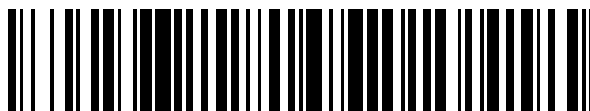


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 839**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2008 PCT/GB2008/001359**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2008 WO08129258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2008 E 08737019 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2146731**

54 Título: **Extractos de plantas que contienen cannabinoides para el tratamiento del cáncer de próstata**

30 Prioridad:

19.04.2007 GB 0707610

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

25.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DI MARZO, VINCENZO;
DE PETROCELLIS, LUCIANO y
SCHIANO MORIELLO, ANIELLO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 717 839 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 cannabinoides para el tratamiento del cáncer de próstata

5 La presente invención se refiere a uno o más cannabinoides, que son antagonistas de TRPM8, que se seleccionan del grupo que consiste en cannabidiol (CBD); cannabigerol (CBG); y ácido cannabidiólico (CBDA) para usar en la prevención o tratamiento del cáncer de próstata, donde la actividad de TRPM8 es esencial para la supervivencia de los cánceres.

Antecedentes de la invención

10

Se sabe que los canales del receptor de potencial transitorio (TRP) están a la vanguardia de los sistemas sensoriales de los mamíferos y se encontró que están involucrados en la respuesta a la temperatura, al tacto, al dolor, a la osmolaridad, a las feromonas, al gusto y a otros estímulos. Se piensa que el papel de los canales TRP es mucho más amplio que la simple transducción sensorial, ya que son capaces de responder a muchos estímulos, tanto desde dentro como desde fuera de la célula.

15

Los mamíferos son capaces de detectar la temperatura con neuronas especializadas en su sistema nervioso periférico. Estas neuronas son un subconjunto de canales TRP: canales de tipo vainilloide (TRPV). Se han identificado cuatro canales TRPV diferentes (TRPV1-4) y están implicados en la detección del calor. Estos son canales iónicos sensibles a la temperatura y contribuyen de manera crítica a la sensación normal de dolor y temperatura. Como tales, son dianas útiles para el alivio del dolor.

20

Un subconjunto diferente, los canales TRPM (tipo melastatina), en particular el canal TRPM8, está implicado en la detección de temperaturas frías de menos de 25 °C. El intervalo combinado de temperaturas que estos canales pueden detectar cubre la mayoría de las temperaturas relevantes de "intervalo normal" que detecta la mayoría de los mamíferos. Los agentes que se aplican externamente, tales como el mentol, el eucaliptol y la icilina, pueden activar los canales TRPM8.

25

La regulación positiva de la actividad del canal TRPM8 se produce en presencia de ciertas células tumorales, que incluyen las células de carcinomas de próstata y de otros tumores humanos primarios no prostáticos como el cáncer de mama, colon, pulmón y piel.

30

El subconjunto de canales TRP conocidos como canales similares a la anquirina (TRPA), en particular los canales TRPA1, son canales que se activan en frío. Los canales TRPA1 tienen una temperatura de activación más baja en comparación con el canal TRPM8. El canal TRPA1 (que también se conoce como ANKTM1) comparte muy poca homología de aminoácidos con el canal TRPM8, y como tal, se cree que es un miembro distante de la familia de los canales TRP.

35

Se ha encontrado que los canales TRPA1 se activan en presencia de compuestos fríos nocivos y picantes naturales, como los que se encuentran en el aceite de canela, aceite de gaulteria, aceite de clavo, aceite de mostaza, ajo crudo, alcanfor y jengibre. También se ha demostrado que la bradiquinina, que es un péptido inflamatorio que actúa a través del receptor acoplado a la proteína G, activa TRPA1.

40

La aplicación tópica de compuestos tales como el aceite de mostaza (isotiocianato de alilo) activa las terminaciones nerviosas sensoriales; esto a su vez produce dolor, inflamación e hipersensibilidad a los estímulos térmicos y mecánicos. La activación de los canales TRPA1 causa estos efectos. Se ha demostrado que el aceite de canela (cinamaldehído) es el activador TRPA1 más específico. Excita el canal TRPA1 y es capaz de provocar un comportamiento nociceptivo en ratones. La activación de TRPA1 produce una sensación dolorosa y, por lo tanto, el comportamiento nociceptivo que provoca en los mamíferos proporciona un modelo que explica por qué el frío nocivo puede percibirse como dolor ardiente, (Bandell y otros, Neuron 2004).

45

Además, se ha demostrado que el cannabinoide tetrahidrocannabinol (THC) activa los canales TRPA1 (Jordt y otros, Nature 2004) porque actúa de manera similar al aceite de mostaza y al cinamaldehído.

50

TRPA1 también es diana de los irritantes ambientales como la acroleína, que es responsable de las acciones tóxicas e inflamatorias de los gases lacrimógenos, los gases de escape de los vehículos y los subproductos metabólicos de los agentes quimioterapéuticos.

55

El uso de ratones deficientes en TRPA1 ha demostrado que este canal es la única diana a través de la cual el aceite de mostaza y el ajo activan los nociceptores aferentes primarios para producir dolor inflamatorio. Los ratones deficientes en TRPA1 muestran una sensibilidad normal al frío y no se daña la función auditiva, lo que sugiere que este canal no es necesario para la detección inicial de frío o sonido nocivos. Sin embargo, estos ratones presentan déficits pronunciados de la excitación del nociceptor evocado por bradiquinina e hipersensibilidad al dolor. Por lo tanto, se puede concluir que el TRPA1 es un componente importante de la maquinaria de transducción a través de la cual los agentes irritantes ambientales y los agentes proanalgésicos endógenos despolarizan los nociceptores para provocar dolor inflamatorio (Bautista y otros, Cell 2006).

60

65

La hiperalgesia por frío es una sensibilidad al dolor aumentada y es un síntoma bien documentado de dolor inflamatorio y neuropático; sin embargo, se conocen poco los mecanismos subyacentes de esta condición. Se encontró que el bloqueo farmacológico de TRPA1 en las neuronas sensoriales primarias es capaz de revertir la hiperalgesia por frío producto de la inflamación y la lesión nerviosa. Por lo tanto, el bloqueo de TRPA1 en las neuronas sensoriales podría proporcionar una estrategia fructífera para tratar la hiperalgesia por frío debida a la inflamación y al daño nervioso. Obata y otros, J Clin Invest 2005).

El Ca^{2+} intracelular activa el TRPA1 humano a través de un dominio mano EF y la sensibilidad al frío ocurre indirectamente (y no fisiológicamente) a través del $[Ca^{2+}]$ que aumenta durante el enfriamiento en sistemas heterólogos. (Zurborg y otros, Nature Neurosci 2007).

Se ha examinado la incidencia de hiperalgesia por frío después de la ligadura del nervio espinal (SNL) de L5, porque es probable que la activación de dos poblaciones distintas de neuronas pequeñas que expresan TRPA1 y TRPM8 sea la causa subyacente de la sensación de frío. En el cercano L4 no lesionada (ganglio de la ruta dorsal (DRG), la expresión del ARNm de TRPA1 aumentó en las neuronas de diámetro pequeño a mediano que expresan trkA desde el día 1 al 14 después de la SNL de L5. Esta regulación positiva correspondió bien con el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia por frío que se indujo por lesiones nerviosas de la pata trasera. En contraste, no hubo cambios en la expresión del ARNm de la proteína de TRPM8 en el DRG de L4 a lo largo de las 2 semanas de duración del experimento. En el DRG de L5 lesionado, por otra parte, tanto la expresión de TRPA1 como la de TRPM8 disminuyeron durante las 2 semanas posteriores a la ligadura. Además, la administración intratecal de TRPA1, pero no TRPM8, oligodesoxinucleótidos antisentidos, suprimió la hiperalgesia por frío inducida por la SNL de L5. El aumento de TRPA1 en las neuronas aferentes primarias no lesionadas puede contribuir a la respuesta exagerada al frío que se observa en el modelo de dolor neuropático, (Katsura y otros, Exp Neurol 2006).

El dolor neuropático es un dolor crónico que generalmente se acompaña o se debe a una lesión tisular. Con dolor neuropático, las fibras nerviosas a menudo se dañan, se vuelven disfuncionales o se lesionan. Estas fibras nerviosas dañadas envían señales incorrectas a otros centros de dolor, lo que resulta en dolor crónico. El impacto de la lesión de la fibra nerviosa incluye un cambio en la función nerviosa, tanto en el sitio de la lesión como en las áreas alrededor de la lesión.

El llamado síndrome del miembro fantasma es un ejemplo de dolor neuropático. Esto ocurre cuando se amputa un brazo o una pierna debido a una enfermedad o lesión, pero el cerebro aún recibe mensajes de dolor de los nervios que originalmente transmitían los impulsos de la extremidad que falta. Estos nervios ahora fallan y causan dolor.

El dolor neuropático a menudo parece no tener una causa obvia; pero, algunas causas comunes de dolor neuropático incluyen: esclerosis múltiple, diabetes, lesión de la espalda, amputación, cirugía de la columna vertebral, infección por VIH, culebrilla, alcoholismo y problemas con los nervios faciales.

Los síntomas del dolor neuropático incluyen dolor punzante y ardor, hormigueo y entumecimiento y aumento de la sensibilidad al tacto o al frío.

Los tratamientos actuales incluyen el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos y analgésicos más fuertes, tales como fármacos a base de morfina. Los fármacos anticonvulsivos y antidepresivos también se usan a menudo para tratar el dolor neuropático.

Muy a menudo el dolor neuropático puede ser difícil de tratar; en este caso, un especialista en dolor puede usar terapias con dispositivos invasivos o implantables para controlar el dolor de manera efectiva. La estimulación eléctrica de los nervios involucrados en la generación del dolor neuropático puede controlar significativamente los síntomas del dolor.

Desafortunadamente, el dolor neuropático a menudo responde pobremente a los tratamientos estándar para el dolor y, en ocasiones, puede empeorar en lugar de mejorar con el tiempo. Para algunas personas, esto puede conducir a una discapacidad grave.

La inflamación es la primera respuesta del sistema inmunitario a una infección o irritación. La inflamación a menudo causa enrojecimiento, hinchazón, dolor y disfunción del área afectada.

La inflamación puede asociarse, además, con otros síntomas que incluyen: fiebre, escalofríos, fatiga, pérdida de energía, dolores de cabeza, pérdida del apetito y rigidez muscular.

La inflamación se debe a sustancias químicas que se liberan de los glóbulos blancos hacia la sangre o a los tejidos afectados en un intento de liberar el cuerpo de sustancias extrañas. Esta liberación de sustancias químicas aumenta el flujo de sangre al área, y puede resultar en enrojecimiento y calor. Algunas de las sustancias químicas causan una fuga de líquido hacia los tejidos, que resulta en hinchazón. El proceso inflamatorio puede estimular los nervios y causar dolor.

Además, puede ocurrir inflamación de las articulaciones, esto se debe a un mayor número de células y sustancias inflamatorias dentro de la articulación, que causan irritación, desgaste del cartílago (almohadillas en los extremos de los huesos) e hinchazón del revestimiento de la articulación.

5 Además, la inflamación puede afectar a los órganos como parte de un trastorno autoinmune. Por ejemplo: Inflamación del corazón (miocarditis), que puede causar dificultad para respirar o hinchazón de las piernas; inflamación de los pequeños tubos que transportan aire a los pulmones, lo que puede causar un ataque de asma; inflamación de los riñones (nefritis), que puede causar presión arterial alta o insuficiencia renal; e inflamación del intestino grueso (colitis), que puede causar calambres y diarrea.

10 El dolor puede no ser un síntoma primario de la enfermedad inflamatoria, ya que muchos órganos no tienen muchos nervios sensibles al dolor. El tratamiento de la inflamación de los órganos, siempre que sea posible, se dirige a la causa de la inflamación.

15 Hay una serie de opciones de tratamiento para enfermedades inflamatorias que incluyen medicamentos, reposo, ejercicio y cirugía para corregir el daño articular. El tipo de tratamiento que se prescribe dependerá de diversos factores que incluyen el tipo de enfermedad, la edad de la persona, el tipo de medicamentos que toma, la salud general, el historial médico y la gravedad de los síntomas.

20 Hay muchos medicamentos disponibles para disminuir el dolor, la hinchazón y la inflamación de las articulaciones y para prevenir o minimizar la progresión de la enfermedad inflamatoria. Los medicamentos incluyen: Fármacos antiinflamatorios no esteroideos, corticosteroides y medicamentos contra la malaria.

25 Se ha demostrado que el bloqueo del canal TRPA1 alivia la hiperalgesia por frío. Esta es una sensibilidad aumentada al dolor y es un síntoma bien documentado de dolor inflamatorio y neuropático y, como tal, se cree que los agentes capaces de bloquear los canales de TRPA1 podrían ser tratamientos útiles para el dolor y la inflamación neuropáticos.

30 El bloqueo de los canales TRPA1 produce, además, vasodilatación, por lo tanto, los agentes capaces de producir dicho efecto, también podrían ser útiles como vasodilatadores. Los vasodilatadores a menudo se usan para tratar afecciones como la hipotensión o los coágulos de sangre cuando se necesita dilatar los vasos sanguíneos.

35 Los cannabinoides son un grupo de sustancias químicas conocidas por activar los receptores de cannabinoides en las células. Estas sustancias químicas, que se encuentran en las plantas de cannabis, se producen también de manera endógena en los seres humanos y en otros animales, estos últimos se denominan endocannabinoides. Los cannabinoides sintéticos son sustancias químicas con estructuras similares a los cannabinoides de las plantas o a los endocannabinoides.

40 Los cannabinoides de las plantas pueden aislarse, además, de manera que sean compuestos "esencialmente puros". Estos cannabinoides aislados están esencialmente libres de otros compuestos naturales, tales como otros cannabinoides menores y moléculas tales como los terpenos. Los compuestos esencialmente puros tienen un grado de pureza de hasta al menos 95 % en peso.

45 Se ha demostrado que el cannabinoide tetrahidrocannabinol (THC) activa los canales TRPA1 (Jordt y otros, Nature 2004) mediante una acción de manera similar al aceite de mostaza y el cinamaldehído. El tipo de THC que se usa en este estudio fue THC sintético. El THC sintético, como el dronabinol, puede causar muchos efectos secundarios en quienes los usen. Tales efectos secundarios incluyen: palpitaciones, taquicardia, rubor facial, dolor abdominal, náuseas, vómitos, amnesia, ansiedad/nerviosismo, ataxia, confusión, despersonalización, mareos, euforia, alucinaciones, paranoia, somnolencia, hipotensión, diarrea, depresión, pesadillas y dificultades de la visión.

50 Sorprendentemente, los solicitantes han encontrado que la administración de extractos de plantas que contienen cannabinoides es eficaz en el bloqueo de los canales TRPV1, TRPM8 y TRPA1. En particular, fueron especialmente eficaces los extractos de plantas que contienen cannabinoides que comprenden como cannabinoide predominante tetrahidrocannabinol (THC), ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), cannabidiol (CBD), ácido cannabidiólico (CBDA), cannabigerol (CBG) o cannabicromeno (CBC).

55 El término "extracto de planta que contiene cannabinoides" se toma en la presente descripción 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. El grado de pureza que se obtiene y los intervalos respectivos de cannabinoides adicionales en el extracto de planta que contiene cannabinoides, variarán de acuerdo con el material vegetal de partida y la metodología de extracción que se utilice.

60 Los extractos de plantas que contienen cannabinoides pueden obtenerse mediante diversos medios de extracción del material de planta de cannabis. Tales medios incluyen, pero no se limitan a: extracción supercrítica o subcrítica con CO₂, extracción con gas caliente y extracción con solventes.

65

Resumen de la invención

- 5 De acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se proporcionan uno o más cannabinoides, que son antagonistas de TRPM8, seleccionados del grupo que consiste en cannabidiol (CBD); cannabigerol (CBG); y ácido cannabidiólico (CBDA) para usar en la prevención o tratamiento del cáncer de próstata, donde la actividad de TRPM8 es esencial para la supervivencia de los cánceres.
- 10 Los cannabinoides pueden extraerse de una planta de cannabis mediante el uso de la técnica de extracción subcrítica de CO₂, tal como se describe en la patente del Reino Unido núm. GB2391865 concedida a los solicitantes.
- Otra técnica de extracción de cannabis de la planta es la extracción con gas caliente, como se describe en la patente del Reino Unido núm. GB2376464 concedida a los solicitantes.
- 15 Preferentemente, los cannabinoides están presentes como un extracto medicinal a base de cannabis (CBME).
- Un CBME es un extracto de la planta de cannabis y, como tal, en dependencia de la técnica de extracción que se use, comprenderá todos los componentes de la planta de cannabis "que se extraen naturalmente".
- 20 Alternativamente, el extracto de planta que contiene cannabinoides se aísla o es sustancialmente puro.
- Los cannabinoides aislados o prácticamente puros estarán prácticamente libres de otros cannabinoides no diana y otros componentes no cannabinoides tales como los terpenos. Los cannabinoides aislados o prácticamente puros pueden ser naturales, es decir, de origen vegetal o pueden ser compuestos que se producen sintéticamente.
- 25 El proceso descrito en la patente del Reino Unido núm. GB2393721 concedida a los solicitantes, describe un proceso para preparar cannabinoides prácticamente puros.
- "Sustancialmente puro" se define en la presente como preparaciones de compuestos cannabinoides o derivados de estos que tienen una pureza cromatográfica mayor que 95 %, preferentemente mayor que 96 %, más preferentemente mayor que 97 %, más preferentemente mayor que 98 %, más preferentemente mayor que 99 % y con la máxima preferencia mayor que 99,5 %, determinado por la normalización del área de un perfil de HPLC.
- 30 En una modalidad, el extracto de planta que contiene cannabinoides se empaqueta para el suministro en una forma de dosificación tituable.
- 35 El término "titulación" significa que el paciente recibe un medicamento en una forma tal que pueden tomarse dosis más pequeñas que la dosis unitaria.
- Una "dosis unitaria" se define en la presente descripción como una dosis máxima de medicamento que puede tomarse en cualquier momento o dentro de un período específico de dosificación, tal como 3 horas.
- 40 La titulación de las dosis es beneficiosa para el paciente, ya que ellos pueden aumentar la dosis gradualmente hasta que el fármaco sea eficaz. Es comprensible que no todos los pacientes requerirán exactamente la misma dosis del medicamento, por ejemplo, los pacientes más corpulentos o con un metabolismo más rápido pueden requerir una dosis más alta que la que requiera un paciente menos corpulento. Diferentes pacientes también pueden presentar diferentes grados de quejas y, como tales, pueden requerir dosis mayores o menores para tratar la queja de manera efectiva. Por lo tanto, son evidentes los beneficios de una forma de dosificación tituable sobre una forma de dosificación estándar, que debería dividirse en una dosis parcial.
- 45 Los intervalos de dosis unitarias para el extracto de planta que contiene cannabinoides pueden determinarse por referencia al contenido de cannabinoides que está preferentemente en el intervalo entre 5 y 100 mg del total de cannabinoides.
- 50 Preferentemente, las formulaciones farmacéuticas se empacan para su administración de manera que la administración se dirige a un área que se selecciona entre una o más de las siguientes: sublingual; bucal; oral; rectal; nasal; parenteral y por vía del sistema pulmonar.
- 55 Con mayor preferencia, las formulaciones farmacéuticas están en la forma que se selecciona entre una o más de las siguientes: gel; gel en aspersion; tableta; líquido; cápsula, por inyección y para vaporización.
- 60 Adicionalmente, la formulación farmacéutica comprende además uno o más vehículos disolventes. Preferentemente, los vehículos disolventes son etanol y/o propilenglicol. Con mayor preferencia, la relación de etanol a propilenglicol está entre 4:1 y 1:4. Con mayor preferencia aún la relación es prácticamente 1:1.
- 65 Como se explica con más detalle en la presente descripción, por "tratamiento" se entiende al menos una mejoría, preferentemente la curación de la afección en cuestión.

Ciertos aspectos de esta invención se describen más adelante, por medio de ejemplo solamente.

Descripción específica

5 Los solicitantes realizaron experimentos con extractos de plantas que contienen cannabinoides en ratas recombinantes de canales TRPV1, canales TRPM8 y canales TRPA1 (también conocidos como ANKTM1), ambos se expresaron de forma estable en células HEK293. El canal TRPA1 es el receptor para los isotiocianatos de aceite de mostaza y otros productos naturales de plantas como el cinamaldehído. El canal TRPM8 es el receptor para el mentol y la icilina. La concentración intracelular de Ca^{2+} se determinó antes y después de la adición de diversas concentraciones de los compuestos de prueba. Los datos que se presentan a partir de experimentos con los canales TRPV1 y TRPA1 no son el objeto de la invención y se incluyen solo con fines informativos.

15 Sorprendentemente, se descubrió que los extractos de plantas que contenían cannabinoides fueron capaces de bloquear los canales que se evaluaron y produjeron valores estimados de EC_{50} en el intervalo de 100 nM, y por debajo.

Ejemplo 1:

20 Efectos de los extractos de plantas que contienen cannabinoides sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular

Materiales y métodos

Compuestos

25 Para los experimentos con los canales TRPA1, se usaron isotiocianato de alilo (aceite de mostaza) y cinamaldehído como controles positivos para comparar con los valores que se obtienen de extractos de plantas que contienen cannabinoides. Para los experimentos con los canales TRPM8 se utilizaron mentol e icilina para activar los canales. Para los experimentos con los canales TRPV1 se usó ionomicina para activar los canales. Los extractos de planta que contienen cannabinoides se produjeron a partir de plantas de cannabis mediante el uso de la técnica de extracción subcrítica de CO_2 , como se describe en la patente del Reino Unido núm. GB2391865 de los solicitantes. Los cannabinoides se purificaron posteriormente mediante el uso del método descrito en la patente del Reino Unido núm. GB2393721 de los solicitantes para producir cannabinoides prácticamente puros. Los extractos vegetales no purificados de THC y CBD también se probaron en los experimentos con los canales TRPA1.

35 Transfección permanente de células HEK-293 con ADNc de TRPA1, TRPV1 o TRPM8 de rata

Se sembraron células HEK293 (riñón embrionario humano) en placas Petri de 100 mm de diámetro y cuando alcanzaron aproximadamente 80 % de confluencia se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) mediante el uso de un plásmido que contiene ADNc de TRPA1, TRPV1 o TRPM8 de rata, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se seleccionó un clon transfectado de manera estable mediante Geneticin G-418 (Invitrogen) 600 μ g/ml. La transfección estable se verificó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). El análisis de PCR en el ADN de las células TRPA1/TRPV1/TRPM8-HEK293 demostró la integración completa del gen en el genoma de las células HEK293 (no mostrado).

45 Experimentos en células HEK-293 que sobreexpresan el canal TRPA1, TRPV1 o TRPM8 de rata

Las células TRPA/TRPV1/TRPM8-HEK-293 se colocaron en placas Petri de 100 mm de diámetro y, después de 3 días, se cargaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el indicador de calcio citoplasmático Fluo4-AM (4 μ M, Molecular Probes) disuelto en el tampón de Tyrode (NaCl 145 mM; KCl 2,5 mM; $CaCl_2$ 1,5 mM; $MgCl_2$ 1,2 mM; D-Glucosa 10 mM; HEPES 10 mM pH 7,4) que contiene Pluronic (0,02 %, Molecular Probes). Las células se lavaron dos veces en tampón Tyrode, se suspendieron y se transfirieron a la cubeta de cuarzo del espectrofluorómetro (Perkin-Elmer LS 50B) (λ excitación = 488 nm; λ emisión = 516 nm). La concentración de Ca^{2+} intracelular se determinó antes y después de la adición de diversas concentraciones de los compuestos de ensayo. Los valores de EC_{50} se determinaron como la concentración de sustancias de prueba que se requieren para producir aumentos de la mitad del máximo de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Los ajustes de curva y las estimaciones de los parámetros se realizaron con Graph Pad Prism®. Los mismos compuestos se evaluaron, además, en células HEK 293 no transfectadas.

Resultados

60 Como puede observarse en las Tablas 1 y 2, al ver los valores que se derivan de los experimentos, los valores log EC_{50} % para los cannabinoides que se probaron muestran que estos fueron capaces de producir un bloqueo de los canales de TRP.

65

Tabla 1: Canal TRPA1

5	Sustancia de prueba	$-\log EC_{50} \% (M)$ para la elevación de $[Ca^{2+}]_i$	Respuesta máxima (% de aceite de mostaza 100 μM)
	Aceite de mostaza (isotiocianato de alilo)	$5,60 \pm 0,15$	100 ± 11
	Cinamaldehído	$4,89 \pm 0,17$	$99,1 \pm 9$
10	THC	$6,73 \pm 0,18$	$116,9 \pm 12$
	THCA	$6,85 \pm 0,27$	$70,1 \pm 8$
	CBD	$7,07 \pm 0,03$	$86,9 \pm 8$
15	CBDA	$6,09 \pm 0,02$	$48,2 \pm 6$
	CBC	$7,48 \pm 0,31$	$117,5 \pm 10$
	CBD extracto de planta	$6,28 \pm 0,21$	$80,5 \pm 7$
20	THC extracto de planta	$7,93 \pm 1,90$	$79,5 \pm 8$

Los valores que se obtuvieron para los cannabinoides fueron altamente comparables a los del aceite de mostaza y del cinamaldehído, y sus potencias pueden clasificarse de la siguiente manera: Extracto de THC > CBC > CBD > THC > THCA > extracto de CBD > CBDA > aceite de mostaza > cinamaldehído. En particular, el extracto de THC, CBC y CBD mostraron valores de EC_{50} en el intervalo de concentraciones de 60-100 nM. Estos datos sugieren que TRPA1 podría ser una de las dianas moleculares subyacentes a algunas de las acciones farmacológicas de los fitocannabinoides.

Estos datos son significativos, ya que en la actualidad existen pocas opciones útiles para el tratamiento a los pacientes que sufren dolor neuropático, inflamación o vasoconstricción y sería útil usar cannabinoides en la producción de una formulación farmacéutica para tratar tales afecciones.

Tabla 2: Bloqueo de canales TRPM8

	pIC_{50} vs. mentol 50 μM	pIC_{50} vs. icilina 0,25 μM
35	CBC	<5
	THC	$6,86 \pm 0,04$
40	THCA	$7,17 \pm 0,05$
	CBD	$6,89 \pm 0,11$
	CBDA	$5,84 \pm 0,17$
45	CBG	$6,79 \pm 0,09$

La tabla anterior detalla la potencia de los cannabinoides en el bloqueo del canal TRPM8. Los valores que se obtuvieron demuestran que todos los cannabinoides fueron efectivos en el bloqueo y, como tales, los antagonistas de TRPM8 podrían proporcionar nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de cánceres donde la actividad de TRPM8 es esencial para la supervivencia de las células cancerosas.

Anteriormente se demostró que los extractos de plantas que contienen cannabinoides pueden usarse, solos o en combinación, para tratar varias enfermedades y afecciones de manera útil. Estos datos que se presentan en la presente descripción proporcionan la evidencia para el uso de extractos de plantas que contienen cannabinoides para el tratamiento de enfermedades y afecciones que se alivian mediante el bloqueo de los canales TRP. En la presente descripción se demostró que todos los cannabinoides que se probaron produjeron una activación de los canales TRPA1 y, como tales, podrían ser útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones que se alivian mediante la activación de los canales TRPA1. Además, se demostró que los cannabinoides que se probaron son capaces de antagonizar los canales TRPM8 y, como tales, son potencialmente útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones que se alivian mediante el antagonismo de los canales TRPM8.

Tabla 3: Bloqueo de canales TRPV1

Sustancia de prueba	EC ₅₀ % (M) para la elevación de [Ca ²⁺] _i	Respuesta máxima (% ionomicina)
Capsaicina	10 nM	68,6 ± 1,2
CBC-BDS	11,9 μM (equivalente a CBC)	35,2 ± 1,0
CBG-BDS	4,6 μM (equivalente a CBG)	32,5 ± 3,4
CBC	24,2 μM	9,0 ± 4,9
CBD	0,7 μM	50,0 ± 1,0
CBDV	1,4 μM	19,8 ± 1,9
CBG	1,0 μM	54,4 ± 5,4

La tabla anterior detalla la potencia de los cannabinoides en el bloqueo del canal TRPV1. Los valores que se obtienen demuestran que todos los cannabinoides fueron efectivos en el bloqueo y, como tales, los antagonistas de TRPV1 podrían proporcionar nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de pacientes que padecen de dolor neuropático, inflamación o vasoconstricción. Como puede observarse en las Tablas 1 y 2, al ver los valores que se derivan de los experimentos, los valores log EC₅₀ % para los cannabinoides que se probaron muestran que estos fueron capaces de producir un bloqueo de los canales de TRP.

Tabla 1: Canal TRPA1

Sustancia de prueba	-logEC ₅₀ % (M) para la elevación de [Ca ²⁺] _i	Respuesta máxima (% de aceite de mostaza 100 μM)
Aceite de mostaza (isotiocianato de alilo)	5,60 ± 0,15	100 ± 11
Cinamaldehído	4,89 ± 0,17	99,1 ± 9
THC	6,73 ± 0,18	116,9 ± 12
THCA	6,85 ± 0,27	70,1 ± 8
CBD	7,07 ± 0,03	86,9 ± 8
CBDA	6,09 ± 0,02	48,2 ± 6
CBC	7,48 ± 0,31	117,5 ± 10
CBD extracto de planta	6,28 ± 0,21	80,5 ± 7
THC extracto de planta	7,93 ± 1,90	79,5 ± 8

Los valores que se obtuvieron para los cannabinoides fueron altamente comparables a los del aceite de mostaza y del cinamaldehído, y sus potencias pueden clasificarse de la siguiente manera: Extracto de THC > CBC > CBD > THC > THCA > extracto de CBD > CBDA > aceite de mostaza > cinamaldehído. En particular, el extracto de THC, CBC y CBD mostraron valores de EC₅₀ en el intervalo de concentraciones de 60-100 nM. Estos datos sugieren que TRPA1 podría ser una de las dianas moleculares subyacentes a algunas de las acciones farmacológicas de los fitocannabinoides.

Estos datos son significativos, ya que en la actualidad existen pocas opciones útiles para el tratamiento a los pacientes que sufren dolor neuropático, inflamación o vasoconstricción y sería útil usar cannabinoides en la producción de una formulación farmacéutica para tratar tales afecciones.

Tabla 2: Bloqueo de canales TRPM8

	pIC ₅₀ vs. mentol 50 μM	pIC ₅₀ vs. icilina 0,25 μM
CBC	<5	<5
THC	6,86 ± 0,04	6,85 ± 0,08
THCA	7,17 ± 0,05	
CBD	6,89 ± 0,11	7,02 ± 0,05
CBDA	5,84 ± 0,17	5,99 ± 0,06
CBG	6,79 ± 0,09	6,84 ± 0,02

La tabla anterior detalla la potencia de los cannabinoides en el bloqueo del canal TRPM8. Los valores que se obtuvieron demuestran que todos los cannabinoides fueron efectivos en el bloqueo y, como tales, los antagonistas de TRPM8 podrían proporcionar nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de cánceres donde la actividad de TRPM8 es esencial para la supervivencia de las células cancerosas.

Anteriormente se demostró que los extractos de plantas que contienen cannabinoides pueden usarse, solos o en combinación, para tratar varias enfermedades y afecciones de manera útil. Estos datos que se presentan en la presente descripción proporcionan la evidencia para el uso de extractos de plantas que contienen cannabinoides para el tratamiento de enfermedades y afecciones que se alivian mediante el bloqueo de los canales TRP. En la presente descripción se demostró que todos los cannabinoides que se probaron produjeron una activación de los canales TRPA1 y, como tales, podrían ser útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones que se alivian mediante la activación de los canales TRPA1. Además, se demostró que los cannabinoides que se probaron son capaces de antagonizar los canales TRPM8 y, como tales, son potencialmente útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones que se alivian mediante el antagonismo de los canales TRPM8.

Tabla 3: Bloqueo de canales TRPV1 (ilustrativo)

Sustancia de prueba	EC ₅₀ % (M) para la elevación de [Ca ²⁺] _i	Respuesta máxima (% ionomicina)
Capsaicina	10 nm	68,6 ± 1,2
CBC-BDS	11,9 μM (equivalente a CBC)	35,2 ± 1,0
CBG-BDS	4,6 μM (equivalente a CBG)	32,5 ± 3,4
CBC	24,2 μM	9,0 ± 4,9
CBD	0,7 μM	50,0 ± 1,0
CBDV	1,4 μM	19,8 ± 1,9
CBG	1,0 μM	54,4 ± 5,4

La tabla anterior detalla la potencia de los cannabinoides en el bloqueo del canal TRPV1. Los valores que se obtienen demuestran que todos los cannabinoides fueron efectivos en el bloqueo y, como tales, los antagonistas de TRPV1 podrían proporcionar nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de pacientes que padecen de dolor neuropático, inflamación o vasoconstricción.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uno o más cannabinoides, que son antagonistas de TRPM8, seleccionados del grupo que consiste en cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG); y ácido cannabidiólico (CBDA) para usar en la prevención o tratamiento del cáncer de próstata, donde la actividad de TRPM8 es esencial para la supervivencia de las células cancerosas.
2. Cannabinoides para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cannabinoide es cannabidiol (CBD).
- 10 3. Cannabinoides para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cannabinoide es ácido cannabidiólico (CBDA).
4. Cannabinoides para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cannabinoide es cannabigerol (CBG) como un cannabinoide predominante.
- 15 5. Cannabinoides para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los cannabinoides están presentes como un extracto medicinal a base de cannabis (CBME).
- 20 6. Cannabinoides de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el uno o más extractos medicinales a base de cannabis (CBME) comprenden todos los componentes de plantas de cannabis que se extraen naturalmente.
7. Cannabinoides para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los cannabinoides son naturales o se producen sintéticamente.
- 25 8. Cannabinoides para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los cannabinoides están aislados o son sustancialmente puros.
9. Cannabinoides para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los cannabinoides se envasan para suministrar en una forma de dosificación titulable.