

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 973**

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

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2007 PCT/GB2007/000122**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2007 WO07083098**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2007 E 07704916 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 1976506**

54 Título: **Extractos vegetales que contienen cannabinoides como agentes neuroprotectores**

30 Prioridad:

18.01.2006 GB 0601013

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

09.03.2020

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 2 746 973 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 vegetales que contienen cannabinoides como agentes neuroprotectores

5 Campo de la invención

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

10 Antecedentes de la invención

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

20

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 se asocian, especialmente en etapas tardías, con una pérdida neuronal severa.

25

Con un envejecimiento de la población cada vez mayor, progresivamente más personas se ven afectadas por enfermedades neurodegenerativas. Según el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares, existen más de 600 tipos diferentes de trastornos neurológicos.

30

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

35

El proceso de degeneración neuronal 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. Se requiere que el glutamato esté en estas bajas concentraciones para funciones cerebrales cruciales como la memoria y el aprendizaje. Cuando aumentan las concentraciones de glutamato, comienza el proceso de degeneración neuronal.

40

Cuando el cerebro se ve privado de oxígeno debido a una enfermedad, tal como una enfermedad neurodegenerativa, un trauma, tal como una lesión en la cabeza cerrada o debido a un evento isquémico tal como un accidente cerebrovascular, se produce una acumulación anormal de glutamato.

45

La degeneración neuronal ocurre cuando el glutamato se une a las proteínas receptoras en la superficie de las células. Estos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) abren un exceso de canales de calcio que provoca que la concentración intracelular de calcio aumente rápidamente. Los iones de calcio activan la fosfolipasa A (PLA), que a su vez produce la liberación de ácido araquidónico y radicales superóxido.

50

La degeneración neuronal continúa por los efectos destructivos de los radicales oxidativos causados por la inundación de glutamato. Los radicales causan la interrupción de las reacciones esenciales en las neuronas y esto conduce a la degeneración o muerte de la célula.

55

Los agentes neuroprotectores que pueden bloquear el receptor NMDA son útiles, ya que pueden bloquear la reacción causada por el glutamato y, por lo tanto, prevenir la degeneración neuronal.

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

60

Otro fármaco, Selfotel, mostró tendencias hacia una mayor tasa de mortalidad en pacientes tratados con el fármaco en lugar de placebo, y como tal los ensayos se detuvieron. El medicamento Cerestat también finalizó sus ensayos debido a preocupaciones con la relación beneficio/riesgo del fármaco.

65

Claramente, existe un requisito significativo para un antagonista de NMDA eficaz para prevenir o tratar la degeneración neuronal.

Los cannabinoides son un grupo de sustancias químicas conocidas que activan los receptores de cannabinoides en las células. Estas sustancias químicas, que se encuentran en las plantas de cannabis, se producen además de manera endógena en los seres humanos y otros animales, se denominan endocannabinoides. Los cannabinoides sintéticos son sustancias químicas con estructuras similares a los cannabinoides de la planta o a los endocannabinoides.

5

Los cannabinoides vegetales 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 como los terpenos.

10

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

15

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

20

Sin embargo, la investigación adicional de un estudio *in vivo* del mismo grupo no logró encontrar una diferencia entre los animales tratados con CBD aislado o sintético y los animales tratados con placebo (Rosenthal y otros. 2000).

25

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 inmunes usando extractos de cannabis se describen en US 2004/034108, GB2392093, WO 2004/016246, WO 02/064109 y WO 03/037306. Sin embargo, ninguno de estos documentos describe la relación de la fracción cannabinoide a la no cannabinoide.

30

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 de alcoholismo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y artritis. Sin embargo, este documento no describe la relación de la fracción cannabinoide a la no cannabinoide.

35

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 relación de la fracción cannabinoide a la no cannabinoide.

40

Sorprendentemente, los solicitantes han descubierto que la administración de extractos vegetales que contienen cannabinoides es más eficaz que los cannabinoides esencialmente puros en la prevención de la degeneración neuronal. En particular, los extractos vegetales que contienen cannabinoides que comprenden como cannabinoide predominante el tetrahidrocannabinol (THC) o cannabidiol (CBD) fueron particularmente eficaces en la prevención de la degeneración neuronal.

45

El término "extracto vegetal que contiene cannabinoides" se toma en la presente descripción para referirse a uno o más extractos vegetales de la planta de cannabis. Un extracto vegetal que contiene cannabinoides contiene, además de uno o más de otros cannabinoides, uno o más componentes no cannabinoides que se extraen conjuntamente con los cannabinoides del material vegetal. Sus intervalos respectivos variarán según el material de la planta de partida y la metodología de extracción usada. Los extractos vegetales que contienen cannabinoides pueden obtenerse por diversos medios de extracción de material vegetal de cannabis. Esos medios incluyen, entre otros: extracción supercrítica o subcrítica con CO₂, extracción con gas caliente y extracción con disolventes.

50

Resumen de la invención

De acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como un neuroprotector en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración, en donde el extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. comprende:

55

a) un extracto donde un cannabinoide principal es el tetrahidrocannabinol (THC) y el extracto comprende (p/p de extracto)
 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

60

b) un extracto donde un cannabinoide principal es el cannabidiol (CBD) y el extracto comprende (p/p de extracto)
 i) 57,0 - 72,0 % CBD, 2,0 - 6,5 % THC, 0,8 - 6,5 % cannabigerol, 3,0 - 6,5 % cannabicromeno, 1,0 - 2,0 % 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

65

en donde la relación de la fracción que contiene cannabinoides (i) a la fracción que no contiene cannabinoides (ii) está entre 60:40 y 90:10 del extracto total.

5 Los componentes de plantas de cannabis extraídos naturalmente estarán presentes en dos fracciones diferentes: la fracción que contiene cannabinoides y la fracción que no contiene cannabinoides. Las relaciones de las dos fracciones generalmente están entre 60:40 y 90:10 (fracción que contiene cannabinoides: fracción que no contiene cannabinoides). Más a menudo, la relación de las dos fracciones está entre 70:30 y 80:20 (fracción que contiene cannabinoides: fracción que no contiene cannabinoides).

10 El "cannabinoide principal" se define en la presente descripción como el cannabinoide predominante en el extracto vegetal que contiene cannabinoide. En el caso de un extracto vegetal a partir de una planta de cannabis cultivada para contener un alto contenido de THC el cannabinoide principal será THC.

15 El "cannabinoide secundario" se define en la presente descripción como el segundo cannabinoide más predominante en el extracto vegetal que contiene cannabinoide. En el caso de un extracto vegetal a partir de una planta de cannabis cultivada para contener un alto contenido de THC el cannabinoide secundario generalmente será CBD.

20 Los "otros cannabinoides" se definen en la presente descripción como todos los cannabinoides restantes que están presentes en un extracto vegetal de cannabis cuando se han tenido en cuenta los cannabinoides principales y secundarios. En el caso de un extracto vegetal a partir de una planta de cannabis cultivada para contener un alto contenido de THC los otros cannabinoides incluirán cannabigerol (CBG), canabicromeno (CBC), tetrahidrocannabidivarina (THCV) y ácido tetrahidrocannabinólico (THCA).

25 La fracción que no contiene cannabinoide generalmente comprenderá usualmente terpenos; que generalmente representan aproximadamente 6 % (p/p) del peso total del extracto y otros componentes derivados de la planta, que representan de 1-28 % (p/p) del peso total del extracto. Los otros componentes derivados de la planta incluyen esteroides, triglicéridos, alcanos, escualeno, tocoferol y carotenoides.

30 Los intervalos y compuestos anteriores son a partir del análisis de un extracto vegetal que contiene cannabinoide que se extrajo a partir de una planta de cannabis mediante el uso de la técnica de extracción de CO₂ subcrítico como se describe en la patente GB2391865 del Reino Unido concedida a los solicitantes.

35 La solicitud de patente internacional WO 2002/32420 en el nombre de Delta-9-Pharma describe en la Tabla 1 la composición de extractos vegetales de cannabis extraídos mediante el uso de otras técnicas. Otros componentes de la fracción que no contiene cannabinoides se han identificado mediante el uso de técnicas de extracción de CO₂ supercrítico, extracción con etanol y con hexano. Estos incluyen: clorofila, flavonoides glucósidos y alcaloides.

40 Otra técnica de extracción de la planta de cannabis es la extracción con gas caliente como se describe en la patente GB2376464 del Reino Unido concedida a los solicitantes.

El extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como neuroprotector en la prevención o el tratamiento de la neurodegeneración puede comprender una combinación del extracto a) y el extracto b).

45 El extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como neuroprotector en la prevención o el tratamiento de la neurodegeneración comprende preferentemente todos los componentes de la planta de cannabis extraídos naturalmente.

50 El término "degeneración neuronal" se usa para describir diferentes grupos de afecciones y enfermedades. Estos grupos incluyen, pero no se limitan a: enfermedades neurodegenerativas, enfermedades isquémicas, lesiones o daños cerebrales y degeneración neuronal o autoinmune relacionada con la edad.

55 Las enfermedades neurodegenerativas surgen cuando se produce la degeneración de la vía neuronal como resultado de una enfermedad específica. Las enfermedades isquémicas surgen cuando ocurre la degeneración de la vía neuronal como resultado de la falta de oxígeno. Las lesiones o daños cerebrales surgen cuando ocurre una degeneración de la vía neuronal como resultado de una lesión en el cerebro mismo. La degeneración neuronal o autoinmune relacionada con la edad surge cuando la degeneración de la vía neuronal ocurre como resultado de la edad del paciente o debido a una enfermedad autoinmune.

60 Los extractos vegetales de *Cannabis sativa* L. se usan en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

65 Preferentemente, la enfermedad neurodegenerativa se toma del grupo: Enfermedad de Alzheimer; Enfermedad de Parkinson; esclerosis lateral amiotrófica; Enfermedad de Huntington; esclerosis múltiple, demencia frontotemporal; enfermedad por priones; demencia con cuerpos de Lewy; parálisis supranuclear progresiva; demencia vascular; hidrocefalia a presión normal; lesión traumática de la médula espinal; demencia por VIH; neurotoxicidad inducida por

alcohol; Síndrome de Down; epilepsia o cualquier otra enfermedad neurodegenerativa neurológica o psiquiátrica relacionada.

5 Alternativamente los extractos vegetales de *Cannabis sativa* L. son para uso en la prevención o tratamiento de enfermedades isquémicas.

Preferentemente, la enfermedad isquémica se toma del grupo: accidente cerebrovascular; isquemia cardiaca; enfermedad de la arteria coronaria; tromboembolismo; infarto de miocardio o cualquier otra enfermedad isquémica relacionada.

10 Alternativamente los extractos vegetales de *Cannabis sativa* L. se usan para la prevención o el tratamiento de lesiones o daños cerebrales.

Una lesión cerebral incluye lesión axonal difusa; concusión; contusión; latigazo cervical o cualquier otra lesión traumática en la cabeza o el cerebro.

15 Alternativamente, la lesión o daño cerebral es una lesión cerebral adquirida.

Una lesión cerebral adquirida incluye accidente cerebrovascular; lesión cerebral anóxica; lesión cerebral hipóxica o cualquier otra lesión cerebral adquirida.

20 La lesión o daño cerebral puede ser una lesión en la cabeza cerrada o una lesión en la cabeza abierta o cualquier otra lesión en la cabeza.

25 Alternativamente los extractos vegetales de *Cannabis sativa* L. se usan para la prevención o el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes relacionadas con la edad.

Ciertos aspectos de esta invención se describen más aún, en forma de ejemplo solamente.

30 Descripción específica

Recientemente, se han realizado ensayos clínicos con extractos vegetales de cannabis, con el objetivo de probar la evidencia principalmente anecdótica de sus propiedades analgésicas y otras medicinales.

35 Un estudio ha encontrado que la combinación de tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) en una relación aproximadamente resultó ser un analgésico eficaz en pacientes con dolor neuropático central (Berman y otros, 2004). Los extractos vegetales que contienen cannabinoides de *Cannabis Sativa* L. que contienen ya sea THC o CBD se mezclaron en una relación 1:1 y se compararon con el placebo.

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

Por lo tanto, este estudio comparó un extracto vegetal que contiene THC y un extracto vegetal que contiene CBD con sus contrapartes esencialmente puras.

45 Las composiciones del extracto vegetal que contiene THC y el extracto vegetal que contiene CBD se describen en la Tabla 1 a continuación.

50

55

60

65

Tabla 1:

	Extracto vegetal que contiene THC (% p/p de extracto)	Extracto vegetal que contiene CBD (% p/p de extracto)
<u>Cannabinoides principal/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 Canabinoides:</u>		
Canabigerol	1,0 - 2,0	0,8 - 6,5
Canabicromeno	0,8 - 2,2	3,0 - 6,5
Tetrahidrocanabidivarina	0,4 - 1,0	-
Ácido tetrahidrocanabinólico	<2,0	-
Canabidivarina	-	1,0 - 2,0
Ácido canabidiólico	-	<2,0
<u>Terpenos:</u>		
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 secundarios derivados de plantas que incluyen:</u>		
Esteroles	6,3 - 26,7	1,7 - 28,4
Triglicéridos		
Alcanos		
Escualeno		
Tocoferol		
Carotenoides		

Se realizaron experimentos con neuronas del hipocampo; se investigaron los efectos de los extractos vegetales que contienen cannabinoides y los cannabinoides esencialmente puros sobre la homeostasis del ion calcio en paradigmas agudos y crónicos.

Sorprendentemente, se descubrió que había diferencias significativas entre los extractos vegetales que contienen cannabinoides y los cannabinoides esencialmente puros. Los experimentos en aplicaciones crónicas proporcionaron evidencia de que los cannabinoides esencialmente puros perdieron su efectividad a largo plazo, mientras que los extractos vegetales que contienen cannabinoides ganaron eficacia. De esto se infiere que el uso de extractos vegetales 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 vegetales, incluidos los otros cannabinoides, como se detalla en la Tabla 1, contribuyen a los efectos neuroprotectores de los cannabinoides principales.

En los ejemplos que se describen a continuación, se usaron los siguientes métodos para dilucidar los efectos neuromoduladores de los cannabinoides.

Preparación del Cultivo

ES 2 746 973 T3

5 Los cultivos primarios estándar de hipocampo se prepararon a partir de cachorros de rata Lister-Hooded (1-3 días de edad), sacrificados por dislocación cervical, de acuerdo con las regulaciones del Ministerio del Interior y del instituto. El cerebro se extrajo rápidamente, se diseccionó el hipocampo y se colocó en una solución tamponada con HEPES filtrada enfriada con hielo (HBS, composición en mM: NaCl 130; KCl 5,4; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1,0; HEPES 10; glucosa 25). Se realizó una microdissección para eliminar los vasos sanguíneos y el exceso de tejido que no es del hipocampo.

10 El tejido del hipocampo se cortó finamente y se colocó en 1 mg/ml de solución de proteasa tipo X y XIV (40 minutos). Luego se lavó el tejido en HBS y se trituró varias veces usando pipetas Pasteur graduadas de vidrio pulido al fuego. Después de la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se volvió a suspender el sedimento de tejido restante en medio de cultivo de tejido (medio esencial mínimo al 90 % con suero bovino fetal al 10 % y L-glutamina 2 mM). El tejido se almacenó en condiciones estándar: en una incubadora humidificada a 37 °C y en 5 % de CO₂ y se recentrifugó.

15 Se retiró el exceso de medio y se volvió a suspender el sedimento de tejido en medio de cultivo para la colocación en placas. Se colocó una gota de suspensión celular en el centro de una placa de cultivo de 35 mm, se revistió con poli-L-lisina y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después de esto, se agregaron suavemente 2 ml adicionales de medio de cultivo de tejidos a cada placa y el cultivo se mantuvo en una incubadora humidificada (37 °C; 5 % de CO₂).

20 Los cultivos se dejaron madurar durante 2 días antes de reemplazar 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

25 Para los experimentos 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.

30 A todos los medios de perfusión se añadió tetrodotoxina bloqueadora de los canales de sodio (TTX) para evitar la activación espontánea de células y la liberación del transmisor, asegurando que solo se visualizaran los efectos post-sinápticos.

35 Los cultivos se perfundieron con HBS o solución tamponada de HEPES de bajo Mg²⁺ para experimentos con NMDA (composición en mM: NaCl 130; KCl 5,4; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 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 adecuado 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 daba una sola longitud de onda de luz, para exponer las células a 350 nm y 380 nm, especificadas por el monocromador.

La relación 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 la fluorescencia de fondo.

45 Los datos que se produjeron se agruparon y se determinaron las medias para cada experimento.

Fármacos y soluciones madre

50 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).

55 Extractos de CO₂ que contiene cannabis de THC y CBD (obtenidos según el método de GB 2391865) también se almacenaron en una solución etanólica. El extracto de la planta que contiene THC contenía 72,6 % de THC y 2,5 % de CBD, mientras que el extracto de la 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 (c.s para 100 %).

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

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

65 Para el comparador de THC, se agregaron THC y CBD esencialmente puros en una relación de 29,1:1. Para el comparador de CBD, se agregaron juntos CBD y THC esencialmente puros, a una relación de CBD a THC de 25,9:1.

Se preparó una solución madre de NMDA (10 mM) en agua doblemente destilada y las concentraciones necesarias en se realización en HBS. Se aplicó NMDA (con glicina 100 μ M) en cada experimento para distinguir categóricamente entre las células neuronales y gliales en la imagen obtenida.

5

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

10 Protocolos experimentales

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

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

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

25 Para evaluar si los efectos moduladores agudos se alteran por incubación durante la noche, las células se incubaron durante la noche con la muestra 1 μ M y se evaluaron comparando una aplicación inicial de NMDA de dos minutos (10 μ M) con una aplicación posterior de NMDA de dos minutos (10 μ M). La aplicación posterior del NMDA siguió a una aplicación de cinco minutos de artículo de prueba 1 μ M.

Análisis de Datos

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

35 Todos los experimentos se realizaron un mínimo de tres veces, cada uno con neuronas de un cultivo diferente. Solo los cambios en la fluorescencia $> 0,1$ unidades de relación se consideraron como respuesta. Los datos se exportaron a Excel y el análisis estadístico se realizó con Prism. Las pruebas de normalidad confirmaron la ausencia de distribución normal de datos. Por lo tanto, se usó una prueba U de Mann Whitney para comparaciones pareadas y para comparaciones de grupos múltiples, una prueba de Kruskal-Wallis con el uso de una prueba posterior de Dunn o Mann Whitney.

40

Ejemplo 1:

Los efectos de los cannabinoides en 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 como el THC esencialmente puro y el cannabinoide sintético WIN55212-2 alteran la homeostasis del ion calcio en las neuronas. Esto tiene implicaciones en la neuroprotección o la apoptosis de las células.

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

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

55 Se evaluaron los efectos de los cannabinoides esencialmente puros, los extractos vegetales que contienen cannabinoides y los comparadores con relación de cannabinoides para investigar las respuestas de las neuronas a estas diferentes formas de cannabinoides.

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

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

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 intracelular de iones calcio. La Tabla 2 a continuación detalla el tamaño medio de los aumentos en cada artículo de prueba.

5

Tabla 2:

Artículo de prueba	Concentración de Ca ²⁺ intracelular			%ΔF/F
	Pretratamiento	Postratamiento	Respuesta (Post-Pre)	
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

10

15

20

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

P-CBD - CBD esencialmente puro

25

E-CBD - extracto vegetal que contiene CBD

C-CBD - Comparador de CBD

P-THC - THC esencialmente puro

E-THC: extracto vegetal que contiene THC

C-THC - Comparador de THC

30

(Estas abreviaturas se usan en todas las tablas siguientes)

Como se puede apreciar en la Tabla 2, la cantidad de aumento en la concentración intracelular de iones calcio producida por los extractos de plantas que contienen CBD y THC es mucho menor que la producida por sus contrapartes esencialmente puras.

35

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

40

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

Como se puede apreciar, los extractos vegetales que contienen cannabinoides producen un aumento mucho menor en la concentración intracelular de iones calcio, por lo que se concluye que estos artículos de prueba serían más adecuados para su uso como agentes neuroprotectores.

45

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

50

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

55

Ejemplo 2:

Los efectos neuromoduladores de los cannabinoides de aplicación aguda

60

La modulación aguda de la homeostasis del ion calcio se evaluó comparando una aplicación inicial de NMDA de dos minutos (10 μM) con una aplicación posterior de NMDA de dos minutos después de una aplicación de cinco minutos de 1 μM del artículo de prueba de cannabinoide particular.

65

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

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

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

10 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.

La Tabla 3 a continuación detalla los resultados obtenidos.

15 Tabla 3:

Artículo de prueba	Pretratamiento [Ca ²⁺]	%ΔF/F	Postratamiento [Ca ²⁺]	%ΔF/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

20 Como se pudo apreciar anteriormente, todas las muestras fueron capaces de reducir la concentración intracelular de iones calcio, lo que demuestra que tienen el potencial de ser neuroprotectores.

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

40 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.

45 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 requerimiento 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 NMDA en un grado tan grande, aunque las neuronas estarán protegidas, es probable que la cognición del paciente se vea afectada al mismo tiempo.

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

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

55 Ejemplo 3:

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

60 Para evaluar los efectos crónicos de las diferentes formas de cannabinoides en la concentración intracelular de iones calcio, las células se incubaron durante la noche con 1 μM del artículo de prueba a 37 °C, 5 % de CO₂. Se evaluaron las respuestas a dosis crecientes de NMDA (1, 10 y 100 μM).

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

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

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

5 Estos datos se muestran en la Tabla 4 a continuación y se pueden comparar con los datos producidos por el 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 vírgenes sin incubación con el artículo de prueba; se añadió el NMDA a la concentración adecuada y se determinó el cambio en la concentración intracelular de iones calcio.

10

Tabla 4:

15

Artículo de prueba	Respuesta a la Concentración de Ca ²⁺ intracelular (Post-Pre)	Cambio a partir 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

20

25

Un cambio porcentual menor con respecto al valor de control demuestra un aumento menor en la concentración intracelular de iones calcio. 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 vegetal que contiene CBD produjo un cambio mucho menor en la concentración intracelular de iones calcio que la producida por el CBD esencialmente puro y el comparador de CBD. El cambio en la concentración intracelular de iones calcio que se produjo por el extracto vegetal que contiene CBD fue de un nivel similar al producido por el control.

35

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

40

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

45

Cuando estos datos se comparan con los de la Tabla 2 (Ejemplo 1) donde la aplicación aguda de todos los artículos de prueba dio como resultado un aumento en la concentración intracelular de iones calcio, se puede ver que el uso de extractos vegetales que contienen cannabinoides, como un tratamiento a largo plazo no interferiría con la señalización celular.

50

Los cannabinoides esencialmente puros y los comparadores podrían causar potencialmente apoptosis o daño celular cuando se usan como un tratamiento a más largo plazo, ya que se sabe que las concentraciones intracelulares de iones calcio crónicamente elevadas producidas por la incubación nocturna con estos cannabinoides son dañinas.

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

55

Las Tablas 5 a 7 a continuación detallan las respuestas de las células a las diferentes concentraciones de NMDA. Una reducción en la concentración intracelular de iones calcio 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.

60

Tabla 5: NMDA 1 μM

65

Artículo de prueba	Concentración de Ca ²⁺ intracelular			%ΔF/F
	Pretratamiento	Postratamiento	Respuesta (Post-Pre)	
5 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
10 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

15 Como se muestra en la Tabla 5 anterior, todos los artículos de prueba redujeron la concentración intracelular de iones calcio después del tratamiento con NMDA 1 μM. 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.

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

25 Tabla 6: NMDA 10 μM

Artículo de prueba	Concentración de Ca ²⁺ intracelular			%ΔF/F
	Pretratamiento	Postratamiento	Respuesta (Post-Pre)	
30 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
35 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

40 Como se describe en la Tabla 6, todos los artículos de prueba, excepto el extracto vegetal que contiene THC, dieron como resultado una disminución en la concentración intracelular de iones calcio. La cantidad de reducción mostrada por todos los otros artículos de prueba fue similar a la mostrada a la concentración de NMDA de 1 μM.

45 Como se señaló anteriormente cuando estos datos se comparan con los datos de la Tabla 4, el extracto vegetal que contiene CBD que sería beneficioso como neuroprotector a esta concentración más alta de NMDA.

Tabla 7: NMDA 100 μM

Artículo de prueba	Concentración de Ca ²⁺ intracelular			%ΔF/F
	Pretratamiento	Postratamiento	Respuesta (Post-Pre)	
50 P-CBD	0,910	1,289	0,379	141,57
55 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
60 E-THC	0,872	2,578	1,706	295,77
C-THC	0,942	1,599	0,657	169,76

65 A la concentración más alta de NMDA, ninguno de los artículos de prueba pudo reducir la concentración intracelular de iones calcio. Este resultado no es sorprendente ya que una concentración de NMDA de 100 μM es extremadamente

neurotóxica y puede provocar la muerte celular inmediata. A las concentraciones más bajas de NMDA hay degeneración neuronal y posiblemente apoptosis tardía.

Ejemplo 4:

Efectos agudos de los cannabinoides sobre la respuesta de iones de calcio del 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 por 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 cannabinoides pueden volverse insensibles cuando se exponen a su agonista durante un período de tiempo más largo.

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

La Tabla 8 detalla las concentraciones intracelulares de iones calcio 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 intracelular de iones calcio 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 ²⁺]	% $\Delta\text{F}/\text{F}$	Postratamiento [Ca ²⁺]	% $\Delta\text{F}/\text{F}$	Respuesta (% de cambio)
P-CBD	0,424	52,42	0,715	71,97	-68,6
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

Como se puede apreciar en la tabla anterior, los dos cannabinoides esencialmente puros dieron como resultado un aumento en la concentración intracelular de iones calcio. El CBD esencialmente puro aumentó la concentración en gran medida y una que en sí misma podría considerarse neurotóxica en lugar de neuroprotectora. Esto es sorprendente como en el Ejemplo 2; el CBD esencialmente puro produjo la mayor reducción en la concentración intracelular de iones calcio.

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

Conclusión:

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

Además, los datos de las muestras de comparación de cannabinoides proporcionan evidencia de que la razón de la efectividad 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 vegetal que contiene cannabinoides.

Parece que la mayor eficacia de los extractos vegetales que contienen cannabinoides se debe a la presencia de uno o más de los otros componentes identificados en los extractos vegetales. 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

- 5 1. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como neuroprotector en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración, en donde el extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. comprende:
 - a) un extracto donde un cannabinoide principal es tetrahidrocannabinol (THC) y el extracto comprende (p/p de extracto)
 - 10 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 donde un cannabinoide principal es el cannabidiol (CBD) y el extracto comprende (p/p de extracto)
 - 15 i) 57,0 - 72,0 % CBD, 2,0 - 6,5 % THC, 0,8 - 6,5 % cannabigerol, 3,0 - 6,5 % cannabicromeno, 1,0-2,0 % 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 donde la relación de la fracción que contiene cannabinoides (i) a la fracción que no contiene cannabinoides (ii) está entre 60:40 y 90:10 del extracto total.
- 20 2. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como en la reivindicación 1 en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración, que comprende una combinación del extracto a) y el extracto b).
- 25 3. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como en la reivindicación 1 en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración, en donde el extracto comprende todos los componentes de la planta de cannabis extraídos naturalmente.
- 30 4. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como se reivindica en la reivindicación 1, en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración, en pacientes con: Enfermedad de Alzheimer; Enfermedad de Parkinson; esclerosis lateral amiotrófica; Enfermedad de Huntington; esclerosis múltiple; demencia frontotemporal; enfermedad por priones; demencia con cuerpos de Lewy; parálisis supranuclear progresiva; demencia vascular; hidrocefalia a presión normal; lesión traumática de la médula espinal; demencia por VIH; neurotoxicidad inducida por alcohol; Síndrome de Down; epilepsia o cualquier otra enfermedad neurodegenerativa neurológica o psiquiátrica relacionada.
- 35 5. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración en pacientes con enfermedad isquémica.
- 40 6. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración en pacientes con: accidente cerebrovascular; isquemia cardíaca; enfermedad de la arteria coronaria; tromboembolismo; infarto de miocardio o cualquier otra enfermedad isquémica relacionada.
- 45 7. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración en pacientes con daño o lesión cerebral.
- 50 8. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como en la reivindicación 7 en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración en pacientes con: lesión axonal difusa; concusión; contusión; latigazo cervical o cualquier otra lesión traumática en la cabeza o el cerebro.
- 55 9. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como en la reivindicación 7, en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración en donde la lesión o daño cerebral es una lesión cerebral adquirida.
- 60 10. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como en la reivindicación 9, en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración en donde la lesión cerebral adquirida se toma del grupo: accidente cerebrovascular; lesión cerebral anóxica; lesión cerebral hipóxica o cualquier otra lesión cerebral adquirida.
- 65 11. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como en la reivindicación 9, en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración en donde la lesión o daño cerebral es una lesión en la cabeza cerrada o una lesión en la cabeza abierta o cualquier otra lesión en la cabeza.
12. Un extracto vegetal de *Cannabis sativa* L. para su uso como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la prevención o tratamiento de la neurodegeneración en pacientes con enfermedad inflamatoria o autoinmune relacionada con la edad.