

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 991**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012 PCT/GB2012/051540**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13005017**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12731151 (2)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2726069**

54 Título: **Cannabinoides para uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos neurodegenerativos**

30 Prioridad:

**01.07.2011 GB 201111261**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.12.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**IUVONE, TERESA;  
DI MARZO, VINCENZO;  
GUY, GEOFFREY;  
WRIGHT, STEPHEN y  
STOTT, COLIN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 734 991 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**

Cannabinoides para uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos neurodegenerativos

5 La presente invención se refiere a cannabidivarina (CBDV) y/o ácido de cannabidivarin (CBDVA) aislados y purificados para uso en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica o la enfermedad de Huntingdon.

Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades o trastornos neurodegenerativos son causados por el daño progresivo o la muerte de las neuronas. Las neuronas son células nerviosas en el cerebro cuya función principal es ayudar en el proceso de memoria. El daño o muerte de las neuronas conduce a un deterioro gradual de las funciones controladas por la parte afectada del sistema nervioso.

15 Las enfermedades o los desórdenes neurodegenerativos ocurren frecuentemente como resultado de estrés oxidativo. El estrés oxidativo ocurre a las células en un organismo cuando los efectos de los prooxidantes (tales como radicales libres, especies de oxígeno reactivo y de nitrógeno reactivo) exceden la capacidad de antioxidantes para neutralizarlos. Cuando los niveles de radicales libres o de otros pro-oxidantes se incrementan en una medida determinada, pueden causar daño a las membranas celulares que a su vez pueden dar lugar a muerte celular o daño al material genético.

El grupo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos se caracteriza por cambios en la función neuronal normal que conduce, en la mayoría de los casos, a la muerte neuronal. La mayoría de estas enfermedades se asocian especialmente, en las etapas tardías, con pérdida neuronal severa.

20 Con una población que se envejece de manera creciente, más y más personas se ven afectadas por enfermedades o trastornos neurodegenerativos. Según el National Institute of Neurological Disorders and Stroke (Instituto nacional de trastornos neurológicos y apoplejía), hay más de 600 enfermedades o trastornos neurodegenerativos diferentes.

Algunos de los tipos más comunes de enfermedades o desórdenes neurodegenerativos incluyen la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple.

25 El proceso de degeneración de las neuronas en un organismo es frecuentemente el resultado de excitotoxicidad por glutamato. El glutamato es un químico de señalización y en condiciones normales la concentración de glutamato tiende a ser bastante baja. Se requiere glutamato a estas concentraciones bajas para funciones cerebrales cruciales, tales como la memoria y el aprendizaje. Cuando las concentraciones de glutamato se incrementan, comienza el proceso de neurodegeneración.

30 Cuando el cerebro es privado de oxígeno debido a una enfermedad neurodegenerativa, tal como la enfermedad de Alzheimer, o un trastorno neurodegenerativo tal como un evento isquémico (tal como una apoplejía), o debido a traumas (tal como una herida cerrada en la cabeza) ocurre una acumulación anormal de glutamato.

35 La neurodegeneración tiene lugar cuando el glutamato se adhiere a proteínas receptoras sobre una superficie de células. Estos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) abren luego un exceso de canales de calcio que causan que se incremente rápidamente la concentración intracelular de calcio. Los iones de calcio activan fosfolipasa A (PLA), que a su vez da lugar a la liberación de ácido araquidónico y radicales superóxidos.

La neurodegeneración procede de los efectos destructivos de radicales oxidativos causados por el desborde del glutamato. Los radicales causan una alteración de reacciones esenciales en las neuronas y esto conduce a la degeneración o muerte de la célula.

40 En ensayos clínicos, en pacientes con apoplejía, han sido estudiados algunos agentes neuroprotectores. Un medicamento, Dextrorfan, es, no obstante, de uso limitado debido a sus efectos colaterales de alucinaciones, agitación e hipotensión.

45 Otro medicamento, Selfotel, ha mostrado desafortunadamente tendencias hacia una alta tasa de mortalidad en pacientes tratados con el medicamento, antes que el placebo y, de por sí, se detuvieron los ensayos. También se terminaron los ensayos para el medicamento Cerestat debido a las preocupaciones con la relación de beneficio a riesgo del medicamento.

Raramente existe un requisito significativo de un tratamiento eficaz para prevenir o tratar enfermedades o trastornos neurodegenerativos.

50 Los cannabinoides son un grupo de productos químicos conocidos por activar los receptores de cannabinoides en las células. Los fitocannabinoides son los cannabinoides derivados de plantas de cannabis. Los endocannabinoides son cannabinoides encontrados en humanos y otros animales. Los fitocannabinoides pueden aislarse de plantas o producirse sintéticamente. Al aislar los fitocannabinoides de plantas, pueden purificarse en la medida que se retiren todos los otros compuestos que existen naturalmente tales como otros cannabinoides menores y moléculas

vegetales tales como terpenos. Esta purificación da lugar a una pureza de más de 99% (p/p) del cannabinoide objetivo.

5 Se ha descubierto que la toxicidad por glutamato puede impedirse en alguna medida mediante preparaciones puras/sintéticas de los cannabinoides tetrahidrocannabinol (THC) o cannabidiol (CBD), (Hampson et al. 1998). Los cannabinoides fueron ensayados in vitro en cultivos neuronales expuestos a glutamato. No obstante, la investigación adicional, a partir de un estudio in vivo por el mismo grupo, ha fracasado en encontrar una diferencia entre animales tratados con CBD puro y animales tratados con placebo (Rosenthal et al. 2000).

10 El cannabinoide cannabidiol (CBD) es conocido por exhibir propiedades neuroprotectoras, antiinflamatorias y antioxidantes y, como tal, ha sido ensayado en modelos de neurotoxicidad y neurodegeneración. Se han logrado resultados promisorios con CBD en el control de toxicidad inducida por el péptido  $\beta$ -amiloide, el cual es responsable de la neurodegeneración en pacientes con Alzheimer (Iuvone et al. 2009).

También se han demostrado los efectos benéficos de CBD en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en un modelo in vivo de enfermedad de Alzheimer (Esposito et al. 2007).

La solicitud de patente GB2479153 demuestra los efectos anti-epilépticos del fitocannabinoide CBDV.

15 La solicitud de patente GB2450493 discute las propiedades antagonistas de receptor de cannabinoide CB1 y CB2 del fitocannabinoide CBG.

La solicitud internacional de patente WO 2008/024490 discute el potencial de usar agonistas de cannabinoides para tratar abuso de opioides.

20 La solicitud de patente GB2377633 discute formulaciones que comprenden THC y CBD y también pueden comprender CBDV.

25 En la patente concedida del Reino Unido GB2432312, los solicitantes demostraron que la administración de cannabinoides en forma de extractos de plantas de cannabis fue más eficaz que la de compuestos purificados para prevenir la degeneración neural. En particular, los extractos ricos en cannabinoides que comprenden como un cannabinoide predominante ya sea tetrahidrocannabinol (THC), o bien cannabidiol (CBD) fueron particularmente eficaces en la prevención de neurodegeneración. Los solicitantes encontraron adicionalmente que una combinación de los dos extractos de cannabinoides fue neuroprotectora particularmente efectiva.

30 Han sido aislados al menos 85 cannabinoides diferentes de la planta de cannabis y sus estructuras difieren dependiendo de donde ocurre la ciclización del precursor cannabinoide cannabigerol (CBG). Es bien conocido que los diferentes cannabinoides demuestran diferentes propiedades. Por ejemplo, el cannabinoide tetrahidrocannabinol (THC) es un agonista conocido del receptor de CB1; sin embargo, se ha mostrado que la variante de propilo de este cannabinoide, tetrahidrocannabivarina (THCV), actúa de una manera opuesta en el receptor CB1 y se clasifica como un antagonista de CB1. Por lo tanto, debe apreciarse que, aunque se ha encontrado que toda la clase de cannabinoides se produce en diversas cepas de la planta cannabis, no puede suponerse que todos ellos comparten las mismas propiedades.

35 El cannabinoide cannabidiol (CBD), a diferencia de THC y THCV, muestra poca actividad en los receptores CB1 o CB2.

40 En la presente solicitud, los solicitantes han descubierto que otros cannabinoides, que son molecularmente distintos de CBD, THC y THCV, son capaces de prevenir o tratar enfermedades o trastornos neurodegenerativos. Estos cannabinoides son: cannabidivarina (CBDV) y ácido de cannabidivarina (CBDVA). El modelo de enfermedad neurodegenerativa ejemplificado por los solicitantes es la enfermedad de Alzheimer.

45 La enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más común que afecta a las personas mayores. En 2006 hubo 26.6 millones de víctimas de la enfermedad en todo el mundo y se predice que para 2050 la enfermedad de Alzheimer afectará 1 persona en 85 a nivel global. La causa y el progreso de la enfermedad no se entienden bien y los tratamientos usados actualmente solamente ofrecen un pequeño beneficio sintomático. En la actualidad no existen tratamientos que sean capaces de retrasar o detener el progreso de la enfermedad. Han sido realizados más de 500 estudios clínicos para la identificación de un posible tratamiento para la enfermedad de Alzheimer, aunque todavía faltan opciones adecuadas de tratamiento.

Breve resumen de la divulgación

50 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona una cannabidivarina (CBDV) y / o un ácido de cannabidivarina (CBDVA) aislados y purificados para usar en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer; la enfermedad de Parkinson; esclerosis lateral amiotrófica; o la enfermedad de Huntington.

El compuesto aislado y purificado que se usa preferiblemente es CBDV.

El compuesto aislado y purificado es preferiblemente CBDVA.

El término "prevención" significa que se previene que ocurra una enfermedad o un trastorno, antes que curar o tratar síntomas de dicha enfermedad o trastorno.

5 El término "tratamiento" significa curar una enfermedad o trastorno antes que tratar síntomas de dicha enfermedad o trastorno.

10 Las enfermedades o trastornos neurodegenerativos surgen cuando ocurre una degeneración de la vía neural como resultado de una enfermedad específica. Las enfermedades sistémicas se presentan cuando ocurre una degeneración de la vía neural como resultado de falta de oxígeno. La lesión o el daño cerebral ocurren cuando ocurre una degeneración de la vía neural como resultado de una lesión al cerebro mismo. La degeneración neural relacionada con la edad o autoinmune se presenta cuando ocurre una degeneración de la vía neural como resultado de la edad del paciente o debido a una enfermedad autoinmune.

Más preferiblemente, la enfermedad o trastorno neurodegenerativo a prevenir o tratar es la enfermedad de Alzheimer.

15 Preferiblemente, la CBDV y / o el CBDVA se presentan en una dosis diaria efectiva para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer; la enfermedad de Parkinson; la esclerosis lateral amiotrófica; o la enfermedad de Huntington. Preferiblemente la dosis diaria efectiva de CBDV y / o CBDVA se encuentra entre 5 mg y 1000 mg. Más preferiblemente, la dosis diaria efectiva de cannabinoide(s) se encuentra entre 10 mg y 50 mg.

En una forma preferida de realización, la CBDV y / o el CBDVA es para uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

20 En otra forma de realización de la presente invención, la CBDV y / o el CBDVA se usan en combinación con una u otras más sustancias medicinales.

Breve descripción de los dibujos

Las formas de realización de la invención se describen adicionalmente en lo sucesivo con referencia a los dibujos acompañantes, en los cuales:

25 la figura 1 muestra el efecto de CBG, CBC y CBDV en la producción de nitrito en células C6 estimuladas con A $\beta$ ;

la figura 2 muestra el efecto de CBG, CBC y CBDV en la viabilidad de la célula C6 estimuladas con A $\beta$ ;

la figura 3 muestra los efectos de CBDV en la transcripción de iNOS en células C6 estimuladas con A $\beta$ ;

la figura 4 muestra los efectos de CBG, CBC y CBDV en la viabilidad de la célula SH-SY5Y inducida por A $\beta$ ;

la figura 5 muestra el efecto de CBDV en la expresión de iNOS, TNF- $\alpha$  y COX2 en células C6 estimuladas con A $\beta$ ;

30 la figura 6 muestra el efecto de CBDV en la liberación de TNF- $\alpha$  inducida por A $\beta$ ;

la figura 7 muestra el efecto de CBDV en la expresión de BCL2 inducida por en la célula SH-SY5Y;

la figura 8 muestra el efecto de CBD, CBDV, CBDA, CBDVA y THCVA en la actividad de SH-SY5Y inducida por A $\beta$ ; y

35 la figura 9 muestra el efecto de CBD, CBDV, CBDA, CBDVA y THCVA en el número de células viables SH-SY5Y inducida por A $\beta$ .

Descripción detallada

40 Los ejemplos más adelante demuestran los resultados obtenidos usando seis cannabinoides diferentes; previamente no se había demostrado que estos tuvieran la capacidad de prevenir o tratar enfermedades o trastornos neurodegenerativos. Los cannabinoides CBDV y CBDVA forman la base de la invención y los otros cannabinoides incluyen solamente para referencia.

Además, el ejemplo 2 también incluye datos para CBD, un conocido neuroprotector, para propósitos de comparación.

Ejemplo 1: los efectos de cannabinoides en un modelo de enfermedad neurodegenerativas

Materiales y procedimientos

45 Los cannabinoides ensayados fueron CBG, CBC y CBDV. Los cannabinoides fueron aislados de material vegetal de cannabis y purificados. Los cannabinoides fueron ensayados a una concentración de 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-6</sup> M. Los

cannabinoides fueron disueltos en DMSO a la concentración de  $10^{-2}$  M y luego diluidos en DMEM a su concentración final to

5 Fueron cultivadas células gliales (C6) en FBS al 10%, suplementadas con DMEM. Fueron cultivadas células neuronales PC12 en FBS al 10% más HS al 5% suplementadas con DMEM y fueron cultivadas células neuronales SHI-5SY en FBS al 10% suplementadas con RPMI. Las células neuronales fueron diferenciadas con ácido retinoico. Después de 24 horas de hambre de células gliales, las células neuronales PC12 y SHI-5SY diferenciadas fueron tratadas con los cannabinoides CBC, CBG y CBDV, en presencia o ausencia de  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{A}\beta$  (1-42) durante las siguientes 24 horas.

10 Fue determinada la viabilidad de la célula usando un ensayo con bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2il)2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) el cual es un ensayo basado en la capacidad de células viables de convertir MTT en sal de formazan.

15 Las células fueron plaqueadas en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/pozo y se dejaron adherir a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Después, el medio fue reemplazado con medio fresco y las células fueron tratadas tal como se ha descrito antes. Después de 24 horas se agregaron  $25 \mu\text{l}$  de MTT ( $5 \text{ mg}/\text{ml}$  en DMEM) a las células y se incubaron durante 3 horas adicionales a  $37^\circ\text{C}$ . Después de este tiempo, las células fueron lisadas y los cristales de azul oscuro fueron solubilizados con  $125 \mu\text{l}$  de una solución que contenía 50% (v/v) de N,N, dimetilformamida, 20% (p/v) de dodecilsulfato de sodio, con un pH ajustado de 4.5. La densidad óptica de cada pozo fue medida con un espectrofotómetro de microplaca (Titertek Multiscan MCC/340), equipado con un filtro de 620 nm.

20 Se ensayó la producción de NO midiendo la cantidad de nitrito en el medio de cultivo de células C6 24 horas después de estimulación con  $\text{A}\beta$ (1-42) ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) usando un ensayo espectrofotométrico basado en la reacción de Griess.

25 El nivel de ARNm de iNOS en células C6 fue determinado usando el procedimiento semi-cuantitativo de RT-PCR. Los cebadores de PCR fueron seleccionados según secuencias apropiadas de ADN. Fueron fraccionadas de manera electroforética alícuotas de  $15 \mu\text{l}$  de productos de PCR a través de un gel de agarosa al 1% que contenía el tinte verde fluorescente Vistra. La intensidad de etiquetado del producto de PCR, la cual es lineal a la cantidad de ADN, fue cuantificada usando el generador de imágenes moleculares FX y el software Quantity One (Biorad, Milán, Italia).

30 Los resultados se expresan como un promedio  $\pm$  SEM de n experimentos. El análisis estadístico fue realizado usando análisis de varianza (ANOVA) y se realizaron múltiples comparaciones mediante el ensayo de Bonferroni con  $P < 0.05$  considerado significativo.

#### Resultados

35 La figura 1 muestra el efecto de (A) CBG, (B) CBC y (C) CBDV en la producción de nitrito en células C6 estimuladas con Ap. El tratamiento de células C6 con  $\text{A}\beta$  (1-42) ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas determinó un incremento significativo en la producción de nitrito, el metabolito estable de óxido nítrico. Los resultados indican que el tratamiento tanto con CBC, como con CBDV ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) significativamente redujo, de una manera dependiente de la concentración, la producción de nitrito en células C6 estimuladas con Ap. En contraste, CBG ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) no tuvo efecto en este parámetro. Cada barra muestra el promedio  $\pm$  SEM de 5 experimentos en triplicado. \*\*\* $P < 0.001$  vs control; °°° $P < 0.001$ , °° $P < 0.01$  y ° $P < 0.05$  vs  $\text{A}\beta$ .

40 La figura 2 muestra el efecto de (A) CBG, (B) CBC y (C) CBDV en la viabilidad de células C6 estimuladas con Ap. El tratamiento de células C6 con  $\text{A}\beta$  (1-42) ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas determinó un incremento significativo en la viabilidad de la célula vida como la capacidad de las células de proliferación para convertir MTT en sal de formazan. El tratamiento con CBC ( $10^{-7}$  a  $10^{-6}$  M) y CBDV ( $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  M), inhibió significativamente la proliferación de células de una manera dependiente de la concentración. En contraste, CBG ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) no tuvo efecto en el parámetro bajo estudio. Cada barra mostró el promedio  $\pm$  SEM de 5 experimentos en triplicado. \*\*\* $P < 0.001$  vs control; °°° $P < 0.001$ , °° $P < 0.01$  y ° $P < 0.05$  vs  $\text{A}\beta$ .

50 La figura 3 muestra el efecto de CBDV en la transcripción de iNOS en células C6 estimuladas con Ap. El tratamiento de células C6 con  $\text{A}\beta$  (1-42) ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas determinó un incremento significativo en los niveles de ARNm de iNOS. La administración de CBDV ( $10^{-7}$  M) dio lugar a una reducción significativa de transcripción de ARNm. El panel A muestra ARNm de iNOS en células C6 homogeneizadas; (B) análisis densitométrico de bandas correspondientes (densidad óptica). El panel es representativo de n=3 experimentos separados. Cada barra muestra el promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos. \*\*\* $P < 0.001$  vs control; °°° $P < 0.001$  vs  $\text{A}\beta$ .

55 La figura 4 muestra el efecto de CBG, CBC y CBDV en la viabilidad de la célula SH-SY5Y inducida con  $\text{A}\beta$ . El tratamiento de células SH-SY5Y con  $\text{A}\beta$  (1-42) ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) determinó una reducción significativa en la viabilidad de las células, medida como la capacidad de las células viables para convertir MTT en sal de formazan. Los resultados indican que la administración de CBDV ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) fue capaz de prevenir, de una manera dependiente de la concentración y de modo significativo, la muerte de las células SHSY-5SY inducida por  $\text{A}\beta$ ; mientras tanto, CBC fue efectivo solamente a la mayor concentración usada ( $10^{-6}$  M). En contraste, CBG ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M) no tuvo efecto en el

parámetro bajo estudio. Cada barra muestra el promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos. \*\*\*P<0.001 vs control; °°°P<0.001, °°P<0.01 y °P<0.05 vs A $\beta$ .

#### Conclusión

5 Los datos presentados en este ejemplo indican que tanto CBDV, como CBC, pero no CBG, fueron capaces de reducir significativamente la proliferación y la activación de células gliales dependiente de A $\beta$ ; además, además CBDV y, al menos en parte, CBC también fue capaz de reducir la neurotoxicidad inducida por tratamiento con A $\beta$ , en experimentos in vitro.

10 Este ejemplo demuestra las propiedades neuroprotectoras de dos de los cannabinoides estudiados, más precisamente CBC y CBDV. Por ejemplo, la capacidad de estos cannabinoides para reducir la cantidad de nitrato producido en las células gliales que habían sido sometidas a tratamiento para simular neurodegeneración significa que estos cannabinoides son neuroprotectores efectivos. La reducción en el nivel de nitrato producido es un parámetro clave en el estudio de muchas enfermedades y trastornos neurológicos que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, apoplejía o cardiopatía (Kuiper et al., 1994), (Makisimovic et al. 2002), y (Kichuk et al. 1994).

15 De modo similar, la capacidad de CBC y CBDV para prevenir muerte celular neuronal proporciona evidencia creíble de que estos cannabinoides actúan como neuroprotectores en un modelo de neurodegeneración. Es claro que un incremento en la viabilidad de célula glial es de vital importancia en la prevención o tratamiento de enfermedades y trastornos que incluyen la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, la apoplejía o cardiopatía.

20 Ejemplo 2: los efectos neuroprotectores de cannabidivarina (CBDV)

#### Materiales y procedimientos

25 Fueron cultivadas células gliales (C6) en FBS al 10%, suplementadas con DMEM, y fueron cultivadas SHI-5SY en FBS al 10% suplementadas con RPMI. Fueron diferenciadas células neuronales con ácido retinoico. Después de 24 horas de hacer pasar hambre a células gliales y SHI-5SY fueron tratadas con CBDV ( $10^{-7}$  M), CBD ( $10^{-7}$  M), CBDVA ( $10^{-7}$  M), CBDA ( $10^{-7}$  M) y THCVA ( $10^{-7}$  M) en presencia o ausencia de A $\beta$  (1-42) (1  $\mu$ g/mL) durante las siguientes 24 horas. Todos los compuestos ensayados fueron disueltos en DMSO a la concentración de  $10^{-2}$  M y luego diluidos en DMEM; DMSO a dilución final que no mostró efectos en los parámetros bajo estudio.

30 La activación/viabilidad de la célula fue determinada usando ensayo con bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2il)2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), un ensayo basado en la capacidad de las células viables de convertir MTT en sal de formazan. Brevemente, las células fueron plaqueadas en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/pozo y se dejaron adherir a 37°C durante 2 horas. Después de esto, el medio fue reemplazado por medio fresco y las células fueron tratadas tal como se describió antes. Después de 24 horas se agregaron 25  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml en DMEM) a las células y se incubaron durante 3 horas adicionales a 37°C. Después de este tiempo, las células fueron realizadas y los cristales de azul oscuro fueron solubilizados con 125  $\mu$ l de una solución que contenía 50% (v/v) de N,N, dimetilformamida, 20% de (p/v) de dodecilsulfato de sodio, con un pH ajustado de 4,5. La densidad óptica de cada pozo fue medida con un espectrofotómetro de microplaca (Titertek Multiscan MCC/340) equipado con un filtro de 620 nm.

35 En otro conjunto de experimentos se llevó a cabo conteo de células mediante sistema TC10 (BIO-RAD), según instrucciones del fabricante.

40 Se realizó análisis de Western blot (membrana de Western) en lisado de células C6 y SHI-5SY. Brevemente las células fueron homogeneizadas rápidamente en 60  $\mu$ l de regulador de pH de lisis hipotónico helado [HEPES de 10 mM, MgCl<sub>2</sub> de 1.5 mM, KCl de 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo de 0.5 mM, 1.5  $\mu$ g/mL de inhibidor de tripsina de soja, 7  $\mu$ g/mL de pepstatina A, 5  $\mu$ g/mL de leupeptina, benzamidina de 0.1 mM, ditiotretitol de 0.5 mM (DTT)]. Después de este tiempo, fueron obtenidas luego las fracciones citoplasmáticas mediante centrifugación a 13000 g durante 10 minutos y se determinó la concentración de proteína en las muestras por medio de un kit de ensayo Bio-Rad según las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo análisis de inmunoelectrotransferencia (immunoblotting) de iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , Bcl2 y actina en una fracción citosólica. Se determinó la concentración de proteína y se separaron cantidades equivalentes (50  $\mu$ g) de cada muestra en condiciones de reducción en minigel de SDS- poliacrilamida al 12%. Las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos de América). Dependiendo de los experimentos, las membranas fueron bloqueadas por incubación a 4°C durante una noche en regulador de pH de sal alta (base de Trizma de 50 mM, NaCl de 500 mM, Tween-20 al 0.05%) que contenían albúmina de suero bovino al 5%; luego fueron incubadas durante 1 h con anti-iNOS (1:1000 v/v) (Oncogene, San Diego, CA), anti-COX-2 (1:500 v/v) (Cayman Chemical, Reino Unido), anti-TNF- $\alpha$  (Sigma Aldrich), anti-Bcl2 (Santa Cruz laboratories,) y antiactina (1:1000) (Santa Cruz laboratories,) durante 2 h a temperatura ambiente, seguida por incubación con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano específica (HRP) (Dako, Golstrup, Dinamarca). Los complejos inmunes fueron desarrollados usando reactivos de detección de quimioluminiscencia mejorados (Amersham, Italia), según las instrucciones del fabricante, y desarrollados por Image-Quant Apparatus (GE Healthcare). Fueron

escaneadas las bandas de proteína y analizadas mediante densitometría con un densitómetro de generación de imágenes GS-800 (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos de América).

5 Fue realizado un ensayo de ELISA en sobrenadantes de células cultivadas. Fueron recubiertas placas de microtitulación de 96 pozos Nunc Maxisorp (Gibco, Paisley, Reino Unido) por una noche a 4 °C con 1 µg/pozo de anticuerpo monoclonal específico anti-TNF, diluido en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de 0.5 M. los pozos fueron lavados tres veces y luego bloqueados con suero con pH regulado por fosfato (PBS) que contienen Tween 20 al 0.05% (v/v) y suero fetal bovino al 0.3% (regulador de pH de ELISA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los estándares y muestras fueron agregados en un volumen de 100 µl e incubados a 37 °C durante 1.5 h. Fue generada la curva estándar usando 0.1 ng a 1 µg /pozo de proteína purificada, diluida en regulador de pH de ELISA. Después de cuatro lavadas en regulador de pH de ELISA, fueron diluidos anticuerpos monoclonales y adicionados a los pozos durante 1 h. Los pozos fueron lavados cuatro veces más y luego incubados con el anticuerpo secundario: anti-ratón Ig, fragmento F(ab<sub>2</sub>)<sub>2</sub> biotinilado específico de la especie, de asno (Amersham), diluido 1:1000 durante 1 h. Después de otras cuatro lavadas, los pozos fueron incubados con 100 µl de complejo de peroxidasa rábano biotinilado con estreptavidina (Amersham), diluido 1:1000 en regulador de pH de ELISA durante 1 h. Después de seis lavadas finales en regulador de pH de ELISA, se agregaron 200 µl de una solución de 0.4 mg/mL de diclorhidrato de o-fenilenediamina (OPD, Sigma) en un regulador de pH de citrato fosfato de 0.05 M a cada pozo y se dejó desarrollar el color hasta 10 minutos. La reacción de color fue detenida mediante adición de HCl y se midieron densidades ópticas a 490 nm usando un lector de microplaca.

20 Los resultados se expresan como el promedio ± SEM de n experimentos. Se llevó a cabo un análisis estadístico como usando análisis de varianza (ANOVA) y múltiples comparaciones mediante el ensayo de Bonferroni con P<0.05 considerado significativo.

#### Resultados

25 La figura 5 demuestra que las células C6 fueron tratadas con Aβ (1-42) (1 µg/mL) durante 24 horas en presencia o ausencia de CBDV (10<sup>-7</sup> M) y fue evaluada la expresión de proteína mediante análisis de western blot. El tratamiento de células C6 con Aβ (1 µg/mL) determinó un incremento significativo en la expresión de proteína de TNF-alfa (A), COX2 (B) e iNOS (C). La administración de CBDV (10<sup>-7</sup> M) a células estimuladas con Aβ dieron lugar a una reducción significativa de la expresión de proteína de TNF-alfa (A), COX2 (B) e iNOS. La figura muestra el análisis densitométrico de bandas de western blot (membranas de western) (densidad óptica); el panel es representativo de n=3 experimentos separados. Cada barra muestra el promedio ± SEM de 3 experimentos. \*\*\*P<0.001 vs control; °°P<0.01, °°°P<0.001 vs Aβ.

35 La figura 6 demuestra que las células C6 fueron tratadas con Aβ (1-42) (1 µg/mL) durante 24 horas en presencia o ausencia de CBDV (10<sup>-7</sup> M) y fue evaluada la liberación de TNF-alfa en sobrenadantes de células mediante ensayo de ELISA. El tratamiento con Aβ (1-42) (1 µg/mL) incremento mucho la liberación de TNF-alfa. Cuando se administró CBDV (10<sup>-7</sup> M) a células C6 tratadas con Aβ se redujo significativamente la liberación de TNF-alfa en el sobrenadante de las células. El panel es representativo de n=3 experimentos separados. Cada barra muestra el promedio ± SEM de 3 experimentos. \*\*\*P<0.001 vs control; °°°P<0.001 vs Aβ.

40 La figura 7 demuestra que las células SH-SY5Y fueron tratadas con Aβ (1-42) (1 µg/mL) durante 24 horas en presencia o ausencia de CBDV (10<sup>-7</sup> M) y fue evaluada la expresión de proteína mediante análisis de western blot. El tratamiento de células SH-SY5Y con Aβ (1 µg/mL) determinó una reducción significativa en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl2. La administración de CBDV (10<sup>-7</sup> M) a células estimuladas con Aβ restauró significativamente la expresión de proteínas de Bcl2. La figura muestra el análisis densitométrico de bandas de western blot (densidad óptica); el panel es representativo de n=3 experimentos separados. Cada barra muestra el promedio ± SEM de 3 experimentos. \*\*\*P<0.001 vs control; °°P <0.01 vs Aβ.

45 La figura 8 demuestra las células SH-SY5Y que fueron tratadas con Aβ (1-42) (1 µg/mL) durante 24 horas en presencia o ausencia de CBD (10<sup>-7</sup> M), CBDV (10<sup>-7</sup> M), CBDA (10<sup>-7</sup> M), CBDVA (10<sup>-7</sup> M) y THCVA (10<sup>-7</sup> M) y fue evaluada la viabilidad de las células mediante ensayo de MTT/formazan.

50 El tratamiento de células SH-SY5Y con Aβ (1 µg/mL) determinó una reducción significativa de la viabilidad de SH-SY5Y, evaluada como la capacidad de células viables de convertir MTT en una sal de formazan. La administración de CBD, CBDV y CBDVA (10<sup>-7</sup> M) fue capaz de prevenir muerte celular de Aβ SHSY-5SY, mientras que CBDA y THCVA no tuvieron efecto en el parámetro bajo estudio. Cada barra mostró el promedio ± SEM de 3 experimentos. \*\*\*P<0.001 vs control; °°P<0.01 vs Aβ.

La figura 9 detalla el tratamiento de células SH-SY5Y cells con Aβ (1-42) (1 µg/mL) durante 24 horas en presencia o ausencia de CBD (10<sup>-7</sup> M), CBDV (10<sup>-7</sup> M), CBDA (10<sup>-7</sup> M), CBDVA (10<sup>-7</sup> M) y THCVA (10<sup>-7</sup> M) y se realizó conteo de células mediante el sistema TC10 System (BIO-RAD), según la instrucción del fabricante.

55 (A) El tratamiento de línea celular neuronal humana, células SH-SY5Y, con Aβ (1 µg/mL) determinó una reducción significativa en las células viables. Fue medido el efecto de CBD, CBDV, CBDA, CBDVA y THCVA en la prevención de muerte neuronal. La administración de CBD, CBDV, y CBDVA fue capaz de prevenir muerte de células SHSY-

5SY inducidas con A $\beta$ . No se vio un efecto significativo con CBDA y THCVA. (B) Los compuestos ensayados no mostraron ningún efecto tóxico a la concentración ensayada. \*\*\*P<0.001 vs control; °°P <0.005, vs A $\beta$ .

Conclusiones:

5 Los datos presentados en este ejemplo confirman el efecto antiinflamatorio de CBDV en células gliales activadas con A $\beta$  y estudia el posible papel anti-apoptótico de CBDV.

Evidencia de que CBDV no solamente reduce la transcripción de las proteínas pro-inflamatorias iNOS, COX-2 y TNF-alfa inducidas después de agresión de A $\beta$  a células C6, sino de que también fue capaz de reducir la expresión de estos mediadores.

10 Además, el tratamiento con CBDV da lugar a una reducción significativa de la liberación de TNF-alfa de células gliales estimuladas con A $\beta$ . En línea con la evidencia de una reducción en la producción de NO por CBDV, la reducción aquí reportada de producción y liberación de TNF-alfa apoyan mucho la acción antiinflamatoria de CBDV durante la gliosis reactiva.

15 Finalmente, estos datos indican que CBDV es capaz de controlar el escenario pro-inflamatorio disparado por la actuación de A $\beta$  a nivel transcripcional, es decir controlando la transcripción de estos genes pro-inflamatorios importantes y que estos efectos están acompañados también por la expresión y liberación reducidas de los productos de proteína correspondientes. Estos datos sugieren la participación de factores transcripcionales como NFkB, AP-1, etc en efectos anti-inflamatorios mediados por CBDV.

20 Estos datos apoyan mucho los efectos protectores de CBDV y CBDVA en toxicidad por A $\beta$ , tanto en células astrogliales, como neuronales, lo cual sugiere, por lo tanto, su utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades relacionadas.

Referencias:

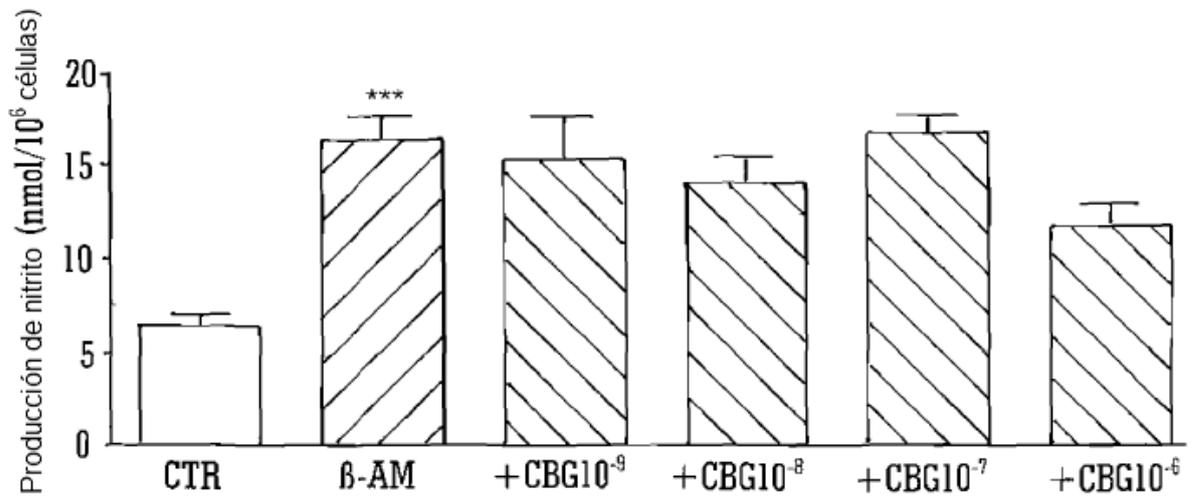
25 Kichuk, M; Seyedi N; Zhang X; Marboe C; Michler R; Addonizio L; Kaley G; Nasjletti A; Hintze T., Regulation of Nitric Oxide Production in Human Coronary Microvessels and the Contribution of Local Kinin Formation [Regulación de producción de óxido nítrico en microvasos coronarios humanos y la contribución de formación local de quinina]. Circulation. 1994;90:1-295

Kuiper MA; Visser JJ; Bergmans PL; Scheltens P; and Wolters EC., Decreased cerebrospinal fluid nitrate levels in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and multiple system atrophy patients [Niveles disminuidos de nitrato de fluido cerebrospinal en pacientes con enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y atrofia de sistema múltiple]. J Neurol Sci. 1994 enero;121(1):46-9.

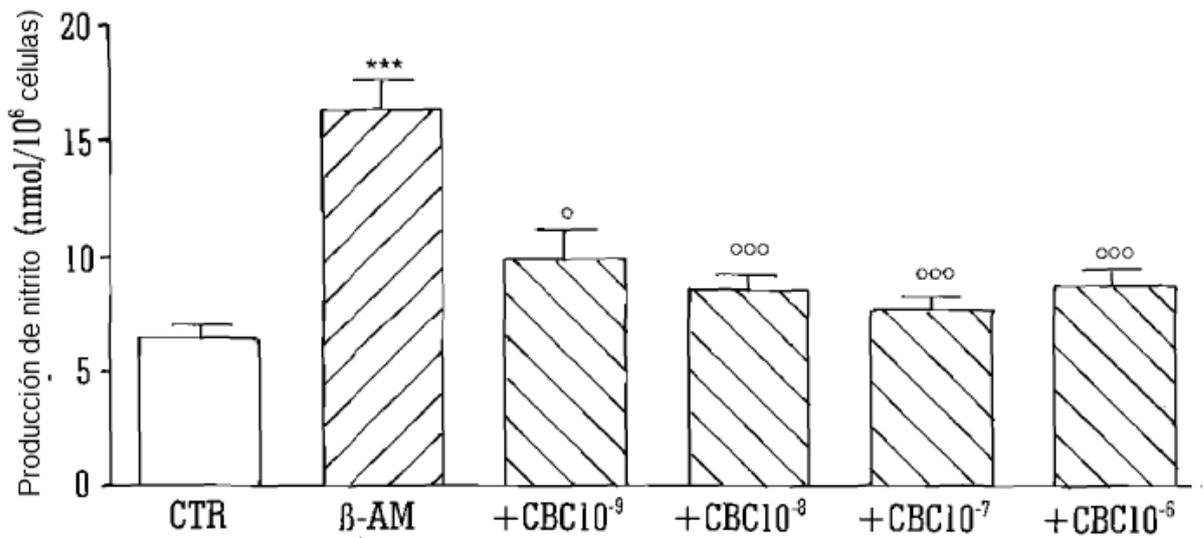
30 Maksimovic ID; Jovanovic MD; Malicevic Z; Colic M; and Ninkovic M., Effects de nerve and fibroblast growth factors on the production de nitric oxide in experimental model de Huntington's disease [Efectos de factores de nervios y crecimiento de fibroblastos en la producción de óxido nítrico en el modelo experimental de enfermedad de Huntington]. Vojnosanit Pregl. 2002 Mar-Abr;59(2):119-23.

**REIVINDICACIONES**

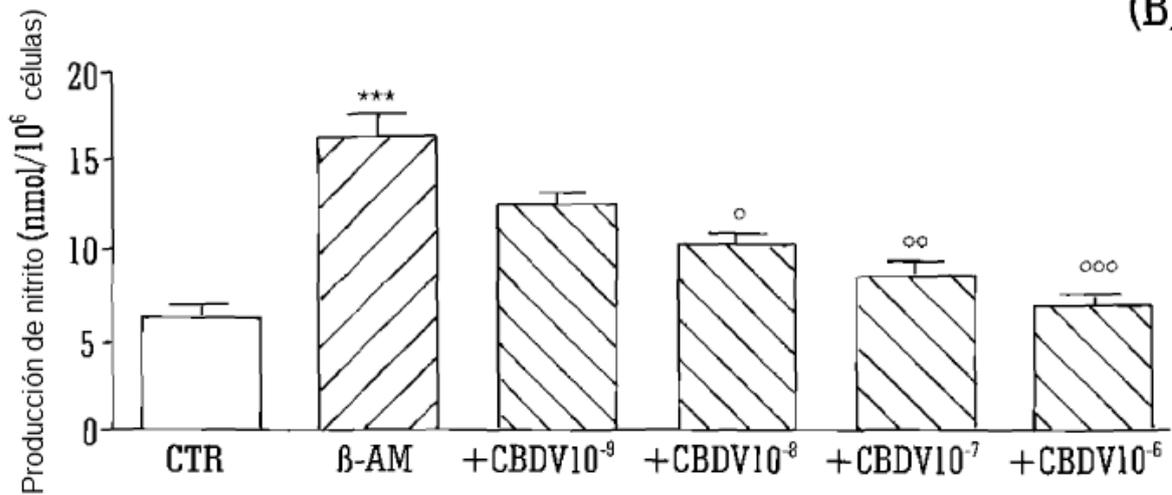
1. Una cannabidivarina (CBDV) y/o un ácido de cannabidivarina (CBDVA) aislados y purificados para usar en la prevención o tratamiento de enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Parkinson; esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de Huntington.
  - 5 2. Una cannabidivarina (CBDV) aislada y purificada para el uso según la reivindicación 1 en la prevención o tratamiento de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de Huntington.
  - 10 3. Un ácido de cannabidivarina (CBDVA) aislado y purificado para el uso según la reivindicación 1 en la prevención o tratamiento de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de Huntington.
  4. Una cannabidivarina (CBDV) y / o un ácido de cannabidivarina (CBDVA) aislados y purificados para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el (los) cannabinoide(s) están presentes en una dosis diaria efectiva para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de Huntington.
  - 15 5. Una cannabidivarina (CBDV) y / o un ácido de cannabidivarina (CBDVA) aislados y purificados para el uso según la reivindicación 4, donde la dosis diaria efectiva de cannabinoide(s) se encuentra entre 5 mg y 1000 mg.
  6. Una cannabidivarina (CBDV) y / o un ácido de cannabidivarina (CBDVA) aislados y purificados para el uso según la reivindicación 5, donde la dosis diaria efectiva de cannabidivarina (CBDV) y / o de ácido cannabidivarina (CBDVA) se encuentra entre 10 mg y 50 mg.
  - 20 7. Una cannabidivarina (CBDV) y / o un ácido de cannabidivarina (CBDVA) aislados y purificados para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
  8. Una cannabidivarina (CBDV) y / o un ácido de cannabidivarina (CBDVA) aislados y purificados para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con una u otras más sustancias medicinales.
- 25



(A)



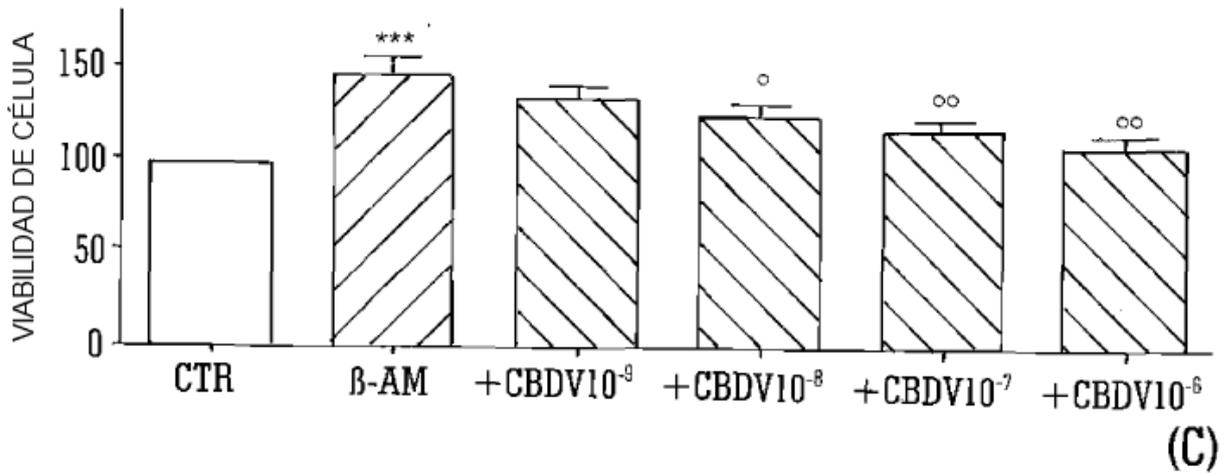
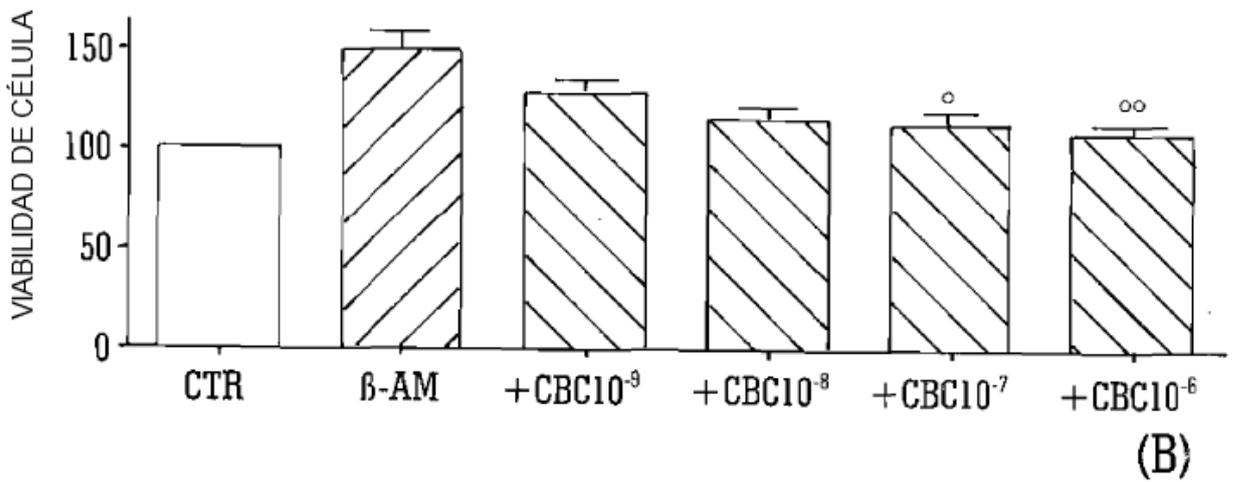
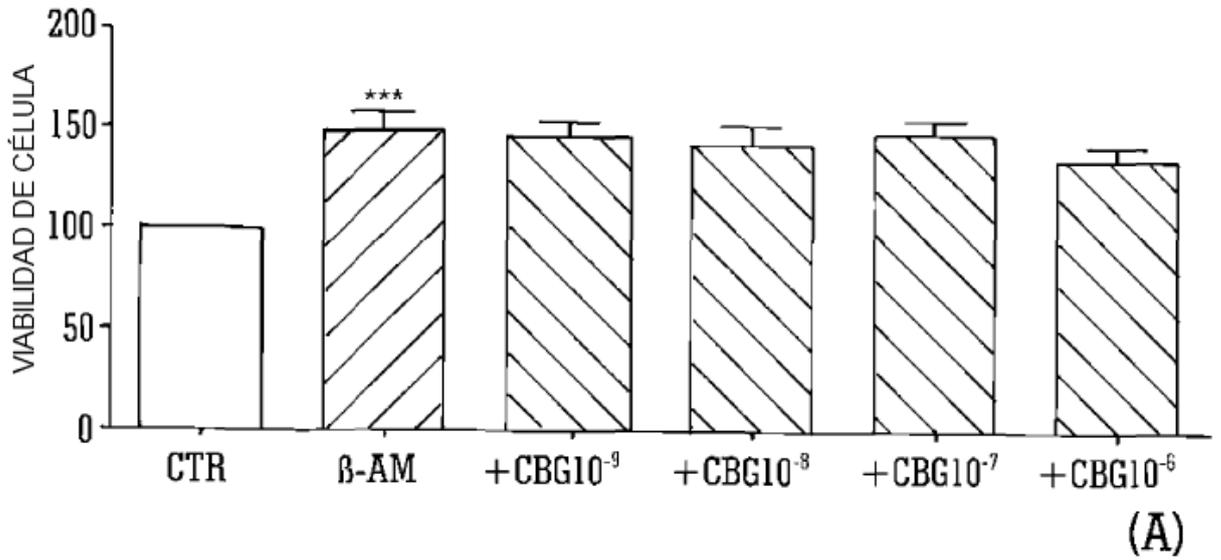
(B)



(C)

FIG. 1 Cada barra muestra el promedio  $\pm$  SEM de 5 experimentos en triplicado

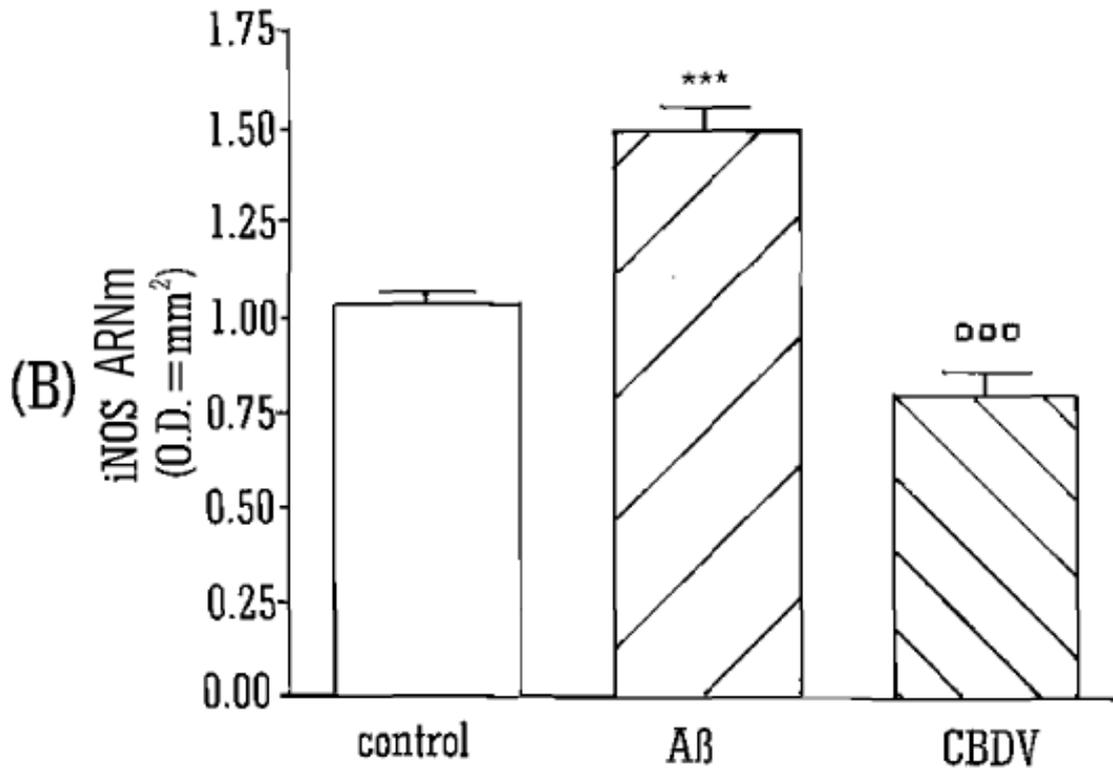
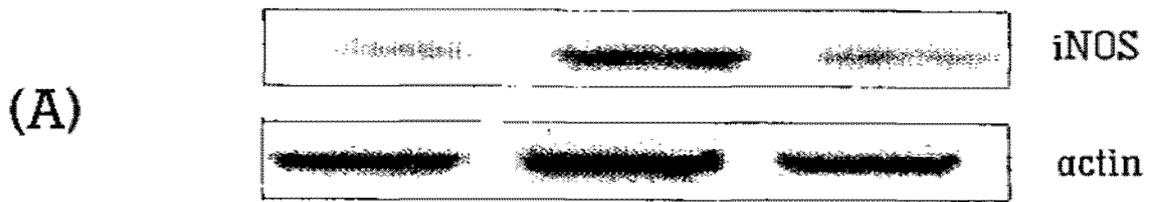
\*\*\*P < 0.001 vs control; °°°P < 0.001, °°P < 0.01 y °P < 0.05 vs Aβ.



Cada barra muestra el promedio  $\pm$  SEM de 5 experimentos en triplicado

\*\*\*P < 0.001 vs control; °°°P < 0.001, °°P < 0.01 y °P < 0.05 vs AB.

FIG. 2



Cada barra muestra el promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos.

\*\*\*P < 0.001 vs control; oooP < 0.001 vs Aβ.

FIG. 3

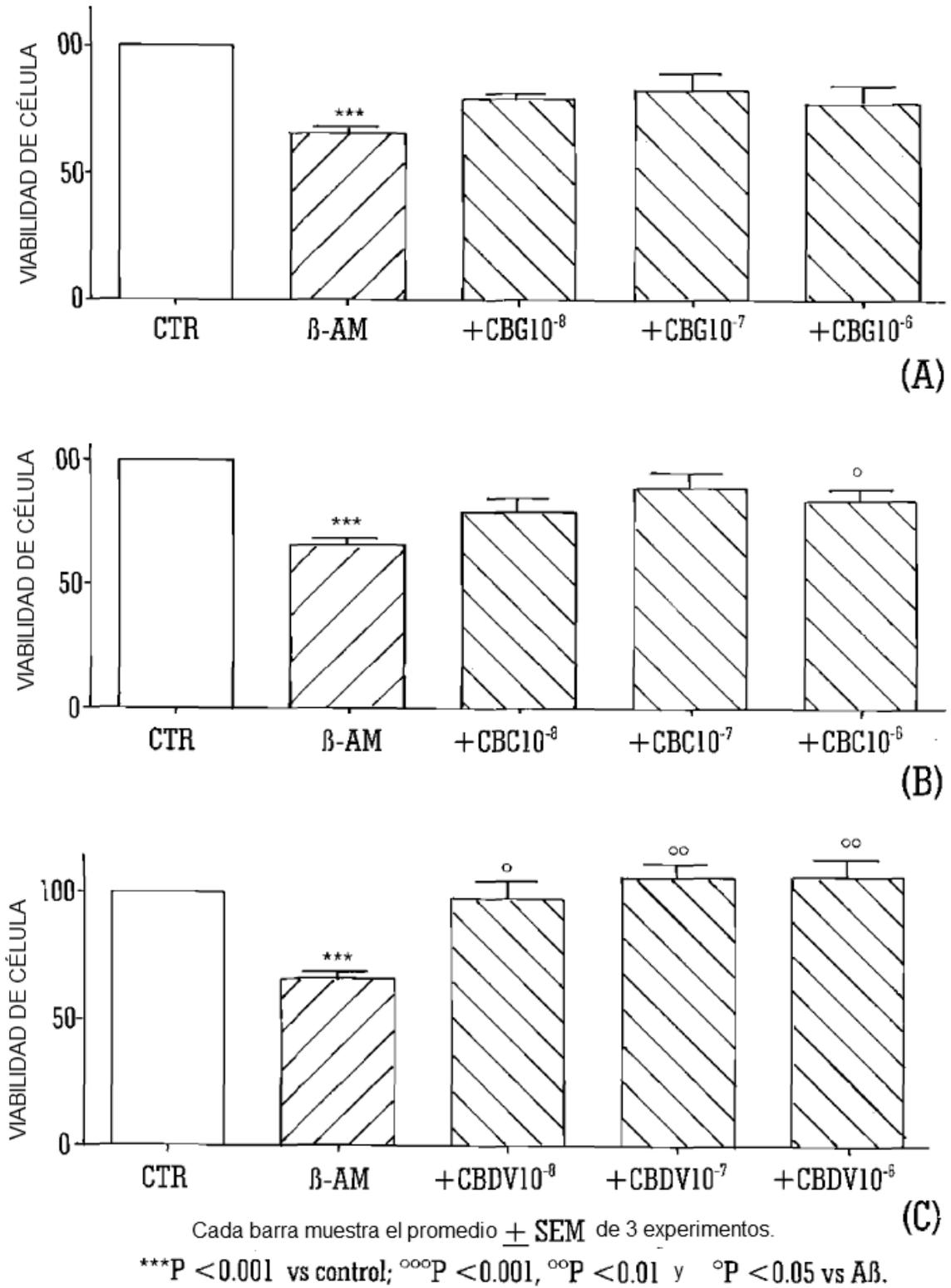


FIG. 4

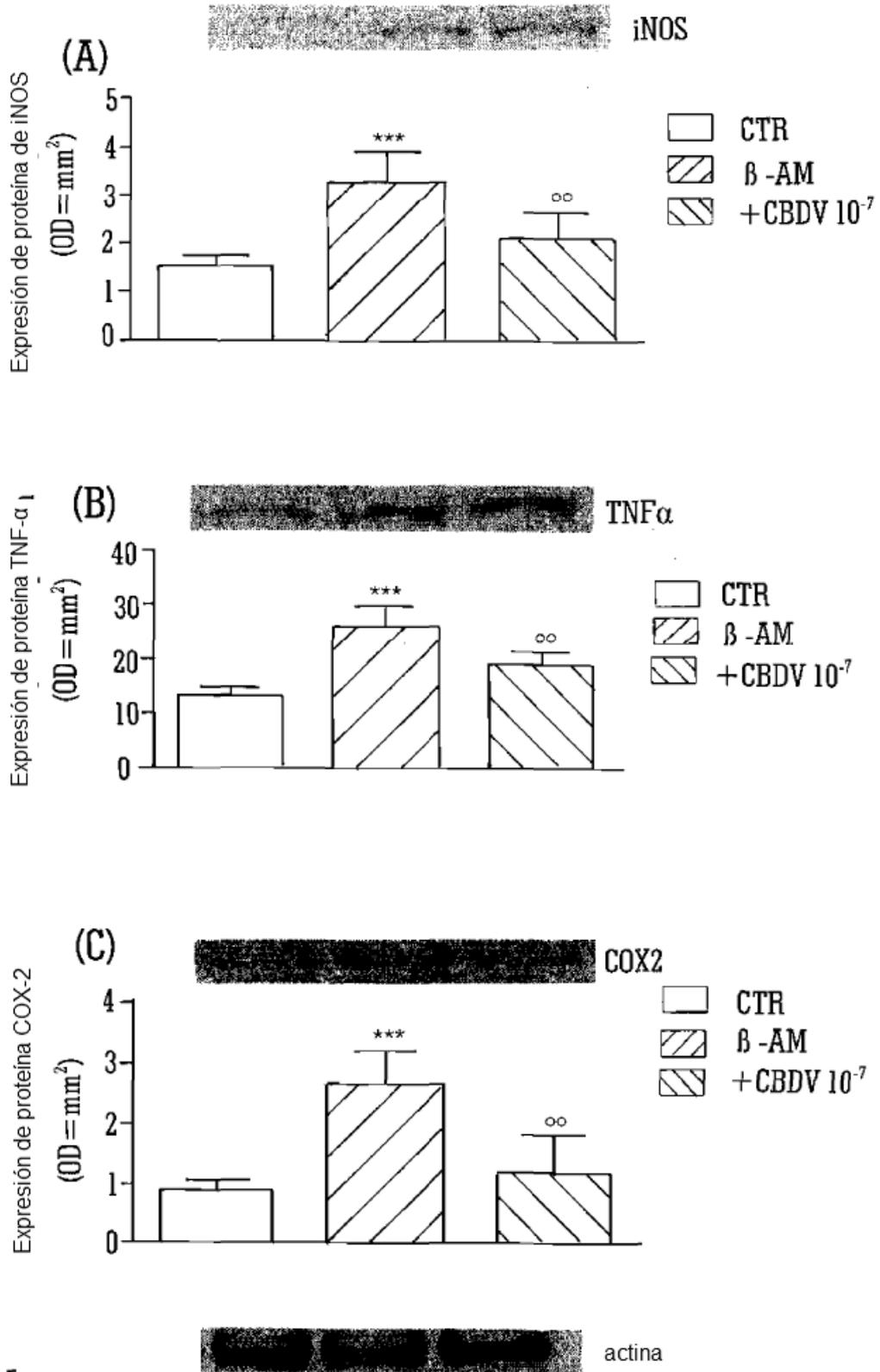


FIG. 5

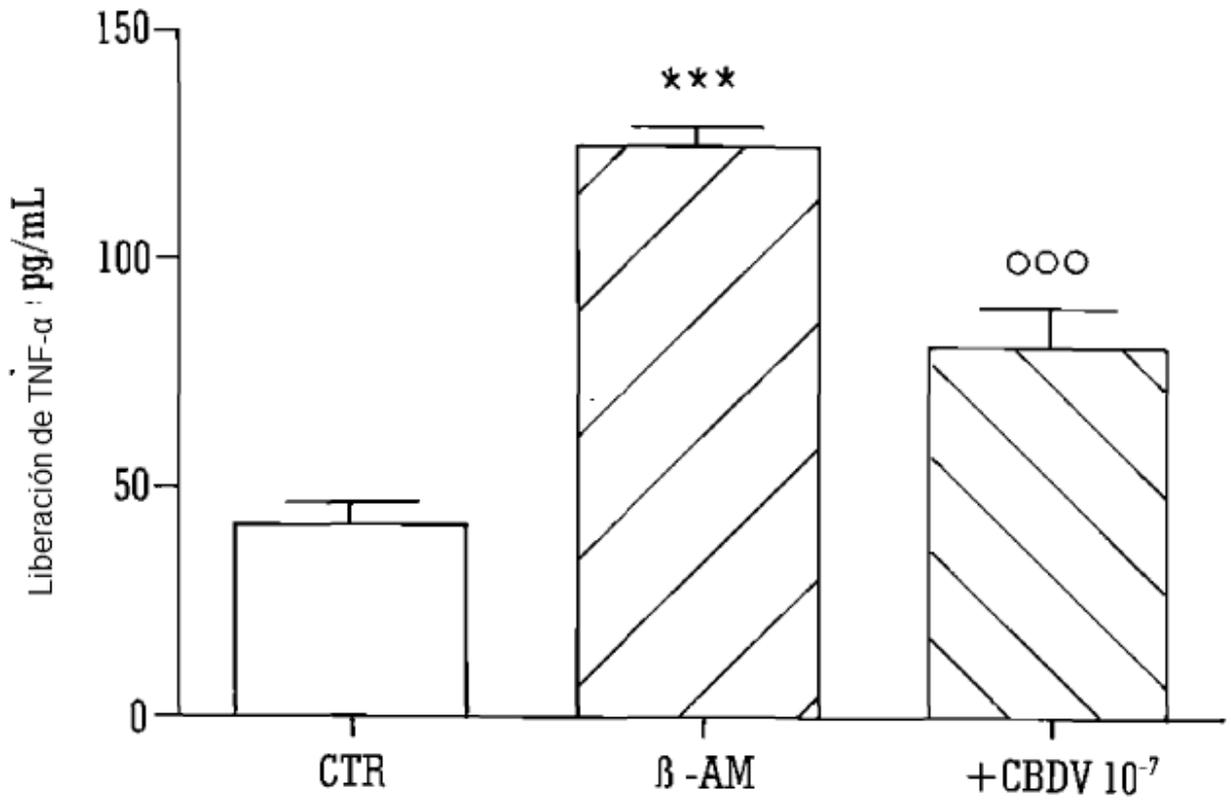


FIG.6

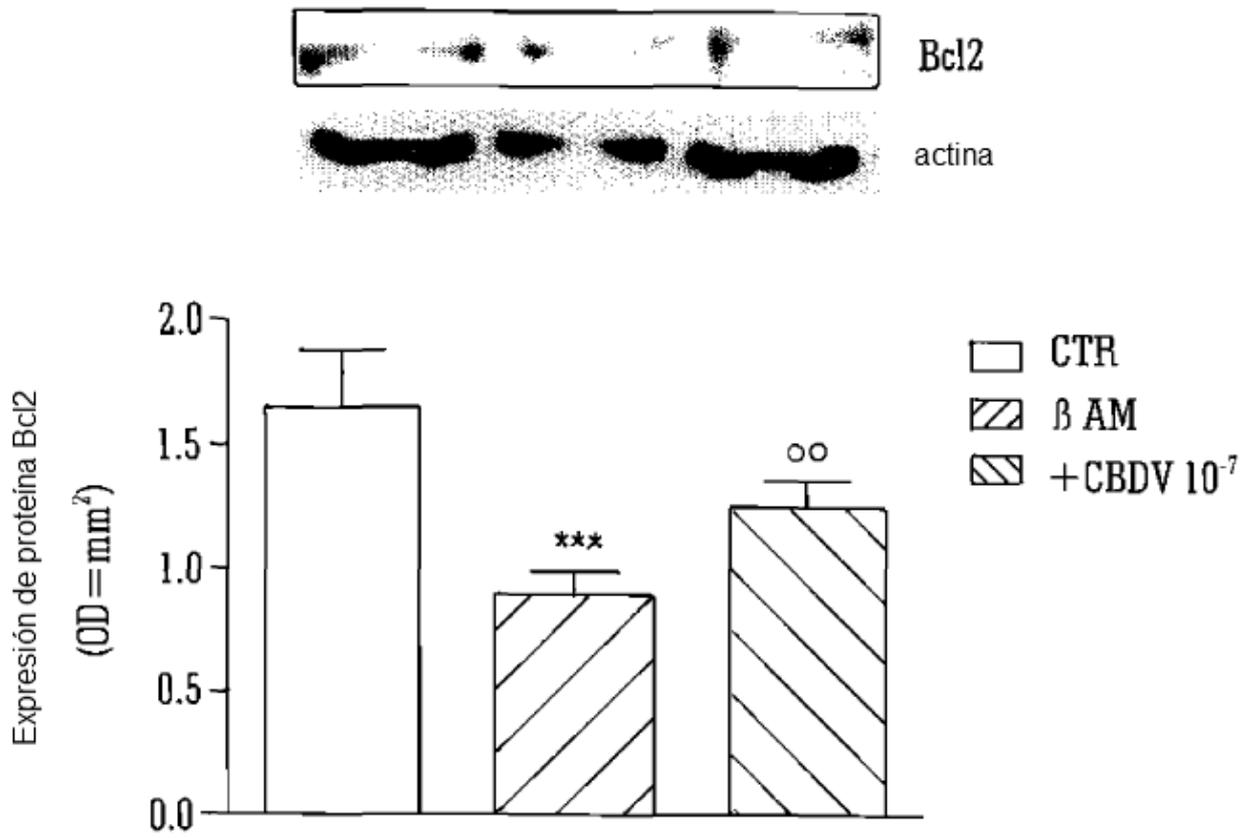


FIG. 7

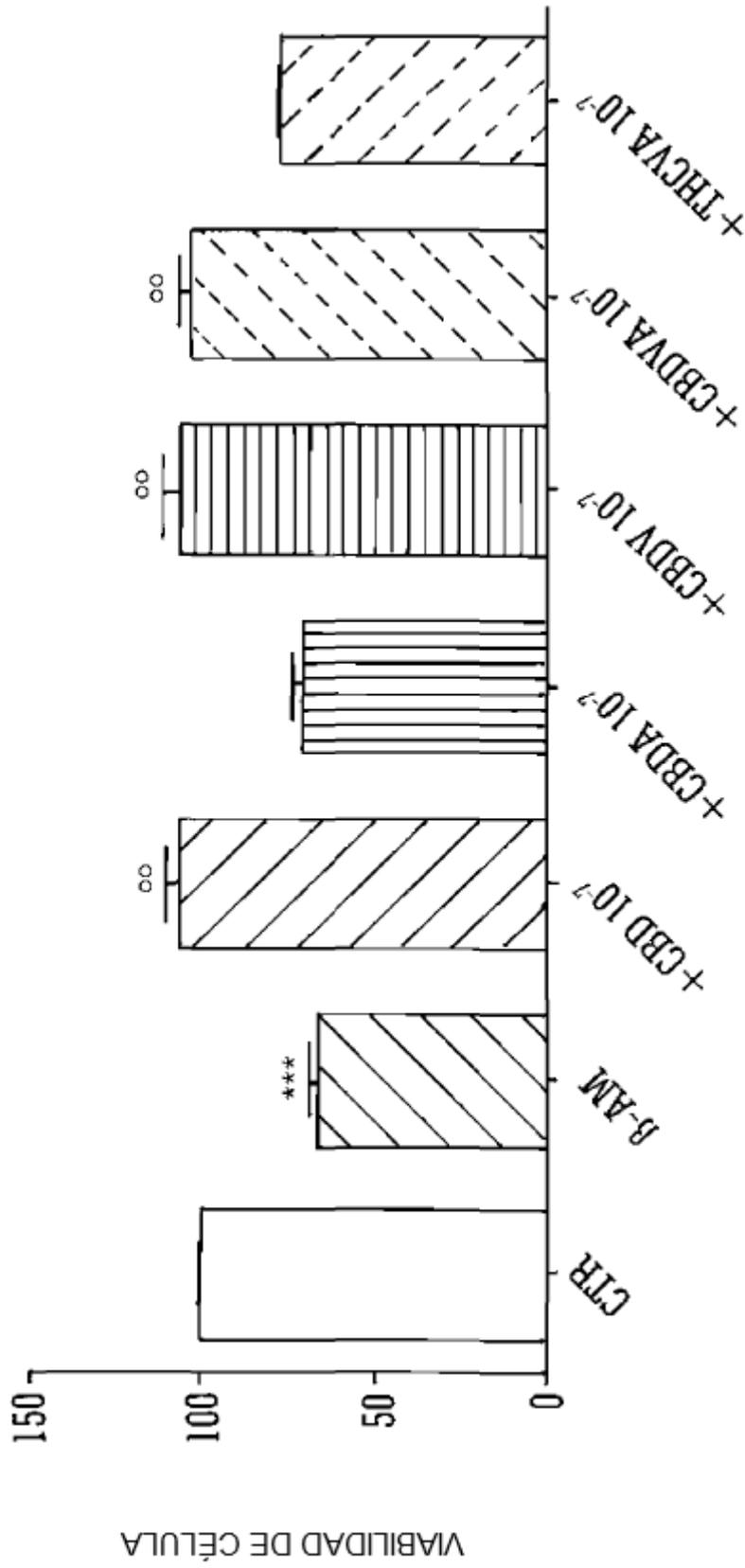


FIG. 8

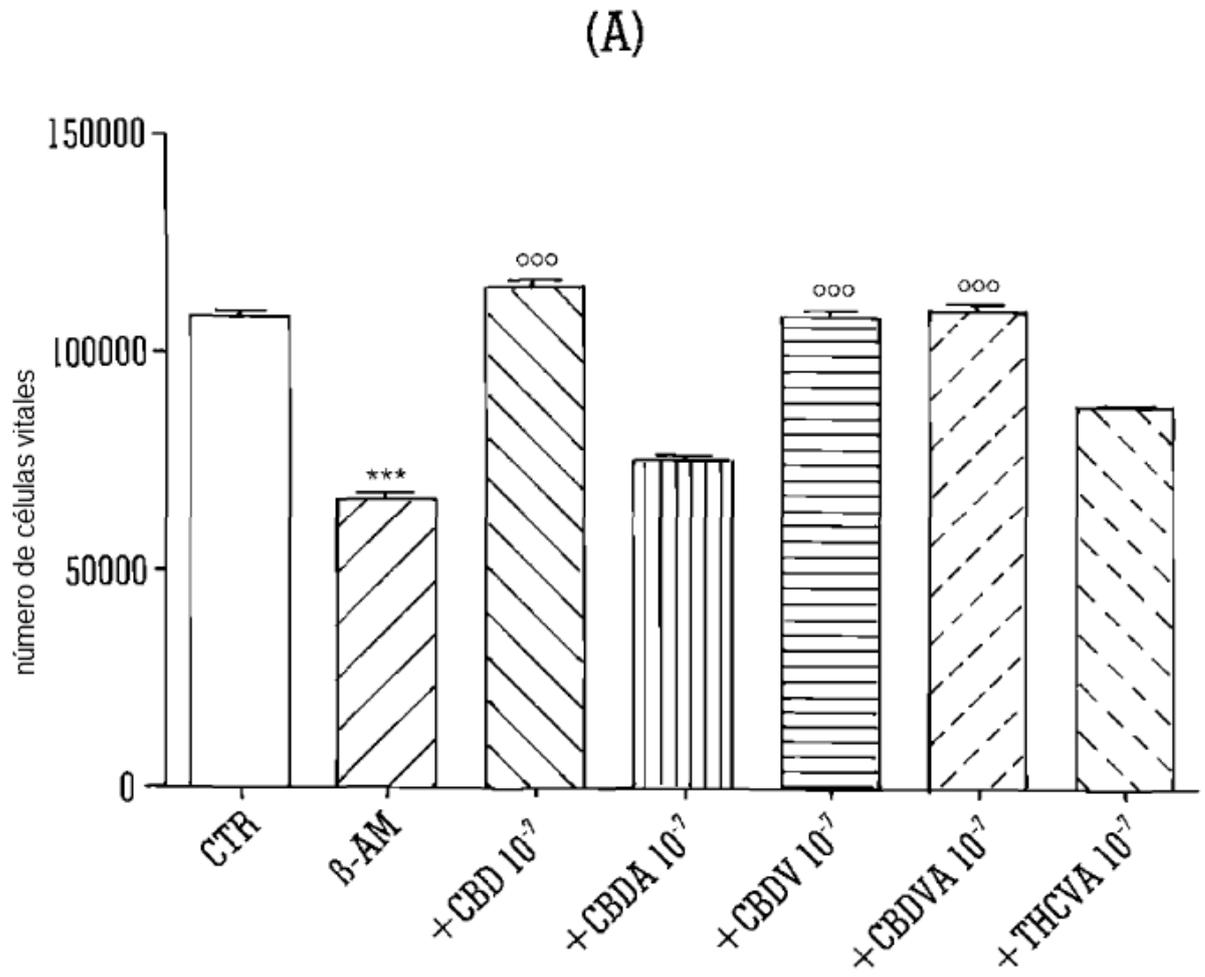


FIG. 9

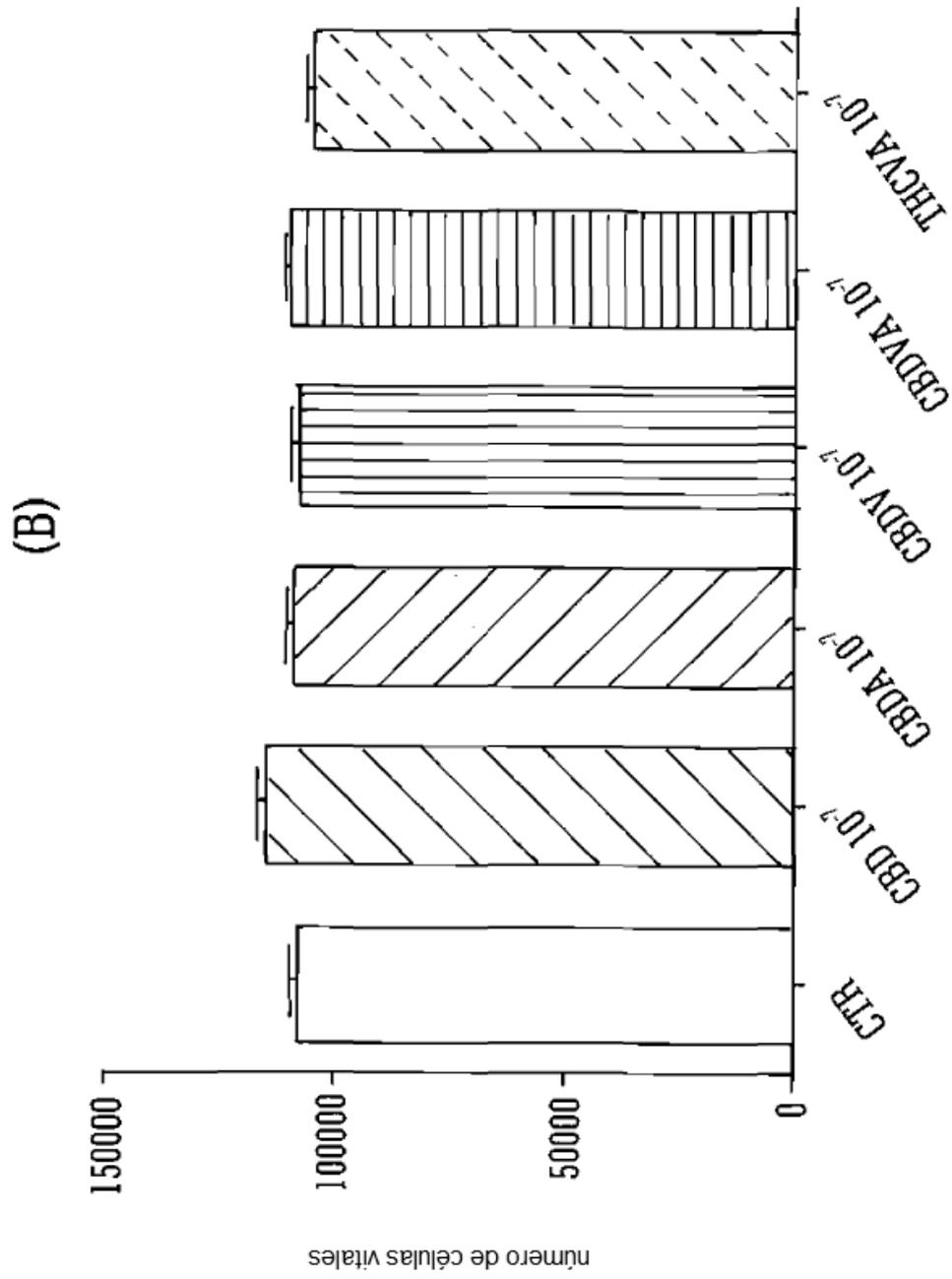


FIG. 9