

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 370**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61K 31/05** (2006.01)  
**A61P 25/08** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)  
**A61K 36/185** (2006.01)  
**A61K 36/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2007** **E 10189019 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** **EP 2332533**

54 Título: **Extractos de plantas que contienen canabionoides como agentes neuroprotectores**

30 Prioridad:

**18.01.2006 GB 0601013**

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

**04.02.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GUY, GEOFFREY y  
PLATT, BETTINA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 698 370 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**

Extractos de plantas que contienen canabionoides como agentes neuroprotectores.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de extractos de plantas que contienen cannabinoides en la prevención o el tratamiento de la degeneración neural.

Antecedentes de la invención.

10 La degeneración neural, o neurodegeneración, se puede describir como el daño progresivo o la muerte de las neuronas. Las neuronas son células nerviosas en el cerebro cuya función principal es ayudar en el procedimiento de la memoria. El daño o la muerte de las neuronas conduce a un deterioro gradual de las funciones controladas por la parte afectada del sistema nervioso.

15 La degeneración neural a menudo se produce como resultado del estrés oxidativo. El estrés oxidativo se produce en las células cuando los efectos de los prooxidantes (tales como los radicales libres, el oxígeno reactivo y las especies reactivas de nitrógeno) superan la capacidad de los antioxidantes para neutralizarlos. Cuando los niveles de radicales libres u otros prooxidantes aumentan hasta tal punto, pueden causar daño a las membranas celulares, lo que a su vez puede causar la muerte celular o daño al material genético.

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de trastornos caracterizados por cambios en el funcionamiento neuronal normal, que conducen, en la mayoría de los casos, a la muerte neuronal. La mayoría de estas enfermedades están asociadas, especialmente en etapas tardías, con pérdida neuronal grave.

20 Con un envejecimiento cada vez mayor de la población, progresivamente, más individuos se ven afectados por enfermedades neurodegenerativas. Según the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, hay más de 600 tipos diferentes de trastornos neurológicos.

Algunos de los tipos más comunes de trastornos neurológicos incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple.

25 El procedimiento de degeneración neural es a menudo el resultado de la excitotoxicidad del glutamato. El glutamato es un químico de señalización y en condiciones normales, la concentración de glutamato en una célula tiende a ser bastante baja. El glutamato se requiere en estas bajas concentraciones para funciones cerebrales cruciales tales como la memoria y el aprendizaje. Cuando las concentraciones de glutamato aumentan, comienza el procedimiento de degeneración neural.

30 Cuando el cerebro está privado de oxígeno ya sea debido a una enfermedad, tal como una enfermedad neurodegenerativa, un trauma, tal como una lesión craneal cerrada o debido a un evento isquémico tal como un accidente cerebrovascular, se produce una acumulación anormal de glutamato.

35 La degeneración neural tiene lugar cuando el glutamato se une a las proteínas receptoras en la superficie de una célula. Estos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) luego abren un exceso de canales de calcio, lo que hace que la concentración intracelular de calcio aumente rápidamente. Los iones de calcio activan la fosfolipasa A (PLA), que a su vez da como resultado la liberación de ácido araquidónico y radicales superóxido. La degeneración neural continúa a partir de los efectos destructivos de los radicales oxidativos causados por la inundación de glutamato. Los radicales causan la interrupción de reacciones esenciales en las neuronas y esto conduce a la degeneración o muerte de la célula.

40 Los agentes neuroprotectores que son capaces de bloquear el receptor de NMDA son útiles ya que son capaces de bloquear la reacción causada por el glutamato y, por lo tanto, prevenir la degeneración neural.

Algunos agentes neuroprotectores, que bloquean el receptor de NMDA, se han estudiado en ensayos clínicos en pacientes con accidente cerebrovascular. El dextrorfanol fue el primer antagonista de NMDA que se estudió en sujetos humanos, pero tiene un uso limitado debido a sus efectos secundarios de alucinaciones, agitación e hipotensión.

45 Otro fármaco, Selfotel, mostró tendencias hacia una mayor tasa de mortalidad con los pacientes tratados con el fármaco en lugar del placebo, y como tal, los ensayos se detuvieron. Al fármaco Cerestat también se le dieron por terminados los ensayos debido a preocupaciones con la relación beneficio/riesgo del fármaco.

Claramente, existe un requisito significativo para que un antagonista eficaz de NMDA prevenga o trate la degeneración neural.

50 Los cannabinoides son un grupo de sustancias químicas que se sabe que activan los receptores de cannabinoides en las células. Estas sustancias químicas, que se encuentran en las plantas de cannabis, también se producen de

forma endógena en los seres humanos y otros animales, que se denominan endocannabinoides. Los cannabinoides sintéticos son químicos con estructuras similares a los cannabinoides o endocannabinoides.

5 Los cannabinoides de las plantas también pueden aislarse de modo que sean compuestos "esencialmente puros". Estos cannabinoides aislados están esencialmente libres de otros compuestos naturales, como otros cannabinoides menores y moléculas tales como los terpenos.

Los compuestos esencialmente puros tienen un grado de pureza de al menos el 95% del peso total. Se ha sugerido que algunos cannabinoides esencialmente puros (ya sean sintéticos o aislados) sean agentes neuroprotectores, ya sea por antagonismo directo del receptor NMDA o reduciendo la afluencia de iones de calcio a la célula por otros medios, tales como la unión con receptores de cannabinoides.

10 Se descubrió que la toxicidad del glutamato podría prevenirse en cierta medida mediante tetrahidrocannabinol (THC) aislado o sintético o cannabidiol (CBD), (Hampson et al. 1998). Los cannabinoides se probaron in vitro en cultivos neuronales expuestos a glutamato.

15 Sin embargo, investigaciones adicionales de un estudio in vivo realizado por el mismo grupo no lograron encontrar una diferencia entre los animales tratados con CBD aislados o sintéticos y los animales tratados con placebo (Rosenthal et al. 2000).

20 El tratamiento de enfermedades que incluyen epilepsia, bradicardia, taquicardia, hipertensión, hipotensión, inflamación, MS, lesión de la médula espinal, neuropatías, IBD, accidente cerebrovascular, lesión en la cabeza y enfermedades inmunitarias usando extractos de cannabis se describe en los documentos US 2004/034108, GB2392093, WO 2004/016246, WO 02/064109 y WO 03/037306. Sin embargo, ninguno de estos documentos describe la proporción de cannabinoides con respecto a la fracción no cannabinoide.

El documento WO 03/105800 describe el uso de extractos de cannabis para tratar la parálisis por MS, trastornos del movimiento, asma, epilepsia, síntomas de abstinencia del alcoholismo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y artritis. Sin embargo, este documento no describe la proporción de cannabinoides con respecto a la fracción no cannabinoide.

25 El documento WO 02/069993 describe el uso de extractos de cannabis como antidepresivos, ansiolíticos, antiepilépticos y como antiinflamatorio. Sin embargo, este documento no describe la proporción de cannabinoides con respecto a la fracción no cannabinoide.

30 Sorprendentemente, los solicitantes han encontrado que la administración de extractos de plantas que contienen cannabinoides es más eficaz que los cannabinoides esencialmente puros en la prevención de la degeneración neural. En particular, los extractos de plantas que contienen cannabinoides que comprenden como un cannabinoide predominante, ya sea tetrahidrocannabinol (THC) o cannabidiol (CDB) fueron particularmente eficaces en la prevención de la degeneración neural.

35 El término "extracto de planta que contiene cannabinoides" se toma en este documento para referirse a uno o más extractos de plantas de la planta de cannabis. Un extracto de planta que contiene cannabinoides contiene además de uno o más cannabinoides, uno o más componentes no cannabinoides que se extraen conjuntamente con los cannabinoides del material vegetal. Sus rangos respectivos variarán de acuerdo con el material de la planta de partida y la metodología de extracción usada. Los extractos de plantas que contienen cannabinoides se pueden obtener por diversos medios de extracción de material de planta de cannabis. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, la extracción supercrítica o subcrítica con CO<sub>2</sub>, la extracción con gas caliente y la extracción con solventes.

40 Resumen de la invención

Según el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un extracto de planta de *Cannabis sativa* L. que comprende cualquiera:

a) un extracto en el que un cannabinoide principal es tetrahidrocannabinol (THC) y el extracto comprende (p/p del extracto)

45 i) 63.0 - 78.0% de THC, 0.1 - 2.5% de cannabidiol, 1.0 - 2.0% de cannabigerol, 0.8 - 2.2% de cannabicromeno, 0.4 - 1.0% de tetrahidrocannabivarina y <2.0% de ácido tetrahidrocannabinólico; y

ii) <6.0% de terpenos incluyendo monoterpenos; di/tri-terpenos; sesquiterpenos; y otros terpenos, y 6.3 - 26.7% de esteroides; triglicéridos; alcanos; escualeno; tocoferol; y carotenoides, o

b) un extracto en el que un cannabinoide principal es el cannabidiol (CDB) y el extracto comprende (p/p del extracto)

50 i) 57.0 - 72.0% de CBD, 2.0 - 6.5% de THC, 0.8 - 6.5% de cannabigerol, 3.0 - 6.5% de cannabicromeno, 1.0 - 2.0% de cannabidivarina, y <2.0% de ácido cannabidiólico y

ii) <5.8% de terpenos incluyendo monoterpenos; di/tri-terpenos; sesquiterpenos; y otros terpenos, y 1.7 - 28.4% de esteroides; triglicéridos; alcanos; escualeno; tocoferol; y carotenoides en los que la proporción de la fracción que contiene cannabinoides (i) y la fracción que contiene no cannabinoides (ii) está entre 60:40 y 90:10 del extracto total.

5 El "cannabinoide principal" se define en este documento como el cannabinoide predominante en el extracto de planta que contiene cannabinoides. En el caso de un extracto de plantas de una planta de cannabis criada para contener un alto contenido de THC, el cannabinoide principal será THC.

El "cannabinoide secundario" se define en este documento como el segundo cannabinoide más predominante en el extracto de planta que contiene cannabinoides. En el caso de un extracto de plantas de una planta de cannabis criada para contener un alto contenido de THC, el cannabinoide secundario generalmente será CBD.

10 Los "otros cannabinoides" se definen en este documento como todos los cannabinoides restantes que están presentes en un extracto de planta de cannabis cuando se han tenido en cuenta los cannabinoides principales y menores. En el caso de un extracto de plantas de una planta de cannabis criada para contener un alto contenido de THC, los otros cannabinoides incluirán cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), tetrahidrocannabinol (THCV) y ácido tetrahidrocannabinólico (THCA).

15 La fracción que no contiene cannabinoides generalmente comprenderá terpenos, que generalmente representan aproximadamente el 6% de (p/p) del peso total del extracto y otros componentes derivados de plantas, que representan el 1-28% de (p/p) del peso total del extracto. Los otros componentes derivados de plantas incluyen esteroides, triglicéridos, alcanos, escualeno, tocoferol y carotenoides.

20 Los rangos y compuestos anteriores provienen del análisis de un extracto de planta que contiene cannabinoides que se extrajo de una planta de cannabis usando la técnica de extracción subcrítica de CO<sub>2</sub> como se describe en los solicitantes con la Patente Británica GB2391865.

25 La Solicitud de Patente Internacional WO 2002/32420 a nombre de Delta-9-Pharma describe en la tabla 1 la composición de extractos de plantas de cannabis que se han extraído usando otras técnicas. Otros componentes de la fracción que no contiene cannabinoides se han identificado usando técnicas de extracción supercrítica con CO<sub>2</sub> y extracción con etanol y hexano. Estos incluyen: clorofila, glucósidos flavonoides y alcaloides.

Otra técnica de extracción de plantas de cannabis es la extracción con gas caliente como se describe en los solicitantes con la Patente Británica GB2376464.

Ciertos aspectos de esta invención se describen con más detalle, solo a modo de ejemplo.

#### Descripción específica

30 Recientemente, se han realizado ensayos clínicos en extractos de plantas de cannabis, para probar la evidencia principalmente anecdótica de sus propiedades analgésicas y otras propiedades medicinales.

35 Un estudio ha encontrado que la combinación de tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) en una proporción aproximadamente igual fue un analgésico eficaz en pacientes con dolor neuropático central (Berman et al., 2004). Los extractos de plantas que contienen cannabinoides de *Cannabis Sativa L.* que contienen THC o CBD se mezclaron en una proporción de 1: 1 y se compararon con placebo.

Se ha sugerido que puede haber una interacción entre los componentes cannabinoides en un extracto de planta de cannabis con otros componentes no cannabinoides en el extracto de planta.

Por lo tanto, este estudio comparó un extracto de planta que contiene THC y un extracto de planta que contiene CBD con sus equivalentes esencialmente puros.

40 Las composiciones del extracto de planta que contiene THC y el extracto de planta que contiene CBD se describen en la tabla 1 a continuación.

**Tabla 1:**

	Extracto de planta que contiene THC (% p/p del extracto)	Extracto de planta que contiene CBD (% p/p del extracto)
<u>Cannabinoides principal y secundario:</u>		
Contenido de THC	63.0 - 78.0	2.0 - 6.5
Contenido de CBD	0.1 - 2.5	57.0 - 72.0
<u>Otros cannabinoides:</u>		
Cannabigerol	1.0 - 2.0	0.8 - 6.5
Cannabicromeno	0.8 - 2.2	3.0 - 6.5
Tetrahidrocannabivarina	0.4 - 1.0	-
Ácido tetrahidrocannabinólico	<2.0	-
Cannabidivarina	-	1.0 - 2.0
Ácido cannabidiólico	-	<2.0

Terpenos		
Monoterpenos	0.7	0.4
Di/tri-terpenos	0.6	0.4
Sesquiterpenos	1.7	2.0
Otros terpenos	<3.0	<3.0
<u>Otros componentes menores derivados de plantas incluyendo:</u>		
Esteroles	} 6.3 - 26.7	} 1.7 - 28.4
Triglicéridos		
Alcanos		
Escualeno		
Tocoferol		
Carotenoides		

Se llevaron a cabo experimentos sobre neuronas del hipocampo; se investigaron los efectos de los extractos de plantas que contienen cannabinoides y los cannabinoides esencialmente puros en la homeostasis de los iones de calcio en los paradigmas agudos y crónicos.

- 5 Sorprendentemente, se descubrió que había diferencias significativas entre los extractos de plantas que contienen cannabinoides y los cannabinoides esencialmente puros. Los experimentos de aplicación crónica proporcionaron evidencia de que los cannabinoides esencialmente puros perdieron su efectividad a largo plazo, mientras que los extractos de plantas que contienen cannabinoides ganaron eficacia. Esto infiere que el uso de extractos de plantas que contienen cannabinoides como agentes neuroprotectores es una ruta más segura y más eficaz que el uso de cannabinoides esencialmente puros. Parece que uno o más de los componentes identificados en los extractos de plantas, incluidos los otros cannabinoides, como se detalla en la tabla 1, contribuyen a los efectos neuroprotectores de los principales cannabinoides.
- 10 En los ejemplos que se describen a continuación, se utilizaron los siguientes métodos para dilucidar los efectos neuromoduladores de los cannabinoides.
- Preparación del cultivo
- 15 Se prepararon cultivos primarios de hipocampo primarios a partir de crías de rata Lister-Hooded (1-3 días), se sacrificaron mediante dislocación cervical, de acuerdo con las reglamentaciones del Home Office and institute. Se extrajo rápidamente el cerebro, se diseccionaron los hipocampos y se colocaron en solución regulada HEPES filtrada con hielo (HBS, composición en mM: NaCl 130; KCl 5.4; CaCl<sub>2</sub> 1.8; MgCl<sub>2</sub> 1.0; HEPES 10; glucosa 25). Se realizó una microdissección para eliminar los vasos sanguíneos y el exceso de tejido no hipocámpico.
- 20 El tejido del hipocampo se cortó finamente y se colocó en 1 mg/ml de solución de proteasa X y XIV (40 minutos). El tejido se lavó luego en HBS y se trituró varias veces usando pipetas Pasteur de vidrio pulido al fuego graduadas. Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y las pellas de tejido restante se resuspendió en medio de cultivo tisular (medio esencial mínimo al 90% de con suero bovino fetal al 10% de y L-glutamina 2 mM). El tejido se almacenó en condiciones estándar: en un incubador humidificado a 37 °C y en CO<sub>2</sub> al 5%, y se volvió a centrifugar.
- 25 Se eliminó el exceso de medio y las pellas de tejido se resuspendieron en medio de cultivo para la siembra. Se colocó una gota de suspensión celular en el centro de una placa de cultivo de 35 mm, se recubrió con poli-L-lisina y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de esto, se añadieron suavemente otros 2 ml de medio de cultivo de tejidos a cada placa y el cultivo se mantuvo en una incubadora humidificada (37 °C; 5% de CO<sub>2</sub>).
- Los cultivos se dejaron madurar durante 2 días antes del reemplazo de MEM con medio neurobasal, suplementado con B27 al 2%, L-glutamina 2 mM y L-glutamato 25 μM.
- Se usaron placas de cultivo para la obtención de imágenes a los 5-10 días in vitro.
- Imágenes de calcio
- 30 Para experimentos de formación de imágenes de calcio, los cultivos de hipocampo se lavaron con HBS a temperatura ambiente y se cargaron con el indicador de calcio fluorescente permeable a las células Fura-2-AM (10 μM) durante 1 hora en la oscuridad.
- El bloqueador de canales de sodio tetrodotoxina (TTX) se añadió a todos los medios de perfusión, para evitar la activación espontánea de células y la liberación del transmisor, asegurando que solo se visualizaron los efectos postsinápticos.
- 35 Los cultivos se perfundieron con HBS o una solución regulada de Mg<sup>2+</sup> HEPES para experimentos con NMDA (composición en mM: NaCl 130; KCl 5.4; CaCl<sub>2</sub> 1.8; MgCl<sub>2</sub> 0.1; HEPES 10; glucosa 25), a una velocidad de 1-2 ml/min, usando un sistema de perfusión por gravedad.
- 40 Se identificó un campo de células apropiado bajo el microscopio y se visualizó y capturó una imagen de transmisión en escala de grises usando el software Oracal. Se usó una lámpara de xenón, que proporcionó una única longitud de onda de luz, para exponer las células a 350 nm y 380 nm, especificada por el monocromador. La proporción de estas longitudes de onda, que es directamente proporcional a los niveles de calcio intracelular en las células, se trazó después de la sustracción de fluorescencia de referencia.
- Los datos que se produjeron se agruparon y se determinaron los medios para cada experimento.
- 45 Fármacos y soluciones de stock.
- Los CBD y THC esencialmente puros se almacenaron en una solución etanólica de 1 mg/ml. Para la experimentación, el etanol se evaporó y el cannabinoide se resuspendió en DMSO (a una concentración de cannabinoide de 1 mM).
- 50 Los extractos de CO<sub>2</sub> que contienen cannabis de THC y CBD (obtenidos según el método de GB 2391865) también se almacenaron en una solución etanólica. El extracto de planta que contiene THC contenía 72.6% de THC y 2.5% de CBD, mientras que el extracto de planta que contiene CBD contenía 64.6% de CBD y 2.5% de THC. El porcentaje restante de ambos extractos contenía otros cannabinoides (5-6%), terpenoides (6-7%), esteroides (6%),

triglicéridos, alcanos, escualeno, tocoferol, carotenoides y otros componentes secundarios derivados de plantas (cs. al 100%).

De nuevo para la experimentación, el etanol se evaporó y los cannabinoides se resuspendieron en DMSO (a una concentración de cannabinoide de 1 mM).

5 En algunos de los experimentos también se usaron comparadores en proporción con cannabinoides de los extractos de plantas que contienen cannabis. Los comparadores comprendían una proporción de cannabinoides principales y secundarios esencialmente puros, pero no contenían los otros cannabinoides ni ningún componente de la fracción no cannabinoide.

10 Para el comparador de THC, se añadieron THC y CBD esencialmente puros juntos en una proporción de 29.1: 1. Para el comparador de CBD, CBD esencialmente puro y THC se añadieron juntos una proporción de CBD a THC de 25.9: 1.

Se preparó un stock de NMDA (10 mM) en agua doble destilada y se hicieron las concentraciones necesarias en HBS. Se aplicó NMDA (con glicina 100  $\mu$ M) en cada experimento para distinguir categóricamente entre células neuronales y gliales en la imagen obtenida.

15 Además, la respuesta a un desafío de NMDA se tomó como una indicación de la viabilidad de las neuronas. En los experimentos que no estaban examinando NMDA, se aplicó una concentración de 50  $\mu$ M al final del experimento para indicar la viabilidad.

#### Protocolos experimentales

20 Para probar la regulación de la homeostasis del calcio en presencia del artículo de prueba, se midieron los efectos en respuesta a una aplicación de cinco minutos de una muestra de 1  $\mu$ M.

El efecto modulador agudo de la homeostasis del calcio se evaluó comparando una aplicación inicial de dos minutos de NMDA (10  $\mu$ M) con una aplicación posterior de dos minutos de NMDA (10  $\mu$ M). La aplicación posterior del NMDA siguió a una aplicación de cinco minutos de una muestra de 1  $\mu$ M.

25 Para evaluar los efectos de los artículos de prueba bajo regímenes de tratamiento crónico más realistas, las células se incubaron durante la noche con respuestas de muestra y 1  $\mu$ M a dosis crecientes de NMDA evaluadas (1, 10 y 100  $\mu$ M).

30 Para evaluar si los efectos moduladores agudos se alteran mediante una incubación durante la noche, las células se incubaron durante la noche con la muestra 1  $\mu$ M y se evaluó comparando una aplicación inicial de dos minutos de NMDA (10  $\mu$ M) con una aplicación posterior de dos minutos de NMDA (10  $\mu$ M). La aplicación posterior del NMDA siguió a una aplicación de cinco minutos de un artículo de prueba de 1  $\mu$ M.

#### Análisis de los datos

35 Las unidades fluorescentes se convirtieron en % de  $\Delta F/F$ . F se define como un promedio de cinco valores de referencia antes de la aplicación del fármaco. El valor para % de  $\Delta F/F$  es, por lo tanto, el cambio porcentual en el valor de referencia promedio antes de la aplicación del fármaco dividido por el valor de referencia promedio antes de la aplicación del fármaco.

40 Todos los experimentos se realizaron un mínimo de tres veces, cada uno en neuronas de un cultivo diferente. Solo los cambios en la fluorescencia  $> 0.1$  unidades de proporción se consideraron como una respuesta. Los datos se exportaron a Excel y el análisis estadístico se realizó con Prism. Pruebas de normalidad confirmaron la ausencia de distribución normal de datos. Por lo tanto, se utilizó una prueba U de Mann Whitney para comparaciones pareadas y para comparaciones de grupos múltiples se usó una prueba de Kruskal-Wallis con una prueba posterior de Dunn o Mann Whitney.

#### Ejemplo 1:

Los efectos de los cannabinoides sobre los niveles de calcio intracelular.

45 Se ha demostrado previamente que el CBD esencialmente puro altera los niveles de calcio intracelular. También se ha sugerido que otros cannabinoides tales como el THC esencialmente puro y el cannabinoide sintético WIN55212-2 alteran la homeostasis del ion calcio en las neuronas. Esto tiene implicaciones tanto en la neuroprotección como en la apoptosis de las células.

50 Un aumento en la concentración de iones de calcio intracelular es perjudicial para las neuronas cuando la concentración aumentada se mantiene durante un período de tiempo o cuando la concentración supera los niveles fisiológicos.

La señalización de iones de calcio ocurre constantemente en las neuronas y un aumento transitorio en la concentración de iones de calcio intracelular no es necesariamente perjudicial.

5 Se evaluaron los efectos de los cannabinoides esencialmente puros, los extractos de plantas que contienen cannabinoides y los comparadores comparados de cannabinoides para investigar las respuestas de las neuronas a estas diferentes formas de cannabinoides.

De los resultados anteriores descritos anteriormente con THC esencialmente puro y WIN55212-2, se podría esperar que todas las formas de cannabinoides causen un aumento en la concentración de iones de calcio intracelular. Un aumento menor en la concentración de iones de calcio después del tratamiento indicaría una mejor probabilidad de que esta forma de cannabinoide posea efectos neuroprotectores.

10 Un aumento menor en la concentración de iones de calcio intracelular junto con una reducción en la concentración de iones de calcio durante un período más largo de tratamiento (como se detalla en el ejemplo 3) inferiría que esta forma de cannabinoide puede ser útil como agente neuroprotector.

15 Los datos generados a partir de este experimento mostraron que todas las formas de los cannabinoides probados dieron como resultado un aumento en la concentración de iones de calcio intracelular. La tabla 2 a continuación detalla el tamaño promedio de los aumentos en cada artículo de prueba.

Tabla 2:

Artículo de prueba	Concentración de Ca <sup>2+</sup> intracelular			%Δ F/F
	Pretratamiento	Tratamiento posterior	Respuesta (Trata post.)	
P-CBD	0.805	1.172	0.367	45.45
E-CBD	0.306	0.376	0.070	25.01
C-CBD	0.293	0.396	0.103	35.62
P-THC	0.363	0.588	0.225	56.38
E-THC	0.290	0.369	0.079	27.89
C-THC	0.273	0.633	0.360	134.14

En la tabla anterior, las diferentes formas de cannabinoides se abrevian de la siguiente manera:

P-CBD - CBD esencialmente puro

20 E-CBD - extracto de planta que contiene CBD

C-CBD - comparador de CBD

P-THC - THC esencialmente puro

E-THC - Extracto de planta que contiene THC

C-THC - comparador de THC

25 (Estas abreviaturas se utilizan en todas las tablas siguientes)

Como se puede ver en la tabla 2, la cantidad de aumento en la concentración de iones de calcio intracelular producida por los extractos de plantas que contienen CBD y THC es mucho menor que la producida por sus homólogos esencialmente puros.

30 Los comparadores parecen actuar de una manera similar a la de los cannabinoides esencialmente puros, causando un aumento de un mayor valor en la concentración de los iones de calcio intracelular, que la de los extractos de plantas que contienen cannabinoides.

No parece haber ninguna diferencia significativa en el tamaño de la respuesta producida por el extracto de planta que contiene CBD y THC.



Como se puede observar, los extractos de plantas que contienen cannabinoides producen un aumento mucho menor en la concentración de iones de calcio intracelular, lo que infiere que estos artículos de prueba serían más apropiados para su uso como agentes neuroprotectores.

5 La razón por la cual los extractos de plantas que contienen cannabinoides causan un aumento menor no puede deberse únicamente a la presencia del cannabinoide secundario en el extracto, (THC en el caso del extracto de planta que contiene CBD o CBD en el caso del extracto de planta que contiene THC), ya que los artículos de prueba comparativos que contienen el cannabinoide secundario produjeron efectos similares a los de los cannabinoides esencialmente puros.

10 Se puede considerar que es la presencia de uno o más de los otros componentes cannabinoides o no cannabinoides, como se detalla en la tabla 1, lo que permite que el extracto de planta que contiene cannabinoides tenga un efecto menos dañino en las células que los cannabinoides esencialmente puros.

Ejemplo 2:

Los efectos neuromoduladores de la aplicación aguda de cannabinoides

15 La modulación aguda de la homeostasis de los iones de calcio se evaluó comparando una aplicación inicial de dos minutos de NMDA (10  $\mu$ M) con una aplicación posterior de dos minutos de NMDA luego de una aplicación de cinco minutos de 1  $\mu$ M del artículo de prueba de cannabinoides en particular.

El NMDA es una neurotoxina y se usa en experimentos para evaluar la neuroprotección de los compuestos. NMDA es un agonista del glutamato y causa los efectos neurotóxicos asociados con la unión del receptor NMDA.

20 La respuesta producida por la célula en presencia de NMDA será un aumento en la concentración de los iones de calcio intracelular. Un agente neuroprotector debería poder reducir este aumento.

Por lo tanto, una reducción en el tamaño de la respuesta de las células a NMDA inferiría que un compuesto de prueba era neuroprotector.

Los experimentos descritos en este ejemplo comparan la respuesta producida por las células en presencia de NMDA antes y después del tratamiento con el artículo de prueba de cannabinoides.

25 La tabla 3 a continuación detalla los resultados obtenidos.

Tabla 3:

Artículo de prueba	Pretratamiento [Ca <sup>2+</sup> ]	% $\Delta$ F/F	Tratamiento posterior [Ca <sup>2+</sup> ]	% $\Delta$ F/F	Respuesta (% de cambio)
P-CBD	0.722	91.70	0.302	32.91	58.2
E-CBD	0.712	173.73	0.549	120.73	22.9
C-CBD	0.703	81.61	0.502	44.51	28.6
P-THC	0.741	93.69	0.596	63.81	19.6
E-THC	0.798	161.35	0.600	78.48	24.8
C-THC	1.082	133.92	0.737	59.57	31.9

Como se puede ver arriba, todas las muestras fueron capaces de reducir la concentración de iones de calcio intracelular, lo que demuestra que tienen el potencial de ser neuroprotectores.

30 Se demostró que el CBD esencialmente puro produce una reducción mucho mayor en la concentración de los iones de calcio intracelular en comparación con las otras muestras de prueba.

Aunque esta respuesta parece mostrar que el CBD esencialmente puro sería más beneficioso como agente neuroprotector que el de los otros artículos de prueba, este no es necesariamente el caso.

35 Los fármacos que pueden interferir fuertemente con la acción de NMDA tienden a causar efectos secundarios en el aprendizaje y la memoria. Esto se debe al requisito en el cerebro de bajas concentraciones de glutamato para las funciones relacionadas con el aprendizaje y la memoria. Cuando un fármaco puede reducir los efectos en el receptor

de NMDA a un nivel tan alto, aunque las neuronas estarán protegidas, es probable que la cognición de un paciente se vea afectada al mismo tiempo.

5 Todos los otros artículos de prueba dieron reducciones similares en la concentración de iones de calcio intracelular de alrededor de un 20-30% de reducción. Esta reducción es más probable que sea neuroprotectora sin efectos cognitivos dañinos.

En este conjunto de experimentos, hubo poca diferencia en los resultados obtenidos entre los comparadores y los extractos de plantas que contienen cannabinoides. El THC esencialmente puro dio la menor cantidad de reducción.

Ejemplo 3:

Acción a largo plazo de los cannabinoides sobre la concentración de iones de calcio intracelular.

10 Para evaluar los efectos crónicos de las diferentes formas de cannabinoides sobre la concentración de ion calcio intracelular, las células se incubaron durante la noche con 1  $\mu$ M del artículo de prueba a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Se evaluaron las respuestas a dosis crecientes de NMDA (1, 10 y 100  $\mu$ M).

Debido a que es muy probable que el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas requiera más de una dosis de medicación, se realizó una evaluación de los efectos de los cannabinoides a largo plazo.

15 Una reducción en la concentración de iones de calcio intracelular inferiría que el cannabinoide tenía efectos neuroprotectores.

La concentración de iones de calcio intracelular se midió en las células antes del tratamiento, para determinar el efecto que el artículo de prueba tenía en la concentración cuando se incubaba durante la noche.

20 Estos datos se muestran en la tabla 4 a continuación y se pueden comparar con los datos producidos a partir del tratamiento agudo con las diferentes formas de cannabinoides como se describe en el ejemplo 1 (Tabla 2).

Los controles que se usaron fueron placas de cultivo ingenuas sin incubación con el artículo de prueba; el NMDA se añadió a la concentración apropiada y se determinó el cambio en la concentración de iones de calcio intracelular.

Tabla 4:

Artículo de prueba	Concentración de la respuesta de Ca <sup>2+</sup> intracelular (Trat. Post.)	Cambio del control (%)
Control	0.775	-
P-CBD	0.893	13.2
E-CBD	0.786	1.4
C-CBD	0.919	15.7
P-THC	0.826	6.2
E-THC	0.751	-3.2
C-THC	0.814	4.8

25 Un cambio porcentual más pequeño del valor de control demuestra un aumento menor en la concentración de iones de calcio intracelular. Una cifra negativa para el cambio porcentual del valor de control demuestra una reducción en la concentración de iones de calcio.

30 Como se detalla en la tabla anterior, se puede ver que el extracto de planta que contiene CBD produjo un cambio mucho más pequeño en la concentración de ion calcio intracelular que la producida por el CBD esencialmente puro y el comparador de CBD. El cambio en la concentración de iones de calcio intracelular que fue producido por el extracto de planta que contiene CBD fue de un nivel similar al producido por el control.

Se demostró que el extracto de planta que contiene THC reduce la concentración de los iones de calcio intracelular, mientras que la incubación con el THC esencialmente puro y el comparador de THC dieron como resultado un aumento que no fue tan grande como el aumento producido por el CBD esencialmente puro y comparador de CBD.

Estos datos son muy importantes ya que muestran que los extractos de plantas que contienen cannabinoides no causan una alteración significativa en las neuronas de la concentración basal de ion calcio.

5 Cuando estos datos se comparan con los de la tabla 2 (ejemplo 1), donde la aplicación aguda de todos los artículos de prueba produjo un aumento en la concentración de iones de calcio intracelular, se puede observar que el uso de extractos de plantas que contienen cannabinoides, como un tratamiento a largo plazo no interferiría con la señalización celular.

Los cannabinoides esencialmente puros y los comparadores podrían potencialmente causar apoptosis o daño celular cuando se usan como un tratamiento a largo plazo, ya que las concentraciones de iones de calcio intracelular crónicas producidas por la incubación durante la noche con estos cannabinoides se consideran dañinos.

10 También se evaluó el efecto del aumento de las concentraciones de la neurotoxina NMDA en la concentración de iones de calcio intracelular.

Las tablas 5 a 7 a continuación detallan las respuestas de las células a las diferentes concentraciones de NMDA. Una reducción en la concentración de iones de calcio intracelular inferiría que el artículo de prueba con el que se incubaron las células durante la noche fue capaz de producir efectos neuroprotectores en las neuronas.

15 Tabla 5: NMDA 1  $\mu$ M

Artículo de prueba	Concentración de Ca <sup>2+</sup> intracelular			%Δ F/F
	Pretratamiento	Tratamiento posterior	Respuesta (Trat. Post.)	
P-CBD	0.933	0.410	-0.523	43.80
E-CBD	0.778	0.221	-0.557	27.33
C-CBD	0.967	0.417	-0.550	41.47
P-THC	0.839	0.522	-0.317	62.24
E-THC	0.746	0.135	-0.611	18.13
C-THC	0.811	0.492	-0.319	60.70

20 Como se muestra en la tabla 5 anterior, todos los artículos de prueba redujeron la concentración de iones de calcio intracelular después del tratamiento con NMDA 1  $\mu$ M. Todos los artículos de prueba redujeron la concentración en un grado similar, aparte del THC esencialmente puro y el comparador de THC. Estas muestras no redujeron la concentración de iones de calcio tanto como las otras.

A partir de estos datos, en la concentración más baja de NMDA analizada, todos los artículos de prueba muestran potencial para la neuroprotección. Cuando estos datos se combinan con los datos de la tabla 4, queda claro que solo los extractos de plantas que contienen cannabinoides serían útiles, ya que no aumentaron la concentración de iones de calcio intracelular en el tratamiento a largo plazo, mientras que los otros artículos de prueba sí lo hicieron.

25 Tabla 6: 10  $\mu$ M NMDA

Artículo de prueba	Concentración de Ca <sup>2+</sup> intracelular			%Δ F/F
	Pretratamiento	Tratamiento posterior	Respuesta (Trat. Post.)	
P-CBD	0.913	0.489	-0.424	53.54
E-CBD	0.813	0.491	-0.322	60.35
C-CBD	1.048	0.495	-0.533	47.24
P-THC	0.866	0.498	-0.368	57.50

E-THC	0.802	0.842	0.040	104.98
C-THC	0.861	0.578	-0.283	67.12

Como se describe en la tabla 6, todos los artículos de prueba, excepto el extracto de planta que contiene THC, dieron como resultado una disminución en la concentración de iones de calcio intracelular. La cantidad de reducción mostrada por todos los otros artículos de prueba fue similar a la mostrada en la concentración de NMDA de 1  $\mu$ M.

- 5 Como se señaló anteriormente cuando estos datos se comparan con los datos de la tabla 4, el extracto de planta que contiene CBD sería beneficioso como neuroprotector a esta mayor concentración de NMDA.

Tabla 7: NMDA 100  $\mu$ M

Artículo de prueba	Concentración de Ca <sup>2+</sup> intracelular			%Δ F/F
	Pretratamiento	Tratamiento posterior	Respuesta (Trat. Post.)	
P-CBD	0.910	1.289	0.379	141.57
E-CBD	0.881	1.004	0.123	114.01
C-CBD	1.148	1.404	0.256	122.31
P-THC	0.947	1.897	0.950	200.35
E-THC	0.872	2.578	1.706	295.77
C-THC	0.942	1.599	0.657	169.76

- 10 En la concentración más alta de NMDA, ninguno de los artículos de prueba fue capaz de reducir la concentración de iones de calcio intracelular. Este resultado no es sorprendente, ya que una concentración de NMDA 100  $\mu$ M es extremadamente neurotóxica y puede provocar la muerte celular inmediata. En las concentraciones más bajas de NMDA hay degeneración neural y posiblemente apoptosis tardía.

Ejemplo 4:

- 15 Efectos agudos de los cannabinoides en la respuesta de iones de calcio NMDA después de la incubación durante la noche

Para evaluar si los efectos neuroprotectores provocados por los artículos de prueba en el ejemplo 2 (tabla 3) se alteraron mediante la incubación durante la noche con las diferentes formas de cannabinoides, se llevaron a cabo los siguientes experimentos. Se ha especulado previamente que los receptores de cannabinoides pueden desensibilizarse cuando se exponen a su agonista durante un período de tiempo más prolongado.

- 20 Las neuronas del hipocampo se incubaron durante la noche con un artículo de prueba 1  $\mu$ M. La neurotoxina NMDA se aplicó luego a una concentración de 10  $\mu$ M durante 2 minutos; esto fue seguido por una aplicación de 5 minutos de 1  $\mu$ M del mismo artículo de prueba.

- 25 La tabla 8 detalla las concentraciones de iones de calcio intracelular cuando se tratan con las diferentes formas de cannabinoides. De manera similar a los efectos descritos en el ejemplo 2, una reducción en la concentración de iones de calcio intracelular inferiría que el artículo de prueba tenía un efecto neuroprotector. Los comparadores de CBD y THC no se probaron en este experimento.

Tabla 8:

Artículo de prueba	Pretratamiento [Ca <sup>2+</sup> ]	%Δ F/F	Tratamiento posterior [Ca <sup>2+</sup> ]	%Δ F/F	Respuesta (% de cambio)
P-CBD	0.424	52.42	0.715	71.97	-68.6

## ES 2 698 370 T3

E-CBD	0.662	77.63	0.336	32.43	49.2
P-THC	0.379	46.53	0.487	38.93	-28.5
E-THC	0.843	112.08	0.680	62.11	19.3

5 Como se puede ver en la tabla anterior, ambos de los cannabinoides esencialmente puros dieron como resultado un aumento en la concentración de los iones de calcio intracelulares. El CBD esencialmente puro incrementó la concentración en gran medida y una que, en sí misma, podría ser neurotóxica en lugar de neuroprotectora. Esto es sorprendente como en el ejemplo 2; El CBD esencialmente puro produjo la mayor reducción en la concentración de iones de calcio intracelular.

Tanto el extracto de planta que contiene CBD como el THC redujeron la concentración de iones de calcio intracelular. Esto muestra claramente que los extractos de plantas que contienen cannabinoides tienen un potencial mucho mayor de ser agentes neuroprotectores.

10 Conclusión:

Los datos generados por la serie de experimentos descritos en los ejemplos adjuntos proporcionan una clara evidencia de que los extractos de plantas que contienen cannabinoides son más eficaces que sus equivalentes esencialmente puros.

15 Además, los datos de las muestras comparativas de cannabinoides proporcionan evidencia de que la razón de la eficacia mejorada de los extractos que contienen cannabinoides sobre los cannabinoides esencialmente puros no se debe únicamente a la presencia del cannabinoide secundario (o el segundo más predominante) en el extracto de planta que contiene cannabinoides.

20 Parece que la mayor eficacia de los extractos de plantas que contienen cannabinoides es como resultado de la presencia de uno o más de los otros componentes identificados en los extractos de plantas. Estos otros componentes incluyen, pero no se limitan a, los otros cannabinoides o constituyentes de la fracción no cannabinoide, como se detalla en la tabla 1.

**REIVINDICACIONES**

1. Un extracto de plantas de *Cannabis sativa* L que comprende cualquiera:
- a) un extracto en el que un cannabinoide principal es tetrahidrocannabinol (THC) y el extracto comprende (p/p del extracto)
- 5 i) 63.0 - 78.0% de THC, 0.1 - 2.5% de cannabidiol, 1.0 - 2.0% de cannabigerol, 0.8-2.2% de cannabicromeno, 0.4 - 1.0% de tetrahidrocannabivarina y <2.0% de ácido tetrahidrocannabinólico; y
- ii) <6.0% de terpenos incluyendo monoterpenos; di/tri-terpenos; sesquiterpenos; y otros terpenos, y 6.3 - 26.7% de esteroides; triglicéridos; alcanos; escualeno; tocoferol; y carotenoides, o
- b) un extracto en el que un cannabinoide principal es el cannabidiol (CDB) y el extracto comprende (p/p del extracto)
- 10 i) 57.0 - 72.0% de CBD, 2.0 - 6.5% de THC, 0.8 - 6.5% de cannabigerol, 3.0 - 6.5% de cannabicromeno, 1.0 -2.0% de cannabidivarina, y <2.0% de ácido cannabidiólico y
- ii) <5.8% de terpenos incluyendo monoterpenos; di/tri-terpenos; sesquiterpenos; y otros terpenos, y 1.7 - 28.4% de esteroides; triglicéridos; alcanos; escualeno; tocoferol; y carotenoides; y
- 15 en el que la proporción de la fracción que contiene cannabinoides (i) y la fracción que no contiene cannabinoides (ii) está entre 60:40 y 90:10 del extracto total.