células tumorales cerebrales.**

30 Prioridad: **01.10.2004 GB 0421900**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **GW Pharma Limited**
Porton Down Science Park
Salisbury, Wiltshire SP4 0JQ, GB

72 Inventor/es: **Whittle, Brian y**
Parolaro, Daniela

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 313 414 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

Uso de cannabidiol en la inhibición de la migración de células tumorales cerebrales.

5 Inhibición de migración de células tumorales.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere al uso de un extracto de planta de cannabidiol o un cannabinoide en la fabricación de un medicamento para el uso en la inhibición de la migración de células tumorales del sistema nervioso central.

Antecedentes de la invención

15 La mayor parte de la mortalidad asociada a cáncer se debe a la migración o metástasis de las células tumorales originales a sitios distantes del tumor primario inicial.

El término migración o metástasis se usa para describir el proceso mediante el que las células cancerosas se reubican por sí mismas a lo largo del cuerpo.

20 El proceso de migración de células tumorales implica la unión de la célula tumoral a la membrana basal endotelial; es decir, la capa gruesa de proteínas y glicoproteínas que rodea los tejidos. Una vez unida a la membrana basal endotelial, la célula tumoral secreta enzimas de degradación que son capaces de descomponer las proteínas en la membrana. Entonces, la célula tumoral es capaz de migrar a través del cuerpo. La célula tumoral puede entrar en la corriente sanguínea abriéndose camino entre las células que establecen los vasos sanguíneos o podría entrar en el sistema linfático. Cuando una célula cancerosa se ha movido a través del sistema circulatorio o linfático hasta otra localización, puede dividirse y formar un tumor en el nuevo sitio. Este tumor se denomina un tumor metastásico.

Si las células cancerosas migran o no a otras partes del cuerpo depende de muchos factores incluyendo: el tipo de cáncer, el estadio del cáncer y la localización original del cáncer.

30 Se ha conocido que los cánceres afectan a muchas áreas del cuerpo incluyendo los tipos más comunes de cánceres: cáncer del conducto biliar, cáncer de la vejiga, cáncer del hueso, cáncer del intestino (incluyendo cáncer del colon y cáncer del recto), cáncer del cerebro, cáncer de la mama, cáncer del sistema neuroendocrino (conocido comúnmente como carcinóide), cáncer del cuello del útero, cáncer del ojo, cáncer del esófago, cáncer de la cabeza y del cuello (este grupo incluye carcinomas que comienzan en las células que forman el revestimiento de la boca, nariz, garganta, oído o la capa superficial que cubre la lengua), sarcoma de Kaposi, cáncer del riñón, cáncer de la laringe, leucemia, cáncer del hígado, cáncer del pulmón, cáncer de los nódulos linfáticos, linfoma de Hodgking, linfoma no Hodgking, melanoma, mesotelioma, mieloma, cáncer del ovario, cáncer del páncreas, cáncer del pene, cáncer de la próstata, cáncer cutáneo, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de la médula espinal, cáncer del estómago, cáncer testicular, cáncer de la tiroides, 40 cáncer de la vagina, cáncer de la vulva y cáncer del útero.

Un tumor cerebral primario es una masa creada por el crecimiento o la proliferación incontrolada de células en el cerebro. Un tumor cerebral secundario es un tumor que se ha dispersado al cerebro desde otra parte del cuerpo.

45 Un tumor que se desarrolla en el cerebro puede destruir o dañar células cerebrales produciendo inflamación, comprimiendo otras partes del cerebro, induciendo edema cerebral (hinchazón del cerebro) y puede provocar aumentos de la presión intracraneal (presión dentro del cráneo).

50 La cirugía es la opción de tratamiento de elección para muchos tumores cerebrales, algunos se pueden extirpar completamente, pero los que son profundos o los que se infiltran en el tejido cerebral se pueden reducir, más que retirar.

La terapia de radiación y la quimioterapia se pueden recomendar dependiendo del tipo de tumor implicado.

55 Los tumores celulares de glioma pueden ser a menudo letales. El crecimiento tumoral infiltrativo difuso característico de gliomas a menudo hace imposible la retirada quirúrgica de los mismos y esto complica profundamente el tratamiento clínico de estos pacientes.

60 Se están investigando diferentes estrategias para mejorar la tasa de mortalidad de pacientes que tienen un glioma diagnosticado. Las mismas incluyen terapias que se dirigen a las células de glioma pero que intactas las células normales, métodos que limitan la dispersión de las células cancerosas y tratamientos que bloquean las moléculas básicas para la supervivencia de los tumores.

65 Una de tales áreas de investigación implica el uso de cannabinoides en la inhibición de la viabilidad de células cancerosas.

Los cannabinoides son los constituyentes activos de plantas de cannabis y se ha observado que muestran numerosas propiedades farmacológicas.

ES 2 313 414 T3

Por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos US 2004/0039048 (Guzmán *et al.*) describe el tratamiento de tumores cerebrales mediante la administración de cannabinoides naturales o sintéticos. Se reivindica que la activación de receptores específicos de los cannabinoides conduce a la muerte selectiva de las células transformadas.

5 Recientemente se ha demostrado que el cannabinoide CBD posee propiedades anti-tumorales (Massi *et al.* J. Pharmacol Exp Ther. 2004 Mar; 308(3): 838-45). El trabajo descrito mediante este artículo describe efectos antiproliferativos tanto *in vitro* usando líneas celulares de glioma humano U87 y U373 como *in vivo* usando células de glioma humanas U87 por vía subcutánea implantadas en ratones desnudos.

10 Los gliomas malignos son tumores altamente infiltrativos y proliferativos, que siguen un patrón de crecimiento característico. Las células de glioma invaden las estructuras cerebrales normales adyacentes y los grandes vasos sanguíneos circundantes.

15 Mientras que el uso de cannabinoides parece ser útil en la anti-proliferación de células tumorales, todavía hay un problema significativo implicado en la migración de estas células tumorales antes de que se destruyan.

La inhibición de la migración de células de glioma, por lo tanto, representa una etapa crucial en la mejora del pronóstico de pacientes con gliomas malignos.

20 La presente invención intenta superar este problema mediante el uso de un extracto de planta de cannabis o un cannabinoide para impedir el progreso de células cancerosas que migran desde su localización tumoral primaria hasta un sitio secundario.

Sumario de la invención

25 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona el uso de cannabidiol en la fabricación de un medicamento para usar en la inhibición de la migración de células tumorales del sistema nervioso central.

30 La invención es útil en un método para inhibir la migración de células tumorales del sistema nervioso central en un sujeto mamífero que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de cannabidiol.

Una realización preferida se refiere a la inhibición de la migración de células tumorales del sistema nervioso central en un paciente humano.

35 Más preferiblemente, el cannabidiol se produce a partir de un quimiotipo de cannabis dado.

40 Un extracto de planta se define como un extracto de un material de planta como se describe por la Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, agosto del 2000, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Centro para la Evaluación e Investigación de la Administración de Alimentos y Fármacos.

Un material de planta se define como una planta o una parte de planta (por ejemplo, corteza, madera, hojas, tallos, raíces, flores, frutas, semillas, bayas o partes de los mismos) así como exudados.

45 Un quimiotipo es el término usado para describir una planta híbrida que se ha propagado para maximizar el rendimiento de constituyentes químicos específicos. En el caso de quimiotipos de cannabis, los mismos se multiplican a menudo para maximizar el rendimiento de cannabinoides específicos.

Preferiblemente, el quimiotipo de cannabis expresa dicho contenido de cannabinoide como un cannabinoide predominante.

50 La cantidad de cannabinoide en un quimiotipo determinado se puede determinar mediante técnicas tales como Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) o Cromatografía de Gases (GC). El contenido de cannabinoide de un quimiotipo de cannabis se puede describir como un porcentaje del peso seco total del material de planta de cannabis. Alternativamente se puede producir un extracto del material de planta de cannabis y la cantidad de un determinado cannabinoide se puede expresar como un porcentaje del contenido total de cannabinoide.

60 Determinadas técnicas de multiplicación son capaces de seleccionar quimiotipos de cannabis que producen de forma predominante un tipo de cannabinoide. Se han producido otros quimiotipos por los que la planta de cannabis produce más de un tipo de cannabinoide. En determinados casos, el quimiotipo se puede seleccionar para expresar dos o más cannabinoides en una proporción específica. Esto puede ser beneficioso ya que si se conoce que una proporción específica de cannabinoides es útil para el tratamiento de una enfermedad o un síntoma específico, se puede preparar un extracto de los cannabinoides de un tipo de planta en vez de producir varios extractos y mezclar los mismos para producir proporción deseada de cannabinoides.

65 Preferiblemente, el quimiotipo de cannabis se selecciona para producir de forma predominante uno o más de los siguientes cannabinoides: tetrahidrocannabinol, delta-9-tetrahidrocannabinol, análogo propilo de delta-9-tetrahidrocannabinol, cannabidiol, análogo propilo de cannabidiol, cannabinal, cannabicromeno, análogo propilo de cannabicromeno o cannabigerol.

ES 2 313 414 T3

El quimiotipo del cannabis producirá a menudo sus cannabinoides en una forma ácida y los mismos se pueden descarboxilar hasta su forma neutra después de que se haya recolectado la planta. La forma neutra o ácida del cannabinoide puede ser adecuada para el uso como se describe en la presente invención.

5 Preferiblemente, el quimiotipo de cannabis se selecciona para producir de forma predominante el cannabinoide cannabidiol (CBD).

Más preferiblemente, el quimiotipo de cannabis se ha seleccionado para producir el cannabinoide CBD en una cantidad mayor o igual al 90% (p/p) de la cantidad total de cannabinoides en la planta.

10 Preferiblemente, el extracto de planta de cannabis o cannabinoide está en la forma de una sustancia farmacológica botánica.

Más preferiblemente, la sustancia farmacológica botánica se prepara usando el método descrito del siguiente modo:

- 15
- i) proporcionar al menos una variedad de planta de Cannabis seca de la que se conoce la cantidad de cannabinoide;
 - 20 ii) preparar un extracto de dicha al menos una variedad de planta de Cannabis usando al menos uno de los siguientes procedimientos:
 - a. maceración
 - b. percolación
 - 25 c. extracción con disolvente tal como alcoholes C₁-C₅, norflurano o HFA227
 - d. extracción con fluido subcrítico o supercrítico
 - 30 e. extracción con gas caliente;
 - iii) formular una sustancia farmacológica botánica a partir de dicho extracto o extractos preparados en la etapa (ii) y;
 - 35 iv) formular adicionalmente la sustancia farmacológica botánica de la etapa (iii) hasta una composición farmacéutica con un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40 Una sustancia farmacológica botánica se define del siguiente modo. Las sustancias farmacológicas botánicas que se obtienen de plantas de cannabis incluyen extractos primarios preparados mediante tales procesos como, por ejemplo, maceración, percolación, extracción con disolventes tales como alcoholes C1 a C5 (por ejemplo, etanol), Norflurano (HFA134a), HFA227, dióxido de carbono líquido a presión y extracción usando un gas caliente. El extracto primario se puede purificar adicionalmente mediante extracción supercrítica o subcrítica, vaporización y cromatografía. Cuando se usan disolventes tales como los que se han enumerado anteriormente, el extracto resultante puede contener un material liposoluble no específico. El mismo se puede retirar mediante una diversidad de procesos incluyendo protección contra 45 agentes invernales, que implica el enfriamiento hasta -20°C seguido por filtración para retirar la carga cérea, extracción con dióxido de carbono líquido y mediante destilación.

50 Los extractos de cannabis preferidos incluyen los que se pueden obtener usando cualquiera de los métodos o procesos que se describen en la presente memoria o en la patente del Reino Unido N° GB2380129, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria en su totalidad como referencia. Los extractos están preferiblemente libres de ceras y otros materiales liposolubles no específicos, pero contienen preferiblemente sustancialmente todos los cannabinoides presentes de forma natural en la planta.

55 Las sustancias farmacológicas botánicas se formulan en Medicamentos Botánicos (Botanical Drug Products) que se definen en la Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, agosto del 2000, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Centro para la Evaluación e Investigación de la Administración de Alimentos y Fármacos como: "Un producto botánico que tiene por objeto el uso como un fármaco; un medicamento que se prepara partir de una sustancia farmacológica botánica".

60 El tipo de célula tumoral cuya migración se evita es una célula tumoral del sistema nervioso central, preferiblemente una célula tumoral del cerebro.

Más preferiblemente, el tipo de célula tumoral cuya migración se evita es una célula tumoral de glioma.

65 Los tumores cerebrales se clasifican habitualmente de acuerdo con la localización del tumor y el tipo de célula a partir de la cual se ha desarrollado el cáncer.

ES 2 313 414 T3

Por ejemplo, diferentes tipos de tumores cerebrales incluyen: neuroma acústico, astrocitoma, linfoma del SNC, ependimoma, hemangioblastoma, meduloblastoma, meningioma, glioma, glioma mixto, oligodendroglioma, tumores de la región pineal y tumores hipofisarios.

5 Los gliomas son tumores de las células gliales; estas células sujetan y protegen las neuronas en el cerebro. Los gliomas comprenden aproximadamente la mitad de todos los tumores cerebrales primarios y una quinta parte de todos los tumores de médula espinal primarios.

Se describen adicionalmente determinados aspectos de esta invención, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 es un gráfico que detalla la inhibición dependiente de concentración de células de glioma humano U87 inducida por CBD. Los resultados se expresan como un porcentaje de migración frente al control.

15 La Figura 2 es un gráfico que detalla que la migración de células inducida por CBD no se evita por el pre-tratamiento con los antagonistas selectivos para receptores CB1 (SR141716) o CB2 (SR144528).

Descripción específica

20 El efecto del cannabinoide cannabidiol (CBD) se investigó para su capacidad de modular la motilidad de células de glioma humanas. Las características de la invención se ilustran adicionalmente con referencia al siguiente ejemplo no limitante:

25 Ejemplo 1

Se disolvió cannabidiol (CBD) en la forma de una sustancia farmacológica botánica en etanol hasta una concentración de 100 mM que se almacenó a -20°C hasta que se requirió.

30 Antes del uso, el CBD se diluyó adicionalmente con medio de cultivo tisular hasta la concentración deseada, garantizando que la concentración de etanol estaba por debajo del 0,001%.

Se usaron células de glioma humano U87 a lo largo de este experimento. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y aire al 95%.

35 Las células se cultivaron en un matraz de cultivo de 75 cm² en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), que se había suplementado con L-glutamina 4 mM, 100 unidades/ml penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, piruvato sódico al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% y suero fetal bovino inactivado por calor al 10%.

40 Se realizó un ensayo de migración celular con las células U87 en una cámara Boyden de 48 pocillos modificada en la que los compartimientos superior e inferior se separaron por un filtro de policarbonato con un diámetro de poro de 8 μm recubierto con 15 mg/ml de fibronectina. El medio acondicionado (CM) sirvió como un factor quimiotáctico. El CM se hizo incubando un cultivo subconfluyente de células U87 con medio completo durante 3 días.

45 El filtro recubierto se colocó sobre la cámara inferior, que contenía el medio acondicionado. Se usó medio sin suero como un control negativo.

Las células U87 se trataron con CBD o vehículo durante 30 minutos y después se sembraron en la cámara superior a una concentración de 3 x 10⁴ células por pocillo y se incubaron durante 6 horas a 37°C.

50 Después de la incubación se retiraron las células que no habían migrado de la superficie superior del filtro por raspado y las células que habían migrado del lado inferior del filtro se tiñeron con tinción Diff-Quick. Se contaron entre 5 y 8 campos de unidades por filtro con un aumento de 400x.

55 *Resultados*

La adición de CBD al medio de cultivo de células de glioma humanas U87 dio como resultado una inhibición dependiente de concentración de la migración.

60 Como se muestra en la Figura 1, las células se expusieron a una concentración aumentada de CBD en un intervalo comenzando en 0,01 μM a 9 μM y se evaluó su migración después de 6 horas. El grado de inhibición de migración celular se expresa como un porcentaje de inhibición frente a tratamiento con vehículo (estimulación máxima).

65 Se determinó que la CI₅₀ de CBD era 5,05 ± 1,1 μM. El intervalo de concentraciones de CBD que se usó no alteró la viabilidad celular.

ES 2 313 414 T3

Ejemplo 2

La mayoría de los datos generados en la investigación de cannabinoides ha demostrado que sus efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central están mediados por receptores de cannabinoide.

Para determinar si la inhibición inducida por CBD de la migración celular como se describe en el anterior Ejemplo 1 era dependiente de la estimulación de estos receptores, se realizó el ensayo de migración celular con antagonistas específicos selectivos para receptores CB1 y CB2. Los mismos son, respectivamente, SR141716A y SR144528.

La presencia de los receptores CB1 y CB2 en células de glioma humano U87 se comprobó en primer lugar por experimentos de inmunotransferencia y se observó que ambos receptores estaban presentes (datos no mostrados).

Las células de glioma humano U87 se pre-trataron en primer lugar con los antagonistas durante 30 minutos y después se trataron con el CBD durante 30 minutos adicionales antes del sembrado en la cámara superior de la cámara de Boyden.

Se realizó el ensayo de migración celular usando una concentración de CBD de 6 μM (que mostró en el Ejemplo 1 que inhibía el 50% de la migración). Los antagonistas del receptor CB1 y CB2 se ensayaron a concentraciones de 0,1 μM y 1 μM , a estas concentraciones no se vio afectada la viabilidad celular.

Resultados

El pre-tratamiento de las células de glioma humano U87 con antagonistas del receptor CB1 y CB2 tuvo poco efecto sobre la inhibición inducida por CBD de la migración.

Como se muestra en la Figura 2, se indica que el efecto inducido por CBD no estaba mediado por los receptores clásicos de cannabinoides.

ES 2 313 414 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de cannabidiol en la fabricación de un medicamento para usar en la inhibición de migración de células tumorales del cerebro.
2. Uso de cannabidiol en la fabricación de un medicamento para usar en la inhibición de migración de células tumorales del sistema nervioso central.
- 10 3. Uso de cannabidiol en la fabricación de un medicamento para usar en la inhibición de migración de células tumorales de glioma.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cannabidiol se produce a partir de un quimiotipo de cannabis dado.
- 15 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el cannabidiol se produce a partir del quimiotipo de cannabis a una cantidad mayor o igual al 90% (p/p) de la cantidad total de cannabinoides en la planta.
- 20 6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cannabidiol está en la forma de una sustancia farmacológica botánica.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

FIG. 1

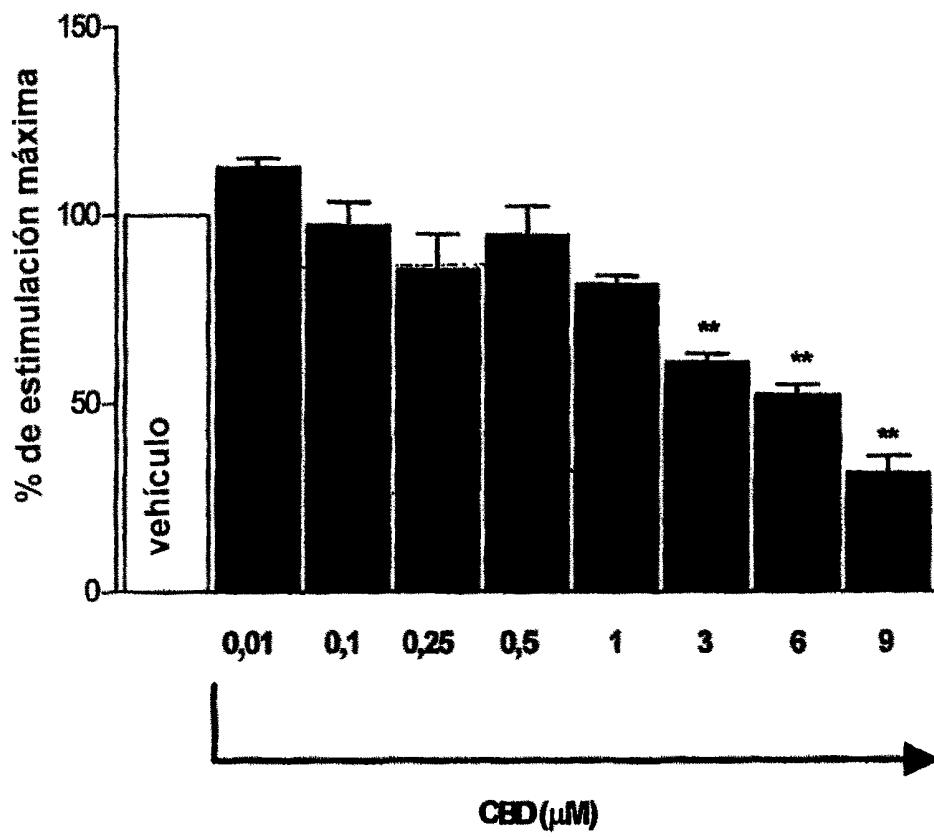


FIG. 2

