

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 333**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61K 31/192** (2006.01)

**A61K 36/185** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 25/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2016 PCT/GB2016/052340**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17025712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2016 E 16747593 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3334422**

54 Título: **Uso de ácido cannabidiólico en el tratamiento de la epilepsia**

30 Prioridad:

**10.08.2015 GB 201514079**

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

**20.04.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STOTT, COLIN;  
JONES, NICHOLAS;  
WILLIAMS, ROBIN y  
WHALLEY, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 820 333 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de ácido cannabidiólico en el tratamiento de la epilepsia

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido cannabidiólico (CBDA) para su uso en el tratamiento de la epilepsia. El CBDA se presenta en forma de extracto de cannabis altamente purificado, de modo que el CBDA está presente en más del 98% del extracto total (p/p) o se produce sintéticamente. En una forma de realización, el CBDA se usa en el tratamiento de convulsiones generalizadas, preferiblemente convulsiones tónico-clónicas.

10 Preferiblemente se han eliminado de modo sustancial los cannabinoides: tetrahidrocannabinol (THC) o ácido tetrahidrocannabinólico (THCA).

15 En uso, el CBDA se puede usar de forma concomitante con uno u otros más fármacos antiepilépticos (FAE). Alternativamente, el CBDA puede formularse para su administración por separado, secuencial o simultáneamente con uno o más FAE o la combinación puede proporcionarse en una única forma de dosificación. Cuando el CBDA se formula para su administración por separado, secuencial o simultáneamente, puede proporcionarse como un kit o junto con instrucciones para administrar el uno o más componentes de la manera indicada. También se puede utilizar como único medicamento, es decir, como monoterapia.

Antecedentes de la invención

20 La epilepsia ocurre en aproximadamente el 1% de la población mundial, (Thurman et al., 2011) de la cual el 70% puede controlar adecuadamente sus síntomas con los fármacos antiepilépticos (FAE) existentes disponibles. Sin embargo, el 30% de este grupo de pacientes, (Eadie et al., 2012), no pueden liberarse de las convulsiones utilizando los FAE disponibles y, como tales, se les considera que padecen epilepsia intratable o "epilepsia resistente al tratamiento" (TRE).

25 La epilepsia intratable o resistente al tratamiento fue definida en 2009 por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) como "el fracaso de los ensayos adecuados de dos esquemas de FAE tolerados y elegidos y utilizados apropiadamente (ya sea como monoterapias o en combinación) para lograr una ausencia sostenida de convulsiones" (Kwan et al., 2009).

Las personas que desarrollan epilepsia durante los primeros años de vida a menudo son difíciles de tratar y, como tales, a menudo se las denomina resistentes al tratamiento. Los niños que sufren convulsiones frecuentes en la infancia a menudo quedan con daños neurológicos que pueden causar retrasos cognitivos, conductuales y motores.

30 La epilepsia infantil es un trastorno neurológico relativamente común en niños y adultos jóvenes con una prevalencia de aproximadamente 700 por 100,000. Esto es el doble del número de adultos epilépticos por población.

Cuando un niño o un adulto joven se presenta con una convulsión, normalmente se realizan investigaciones para investigar la causa. La epilepsia infantil puede ser causada por muchos síndromes diferentes y mutaciones genéticas y, como tal, el diagnóstico de estos niños puede llevar algún tiempo.

35 El síntoma principal de la epilepsia son las convulsiones repetidas. Para determinar el tipo de epilepsia o síndrome epiléptico que padece un paciente, se realiza una investigación sobre el tipo de convulsiones que está experimentando el paciente. Se realizan observaciones clínicas y pruebas de electroencefalografía (EEG) y los tipos de convulsiones se clasifican de acuerdo con la clasificación ILAE que se describe más adelante y en la Figura 1.

40 La clasificación internacional de tipos de convulsiones propuesta por la ILAE se adoptó en 1981 y la ILAE publicó una propuesta revisada en 2010 que aún no ha reemplazado la clasificación de 1981. La figura 1 está adaptada de la propuesta de 2010 para la terminología revisada e incluye los cambios propuestos para reemplazar la terminología de "parcial" por "focal". Además, el término "convulsión parcial simple" ha sido reemplazado por el término "convulsión focal donde no se afectan la conciencia/capacidad de respuesta" y el término "convulsión parcial compleja" ha sido reemplazado por el término "convulsión focal donde se afectan la percepción/conciencia".

45 En la Figura 1 se puede ver que las convulsiones generalizadas, donde la convulsión surge dentro de redes distribuidas bilateralmente y las involucra rápidamente, se pueden dividir en seis subtipos: convulsiones tónico-clónicas (gran mal); Convulsiones de Ausencia (pequeño mal); Convulsiones clónicas; Convulsiones tónicas; Convulsiones atónicas y convulsiones mioclónicas.

50 Las convulsiones focales (parciales) donde la convulsión se origina dentro de redes limitadas a un solo hemisferio, también se dividen en subcategorías. Aquí la convulsión se caracteriza según una o más características de la convulsión, que incluyen aura, motor, autonómico y conciencia/capacidad de respuesta. Cuando una convulsión comienza como una convulsión localizada y evoluciona rápidamente para distribuirse dentro de las redes bilaterales, esta convulsión se conoce como convulsión convulsiva bilateral, que es la terminología propuesta para reemplazar las

convulsiones generalizadas secundarias (convulsiones generalizadas que han evolucionado de convulsiones focales y ya no permanecen localizadas).

5 Las convulsiones focales en las que se altera la conciencia/capacidad de respuesta del sujeto se denominan convulsiones focales con discapacidad y convulsiones focales donde la conciencia o la capacidad de respuesta del sujeto no se ven afectadas se denominan convulsiones focales sin discapacidad.

Las convulsiones focales pueden ocurrir en síndromes de epilepsia que incluyen: síndrome de Lennox-Gastaut; Complejo de esclerosis tuberosa; Síndrome de Dravet; CDKL5; Lipofuscinosis ceroides neuronales (NCL); síndrome de epilepsia relacionado con infección febril (FIRES); Síndrome de Aicardi y anomalías cerebrales.

10 Los síndromes epilépticos a menudo se presentan con muchos tipos diferentes de convulsiones y es importante identificar los tipos de convulsiones que sufre un paciente, ya que muchos de los FAE estándar están destinados a tratar o solo son eficaces contra un tipo/subtipo de convulsión determinado.

Los FAE comunes definidos por sus mecanismos de acción se describen en las siguientes tablas:

Tabla 1. Ejemplos de FAE de espectro estrecho

FAE de espectro estrecho	Mecanismo	Indicación
Fenitoína	Canal de sodio	Parcial complejo Tónico-clónicas
Fenobarbital	GABA / canal de calcio	Convulsiones parciales Tónico-clónicas
Carbamazepina	Canal de sodio	Convulsiones parciales Tónico-clónicas Convulsiones mixtas
Oxcarbazepina	Canal de sodio	Convulsiones parciales Tónico-clónicas Convulsiones mixtas
Gabapentina	Canal de calcio	Convulsiones parciales Convulsiones mixtas
Pregabalina	Canal de calcio	Terapia adjunta para convulsiones parciales con o sin generalización secundaria
Lacosamida	Canal de sodio	Terapia adjunta para convulsiones parciales
Vigabatrín	GABA	Convulsiones tónico-clónicas generalizadas de modo secundario Convulsiones parciales Espasmos infantiles debido a síndrome de West

15

Tabla 2. Ejemplos de FAE de amplio espectro

FAE de amplio espectro	Mecanismo	Indicación
Ácido valproico	GABA / Canal de sodio	Tratamiento de primera línea para convulsiones tónico-clónicas, convulsiones de ausencia y tratamiento de segunda línea de convulsiones mioclónicas para convulsiones parciales y espasmos infantiles. Uso intravenoso en estado epiléptico
Lamotrigina	Canal de sodio	Convulsiones parciales Tónico-clónicas Convulsiones asociadas con síndrome de Lennox-Gastaut
Etosuximida	Canal de calcio	Convulsiones de ausencia
Topiramato	GABA / Canal de sodio	Convulsiones asociadas con síndrome de Lennox-Gastaut
Zonisamida	GABA / Canal de calcio / canal de sodio	Terapia auxiliar en adultos con convulsiones de inicio parcial Espasmo infantil Convulsión mixta Síndrome de Lennox-Gastaut Mioclónicas Convulsión tónico-clónica generalizada
Levetiracetam	Canal de calcio	Convulsiones parciales terapia auxiliar para convulsiones parciales, mioclónicas y tónico-clónicas
Clonazepam	GABA	Ausencias típicas y atípicas Mioclónicas infantiles Convulsiones mioclónicas

FAE de amplio espectro	Mecanismo	Indicación
		Convulsiones acinéticas
Rufinamida	Canal de sodio	Tratamiento auxiliar de convulsiones parciales asociadas con síndrome de Lennox-Gastaut

Tabla 3. Ejemplos de FAE utilizados específicamente en la epilepsia infantil

FAE	Mecanismo	Indicación
Clobazam	GABA	Terapia auxiliar en convulsiones parciales complejas Estado epiléptico Mioclónicas Mioclónicas-ausente Simples parciales Complejas parciales Convulsiones de ausencia Síndrome de Lennox-Gastaut
Stiripentol	GABA	Epilepsia severa mioclónica en infancia (síndrome de Dravet)

5 Durante los últimos cuarenta años, se han realizado varios estudios en animales sobre el uso del cannabinoide cannabidiol no psicoactivo (CBD) para tratar las convulsiones. Por ejemplo, Consroe et al., (1982) determinó que el CBD podía prevenir las convulsiones en ratones después de la administración de fármacos proconvulsivos o una corriente eléctrica.

10 También se han realizado estudios en adultos epilépticos en los últimos cuarenta años con CBD. Cunha y col. informaron que la administración de CBD a ocho pacientes adultos con epilepsia generalizada dio lugar a una marcada reducción de las convulsiones en 4 de los pacientes (Cunha et al., 1980).

Un estudio en 1978 proporcionó 200 mg/día de CBD puro a cuatro pacientes adultos, dos de los cuatro pacientes quedaron libres de convulsiones, mientras que en el resto la frecuencia de las convulsiones no varió (Mechoulam y Carlini, 1978).

15 En contraste con los estudios descritos anteriormente, un estudio de etiqueta abierta informó que 200 mg/día de CBD puro fueron ineficaces para controlar las convulsiones en doce pacientes adultos institucionalizados (Ames y Cridland, 1986).

Basado en el hecho de que, cronológicamente, el último estudio que analizó la efectividad del CBD en pacientes con epilepsia sugirió que el CBD no pudo controlar las convulsiones, puede haber menos expectativas de que el CBD pueda ser útil como agente anticonvulsivo.

20 En los últimos cuarenta años de investigación, se han aprobado más de treinta medicamentos para el tratamiento de la epilepsia, ninguno de los cuales son cannabinoides. De hecho, parece haber existido un prejuicio contra los cannabinoides, posiblemente debido a la naturaleza programada de estos compuestos y/o al hecho de que el THC, que es un psicoactivo conocido, se ha designado como un provocador de convulsiones (Consroe et al., 1977).

25 Un artículo publicado recientemente sugirió que el cannabis enriquecido con cannabidiol puede ser eficaz en el tratamiento de la epilepsia. Porter y Jacobson (2013) informan sobre una encuesta a padres realizada a través de un grupo de Facebook que exploró el uso de cannabis enriquecido con CBD en niños con epilepsia resistente al tratamiento. Se encontró que dieciséis de los 19 padres encuestados informaron una mejoría en la epilepsia de sus hijos. Los niños encuestados para este artículo estaban tomando extractos de cannabis que supuestamente contenían CBD en una concentración alta, aunque en muchos de los casos no se conocía la cantidad de CBD presente y los otros componentes, incluido el THC y componentes no cannabinoides como los terpenos. De hecho, mientras que los niveles de CBD oscilaron entre 0.5 y 28.6 mg/kg/día (en los extractos analizados), se informaron niveles de THC tan altos como 0.8 mg/kg/día.

Un artículo de Gardener en 2013 describe que la compañía GW Pharma había solicitado una (aprobación para un) IND (nuevo fármaco en investigación) para tratar la epilepsia infantil con CBD.

35 El documento WO 2012/093255 describe el uso de CBD en combinación con fármacos antiepilépticos en el tratamiento de la epilepsia.

No es deseable proporcionar a los niños con TRE un extracto de cannabis que comprenda THC, que se ha descrito como un proconvulsivo (Consroe et al., 1977), en una dosis potencialmente psicoactiva de 0.8 mg/kg/día.

Si bien las decocciones de cannabis que contienen CBDA y THCA junto con otros cannabinoides y componentes no cannabinoides se han utilizado en la epilepsia, los tratamientos no se han centrado en CBDA aislado o altamente purificado. Más bien, el enfoque reciente se ha centrado en el uso de la forma descarboxilada de CBDA, CBD, en el tratamiento de la epilepsia.

- 5 El cannabinoide CBDA fue descrito por Rabinski en 2015 en un artículo de Internet titulado "Perfil de cannabinoides CBDA".

Sin embargo, se ha encontrado que CBDA es eficaz en el tratamiento de las náuseas como se muestra en el documento WO 2003/063847 y como un inhibidor de TNF alfa sugerido para usar en el tratamiento de afecciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias como se muestra en el documento WO 2002/064109.

- 10 La solicitud de patente GB 2,495,118 describe el uso de una composición que comprende CBDV y CBD para su uso en el tratamiento de la epilepsia. Además, la solicitud de patente WO 2011/121351 describe el uso de CBDV en el tratamiento de la epilepsia. Ambos documentos describen el uso de una sustancia farmacológica botánica de CBDV que comprende una pequeña cantidad de CBD sin carboxilar como CBDA. El CBDA está presente en cantidades muy pequeñas y, como tal, no está presente en cantidades terapéuticamente eficaces.

- 15 La solicitud de patente US 2015/126595 describe el uso de una composición transdérmica que comprende cannabinoides que incluyen CBDA.

- 20 Las solicitudes de patente CA 2,859,934 y CA 2,737,447 describen ambas un quimiovar de cannabis medicinal que comprende el compuesto CBDA. Se comprende fácilmente que todas las plantas de cannabis producen cannabinoides en su forma ácida que luego se descarboxilan fácilmente para producir CBD de forma activa tradicionalmente reconocida.

Si bien el CBD ahora parece ser un candidato prometedor como fármaco antiepiléptico, existen varias limitaciones potenciales que incluyen: las dosis relativamente grandes que parecen necesarias; y la biodisponibilidad relativamente baja del CBD.

- 25 Por lo tanto, es deseable encontrar otros compuestos que puedan demostrar actividad y/o especificidad para subtipos particulares de convulsiones y que puedan administrarse en concentraciones más bajas. Esto tiene el beneficio de formas de administración más pequeñas y con una biodisponibilidad mejorada puede ser necesaria una dosis más baja y el inicio de la acción puede ser más rápido.

Breve resumen de la divulgación

- 30 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido cannabidiólico (CBDA) para su uso en el tratamiento de la epilepsia, en el que el CBDA está en forma de extracto de cannabis altamente purificado, de modo que el CBDA está presente en más del 98% del extracto total (p/p) o se produce sintéticamente.

En una forma de realización, la epilepsia es epilepsia generalizada. Más preferiblemente, la epilepsia se caracteriza por convulsiones tónico-clónicas.

- 35 Una cantidad terapéuticamente eficaz es preferiblemente de al menos 0.1 mg, preferiblemente al menos 0.5 mg, más preferiblemente al menos 1 mg, más preferiblemente todavía al menos 20 mg o más.

Preferiblemente, los cannabinoides, tetrahidrocannabinol (THC) o ácido tetrahidrocannabinol (THCA), se han eliminado sustancialmente. Preferiblemente, el extracto altamente purificado comprende menos del 1% (p/p) de tetrahidrocannabinol (THC) o ácido tetrahidrocannabinólico (THCA).

- 40 El CBDA también se puede usar de forma concomitante con uno u otros más cannabinoides. Preferiblemente, el CBDA se usa con cannabidiol (CBD).

Cuando se usa CBDA en combinación con CBD, se prefieren proporciones entre 9:1 y 1:9 (CBDA:CBD). Los intervalos de relaciones incluyen de 8:2 a 2:8 (CBDA:CBD); 7:3 a 3:7 (CBDA:CBD); 6:4 a 4:6 (CBDA:CBD); y 1:1 (CBDA: CBD) y cualquier intervalo entre ellos.

- 45 En una forma de realización adicional de la invención, el CBDA se usa de forma concomitante con uno u otros más fármacos antiepilépticos (FAE).

El CBDA puede usarse en una dosis diaria de menos de 1000 mg. Preferiblemente, la dosis diaria de CBDA es de menos de 800 mg, preferiblemente menos de 600 mg y más preferiblemente menos de 400 mg.

La dosis diaria puede ser inferior a 200 mg, inferior a 100 mg y se pueden utilizar tan solo 10 mg o 1 mg.

- 50 Como el cannabinoide CBDA es más biodisponible que su forma neutra de CBD, es probable que se requiera una dosis mucho más baja de CBDA en comparación con CBD cuando se trate la misma indicación. Por ejemplo,

proporcionar a un ser humano una dosis de 20 mg/kg de CBD para tratar la epilepsia puede ser eficaz, mientras que la dosis de CBDA requerida puede ser un log de veces menor.

Claramente, estas dosis más bajas tienen beneficios en el tratamiento.

5 Además, la mayor biodisponibilidad del CBDA puede significar que puede actuar más rápidamente que el CBD. En otras palabras, el cannabinoide CBDA puede tener un  $T_{max}$  than CBD más bajo. Esta cualidad podría conducir a productos combinados útiles que comprenden CBDA en combinación con CBD. El CBDA puede ser útil para proporcionar un efecto de inicio rápido, mientras que el CBD puede ser útil para proporcionar un efecto sostenido.

Se prevén cantidades proporcionales de CBDA a CBD, donde el CBDA es el cannabinoide predominante, que incluyen intervalos de 95:5 a 55:45 (CBDA: CBD).

10 Alternativamente, el CBDA y el CBD pueden estar presentes en una cantidad sustancialmente igual, es decir, de 55:45 a 45:55 (CBDA: CBD). En otra forma de realización más, el CBD puede ser el cannabinoide predominante y el intervalo puede ser de 45:55 a 20:80 (CBDA: CBD).

15 Además, el CBDA de acción más rápida puede ser un candidato útil para su uso en el tratamiento de la epilepsia que requiere un tratamiento de emergencia inmediato, como convulsiones agudas o estado epiléptico. Preferiblemente, el CBDA se administra por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección en la vena o el músculo.

20 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para su uso en el tratamiento de la epilepsia que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido cannabidiólico (CBDA) y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en la cual el CBDA está en forma de un extracto de cannabis altamente purificado, de modo que el CBDA está presente en más del 98% del extracto total (p/p) o se produce sintéticamente.

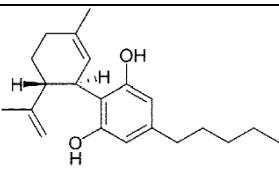
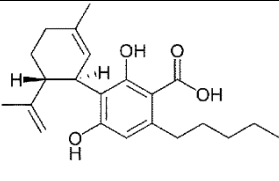
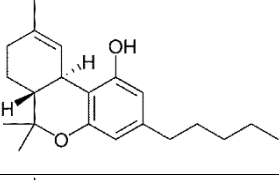
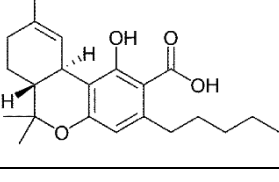
Se prevé que la composición se administre como uno o más de: una solución líquida oral, sólido, semisólido, gel, inyección, espray, aerosol, inhalador, vaporizador, enema o supositorio. Dichos medicamentos podrían administrarse por vía oral, bucal, sublingual, parenteral, respiratoria, nasal y distal del recto.

#### Definiciones

25 Las definiciones de algunos de los términos utilizados para describir la invención se detallan a continuación:

Los cannabinoides descritos en la presente solicitud se enumeran a continuación junto con sus abreviaturas estándar.

Tabla 4. Cannabinoides y sus abreviaturas

CBD	Cannabidiol	
CBDA	Ácido cannabidiólico	
THC	Tetrahydrocannabinol	
THCA	Ácido tetrahidrocanabinólico	

- 5 La tabla anterior no es exhaustiva y simplemente detalla los cannabinoides que se identifican en la presente solicitud como referencia. Hasta el momento, se han identificado más de 60 cannabinoides diferentes y estos cannabinoides se pueden dividir en diferentes grupos de la siguiente manera: Fitocannabinoides; Endocannabinoides y cannabinoides sintéticos (que pueden ser cannabinoides nuevos o fitocannabinoides o endocannabinoides producidos sintéticamente).
- La solicitud de patente número WO 2004/026857 describe el análisis de CBDA altamente purificado. El CBDA se describe como purificado para tener una pureza superior al 98%, con menos del 0.1% de CBD, 0.3% de THCA y menos del 0.1% de THC.
- 10 Los "fitocannabinoides" son cannabinoides que se originan en la naturaleza y se pueden encontrar en la planta de cannabis. Los fitocannabinoides pueden aislarse de plantas para producir un extracto altamente purificado o pueden reproducirse sintéticamente.
- 15 Los "extractos de cannabinoides altamente purificados" se definen como cannabinoides que se han extraído de la planta de cannabis y se han purificado en la medida en que otros cannabinoides y componentes no cannabinoides que se extraen conjuntamente con los cannabinoides se han eliminado sustancialmente, de modo que el cannabinoide altamente purificado es mayor o igual al 98% (p/p) puro.
- Los "cannabinoides sintéticos" son compuestos que tienen una estructura de cannabinoide o similar a cannabinoide y se fabrican utilizando medios químicos en lugar de (producirse) por la planta.
- Breve descripción de los dibujos
- 20 Las formas de realización de la invención se describen adicionalmente a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que
- La Figura 1 muestra la propuesta de la ILAE de terminología revisada para la organización de convulsiones y epilepsias 2010;
- Las Figuras 2A, B, C y D muestran el efecto de los cannabinoides en las convulsiones generalizadas inducidas por PTZ;
- 25 La Figura 3 muestra el efecto de CBDA en el crecimiento celular de *D. discoideum*;
- La Figura 4 muestra el efecto del CBD en el crecimiento celular de *D. discoideum*;
- La Figura 5 muestra gráficos secundarios para el efecto de CBDA y CBD en el crecimiento de *D. discoideum*; y
- La Figura 6 muestra las trazas mediante HPLC del extracto de CBDA del Ejemplo 3.
- Leyendas de las figuras
- 30 Figura 2: Los paneles AD ilustran el efecto de CBDA (10-100 mg/kg), CBD (100 mg/kg) y CBD + CBDA (proporción 9:1) en la gravedad de las convulsiones (A), porcentaje de mortalidad (B), porcentaje de animales que presentan convulsiones tónico-clónicas (C) y latencia hacia el inicio de las convulsiones (D). En el panel A, la gravedad media de las convulsiones está representada por una línea horizontal gris gruesa, los percentiles 25 y 75 por la caja negra y los bigotes indican los valores mínimo y máximo. En el panel D, la latencia de inicio se presenta como mediana con IQR. La prueba estadística se realizó usando un Kruskal-Wallis con pruebas U de Mann-Whitney post-hoc (panel A y D) o Chi-cuadrado con pruebas exactas de Fisher post-hoc (panel B y C):  $P \leq 0.1$  (#);  $P \leq 0.05$  (\*);  $P \leq 0.01$  (\*\*);  $P \leq 0.001$  (\*\*\*);  $n = 15$  por grupo.
- 35 Figura 3: El crecimiento se midió durante un período de siete días en presencia de CBDA en concentraciones que van desde 0.02  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ . Se usó un gráfico secundario de densidad celular a las 168 horas para calcular un IC50 de 0.30  $\mu\text{M}$ .
- 40 Figura 4: El crecimiento se midió durante un período de siete días en presencia de CBD (de GW Pharmaceuticals) en concentraciones que van desde 0.25  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ . Se usó un gráfico secundario de densidad celular a las 144 horas para calcular un IC50 de 1.63  $\mu\text{M}$ .
- Figura 5: Los cannabinoides tienen un orden de potencia de CBDA > CBD.
- 45 Figura 6: La sustancia activa botánica CBDA que se muestra en la traza de HPL comprendía un contenido de CBDA del 62.4% p/py otros cannabinoides medidos incluían CBD-6.9% (p/p), THC-0.7% (p/p) y cannabicromeno (CBC) - 0.5% (p/p).
- Descripción detallada
- Ejemplo 1: evaluación in vivo de CBDA en el modelo de pentilinetetrazoles agudos (PTZ) de convulsión generalizada

Materiales y procedimientos

Animales

5 Se utilizaron ratas Wistar Kyoto macho adultas en el modelo de convulsión PTZ aguda (> P24, 70-110 g). Los animales se alojaron cinco por jaula en una habitación con temperatura regulada (21 °C) en un ciclo día/noche de 12:12 h (luces encendidas a las 0800) con 50% de humedad y se les dio acceso ad libitum a comida de laboratorio estándar (PCD Mod C, Special Diet Services, Wiltham, Reino Unido) y agua. Todos los procedimientos se llevaron a cabo durante las horas de luz blanca.

Formulación farmacéutica

10 Se preparó una solución madre de PTZ (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) en NaCl al 0,9% p/v para el procedimiento experimental. Las reservas de CBD (número de lote, CBD-CG-1001; GW Pharmaceuticals, Salisbury, Reino Unido) y CBDA (número de lote, CBDA040912; GW Pharmaceuticals) se prepararon en un vehículo 2:1:17 de etanol, cremóforo y solución salina.

15 Se realizó un análisis de formulación para determinar si CBDA se descarboxilaba a CBD debido a la temperatura y/o los excipientes en la formulación. El análisis reveló que CBDA no se convirtió en CBD durante la formulación. Por lo tanto, el CBDA no se modificó durante la formulación y se puede utilizar una proporción de 2:1:17 en futuras investigaciones para este fitocannabinoide.

Modelo de convulsión generalizada inducida por PTZ

20 PTZ antagoniza la inhibición de GABA mediante la unión al sitio t-butil-biciclo-fosforotionato de los receptores GABAA. Además, este modelo inducido químicamente puede ser indicativo de efectos contra las crisis de ausencia. Se usó PTZ (90 mg/kg) para inducir convulsiones en ratas Wistar macho adultas (n=15 por grupo) con dosis experimentales aleatorizadas utilizando un diseño de cuadrado latino. Los animales se colocaron en sus tanques de metacrilato de 6 L y se dejaron aclimatar a su entorno durante 10 minutos, antes de recibir una de las dosis de cannabinoides (ver Tabla 5) en el vehículo, o una dosis de vehículo de volumen equivalente solo para servir como control negativo. 60 min después de la administración del compuesto de ensayo o del vehículo, se inyectó a los animales PTZ (90 mg/kg, i.p.) para inducir convulsiones y se registró el comportamiento del animal durante 30 min.

Tabla 5. Dosis de cannabinoides

	Dosis (mg/kg)	
	CBDA	CBD
Vehículo	-	-
CBDA	10	-
CBDA	50	-
CBDA	100	-
CBD	-	100
CBDA/CBD	10	90

Los videos de convulsiones inducidas por PTZ se puntuaron fuera de línea con una escala estándar de gravedad de las convulsiones apropiada para las convulsiones generalizadas (Tabla 6).

30 La dosis equivalente humana (HED) se puede estimar utilizando la siguiente fórmula: HED = dosis animal (mg/kg)

multiplicada por  $\frac{K_m \text{ Animal}}{K_m \text{ Humana}}$  La  $K_m$  para una rata es 6 y la  $K_m$  para un humano es 37.

La  $K_m$  para un perro (ejemplo 3) es 20.

35 Por tanto, una dosis de 10 mg/kg en una rata equivaldría a una dosis humana de aproximadamente 1.6 mg/kg. Una dosis de 50 mg/kg en una rata equivaldría a una dosis humana de aproximadamente 8.1 mg/kg. Una dosis de 100 mg/kg en una rata equivaldría a una dosis humana de aproximadamente 16.2 mg/kg.

Tabla 6. Escala de puntuación de la gravedad de las convulsiones.

Calificación de convulsión	Expresión conductual	Reflejo de enderezamiento
0	Sin cambios en conducta	Conservado
0.5	Conducta anormal (olisqueo, lavado excesivo, orientación)	Conservado
1	Tirones mioclónicos aislados	Conservado
2	Convulsión clónica atípica	Conservado
3	Clonus de miembros anteriores plenamente desarrollado	Conservado



Calificación de convulsión	Expresión conductual	Reflejo de enderezamiento
3.5	Clonus de miembros anteriores con componente tónico y torcedura de cuerpo	Conservado
4	Convulsión tónico-clónica con fase tónica suprimida	Perdido
5	Convulsión tónico-clónica plenamente desarrollada	Perdido

#### Análisis de los datos

5 Los videos de comportamiento convulsivo generados a partir del sistema de observación personalizado se puntuaron fuera de línea de acuerdo con escalas de convulsiones apropiadas para el modelo PTZ (Tabla 6) utilizando el software Observer Video-Pro (Noldus, Wageningen, Países Bajos). Para el modelo PTZ de convulsiones, se evaluaron las concordancias intra- e inter-observador de puntuación de comportamiento utilizando la función de análisis de confiabilidad del software Observer Video-Pro: ventana de tolerancia de 1 s; Coeficiente Kappa de Cohen  $\geq 0,95$ .

10 Se evaluaron marcadores específicos del comportamiento y desarrollo de las convulsiones y se compararon entre los grupos de control de vehículo y de fármaco. Se anotó la latencia (s) hacia el inicio de las convulsiones y el porcentaje de animales que desarrollaron convulsiones tónico-clónicas (véase Tabla 6). Además, se determinó la gravedad máxima de las convulsiones y el porcentaje de mortalidad en cada grupo para el modelo PTZ aguda de convulsiones generalizadas.

#### Análisis estadístico

15 El efecto del fármaco sobre la latencia hacia el inicio de las convulsiones y la gravedad máxima de las convulsiones se evaluó mediante Krustal-Wallis con pruebas U de Mann-Whitney post-hoc. Los efectos de los fármacos sobre el porcentaje de animales que desarrollaron convulsiones tónico-clónicas y el porcentaje de mortalidad se evaluaron utilizando Chi-cuadrado con pruebas exactas de Fisher post-hoc. En todos los casos,  $P \leq 0.05$  se consideró significativo.

#### Resultados

20 El objetivo del presente ejemplo fue examinar el potencial anticonvulsivo de CBDA en el modelo agudo de convulsión generalizada inducida por PTZ, con una dosis de CBD de comparación. Además, se incluyeron CBD y CBDA en una proporción de 9:1 para investigar posibles interacciones entre CBD y CBDA.

25 El tratamiento con cannabinoides redujo significativamente la gravedad de las convulsiones en el modelo de convulsión generalizada inducida por PTZ aguda (Figura 2. Panel A;  $H = 14.31$ ,  $P \leq 0.05$ ), donde 100 mg/kg de CBDA ( $P \leq 0.05$ ) y una relación CBD/CBDA ( $P \leq 5 0.05$ ) mostraron efectos anticonvulsivos significativos frente al control del vehículo.

La mortalidad se redujo significativamente (Figura 2. Panel B;  $X^2(6)=30.51$ ,  $P \leq 0.0001$ ) luego de la administración de 100 mg/kg de CBD ( $P \leq 0.01$ ) y una tendencia hacia una reducción significativa para 100 mg/kg de CBDA ( $P = 0.0656$ ) y una relación CBD/CBDA ( $P = 0.0656$ ).

30 El tratamiento con cannabinoides también redujo significativamente la incidencia de convulsiones tónico-clónicas (Figura 2. Panel C;  $X^2(6)=17.178$ ,  $P \leq 0.01$ ) donde la administración de 100 mg/kg de CBDA dio lugar a una tendencia hacia una reducción de las convulsiones tonicoclónicas ( $P \leq 0.1$ ).

35 Finalmente, el análisis reveló que la administración de cannabinoides afectó significativamente la latencia hacia el inicio de las convulsiones en el modelo inducido por PTZ (Figura 2. Panel D;  $H = 37.37$ ,  $P \leq 0.0001$ ), con 100 mg/kg de CBD ( $P \leq 0.05$ ), CBD/CBDA (relación 9:1;  $P \leq 0.05$ ) aumentando significativamente la latencia hacia el inicio. Mientras que CBDA (100 mg/kg) mostró una tendencia hacia el aumento de la latencia hacia el inicio de las convulsiones ( $P = 0.0929$ ).

#### Conclusiones

40 Como se predijo en estudios anteriores, el CBD ejerció efectos anticonvulsivos en este modelo de convulsión aguda generalizada y, por lo tanto, demuestra la validez continua del modelo para revelar los efectos anticonvulsivos de los cannabinoides vegetales.

Notablemente, en tres de los cuatro parámetros medidos, el CBDA produjo efectos anticonvulsivos significativos y fue estadísticamente más eficaz que el CBD a una dosis equivalente.

45 Por ejemplo, el Panel A de la Figura 2 describe el efecto de CBDA y CBD sobre la gravedad de las convulsiones. La puntuación media para la gravedad máxima de las convulsiones que experimentaron los animales con 100 mg/kg de CBDA fue 3 (Tabla 6 - clonus de extremidades anteriores bilateral completamente desarrollado, con reflejo de enderezamiento conservado) y la mediana para 100 mg/kg de CBD fue 5 (Tabla 6 - convulsiones tónico-clónicas

completamente desarrolladas, con pérdida del reflejo de enderezamiento). Esto muestra que CBDA pudo evitar que los animales sufrieran de tipos más severos de convulsión que CBD.

5 El panel C demuestra además que CBDA a 100 mg/kg pudo prevenir el desarrollo de convulsiones tónico-clónicas en más animales en comparación con CBD a 100 mg/kg. De hecho, los datos de 100 mg/kg de CBDA fueron los únicos datos estadísticamente significativos en este parámetro. Esto sugiere que CBDA será más eficaz que CBD para prevenir o tratar la epilepsia, especialmente si se desarrollan convulsiones tónico-clónicas.

10 La coadministración de CBDA con CBD, en una proporción ejemplar de 9:1, demostró que la combinación también era eficaz como anticonvulsivo. Dado que la planta produce naturalmente CBDA y este puede ser descarboxilado, esto abre la posibilidad de usar fitocannabinoides parcialmente descarboxilados o extractos de los mismos, en proporciones dadas. Estas proporciones pueden resultar beneficiosas por varias razones. Estos incluyen dirigirse a diferentes tipos de convulsiones, por ejemplo, CBD para las convulsiones parciales y CBDA para las convulsiones generalizadas pueden ser beneficiosos en función de sus diferentes actividades en modelos animales de epilepsia. Además, la diferencia en la lipofilia o la biodisponibilidad de los dos compuestos puede permitir el desarrollo de combinaciones con diferentes perfiles de liberación; por ejemplo, CBDA puede actuar más rápido que el CBD y ser más biodisponible que el CBD (véase el Ejemplo 3).

15 Este ejemplo demuestra por primera vez que el cannabinoide CBDA aislado o altamente purificado tiene efectos anticonvulsivos y, como tal, se justifica una investigación adicional en otros modelos de convulsiones y epilepsia para determinar el alcance total de su eficacia.

20 Para considerar si el CBD y el CBDA actúan mediante mecanismos similares y tienen una potencia similar, la solicitante realizó un estudio sobre un nuevo modelo de *Dictyostelium discoideum*.

Ejemplo 2: Uso del modelo de *Dictyostelium discoideum* para identificar objetivos moleculares de cannabinoides y su uso en epilepsia

#### Introducción

25 *Dictyostelium discoideum* es una ameba, catalogada por el Instituto Nacional de Salud de EE. UU. como un sistema modelo biomédico (Williams et al. 2006). Tiene una estructura celular típica de eucariotas, con núcleos, Golgi, mitocondrias y retículo endoplásmico y su genoma haploide ha sido completamente caracterizado y anotado (Dictybase.org) incluyendo descripciones de cada proteína, el fenotipo de mutantes que carecen de cada proteína y material publicado relacionado. *D. discoideum* se puede cultivar en cultivo líquido como células individuales o se puede permitir que progrese hacia el desarrollo multicelular tras la inanición con la formación de un cuerpo fructífero multicelular.

30 *D. discoideum* se ha desarrollado para comprender mejor los mecanismos moleculares mediante los cuales diversos fármacos y productos químicos ejercen sus efectos, para identificar compuestos más potentes o más seguros y caracterizar el papel celular de las proteínas humanas

35 Esta gama de metodologías ha permitido que *D. discoideum* se utilice como un modelo valioso en diversas áreas de la farmacología molecular y la farmacogenética. En estas áreas de investigación, el objetivo principal de los compuestos farmacéuticos, establecidos o nuevos, a menudo no está claro, y los compuestos a menudo tienen efectos secundarios fuera del objetivo que permanecen sin caracterizar, y que pueden dar lugar a un desgaste costoso del fármaco en la etapa tardía y potencialmente afectar el cumplimiento del paciente.

40 En la investigación de la epilepsia, *D. discoideum* se ha utilizado para identificar los efectos moleculares del ácido valproico (Cunliffe et al 2015; Chang et al. 2012) y se han traducido modelos de mamíferos *in vitro* e *in vivo* para demostrar su relevancia para la salud humana (Chang et al 2012, 2013, 2014). Está claro que *D. discoideum* se puede utilizar para identificar compuestos terapéuticos clínicamente relevantes para el tratamiento de la epilepsia.

El presente Ejemplo demuestra el uso de *D. discoideum* para identificar el o los mecanismos moleculares de acción de dos cannabinoides, (CBD y CBDA), con relevancia para el control de las convulsiones.

#### 45 Materiales y procedimientos

##### Ensayos de cultivo

50 Se cultivaron células de tipo silvestre (Ax2) de *D. discoideum* en cultivo con agitación (en medio HL5) durante dos días antes de los ensayos de cultivo. Se agregaron células (9900 en 495 µl de medio) a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se agregaron 5 µl de cannabinoide en DMSO (o solo DMSO) a cada pocillo para lograr cada concentración descrita (concentración final de DMSO al 1%), y las células se mantuvieron a 22°C. Las células se contaron a las 72 horas y luego cada 24 horas. Se utilizaron repeticiones por cuadruplicado para cada concentración.

##### Ensayos de desarrollo

5 Se cultivaron células de tipo silvestre (Ax2) de *D. discoideum* en cultivo con agitación HL5 durante dos días antes del ensayo de desarrollo. Las células se lavaron en regulador de pH de fosfato (KK2; regulador de pH de fosfato potásico de 20 mM, pH 6.1) y se extendieron  $1 \times 10^7$  células en filtros de nitrocelulosa (Millipore, Cork). Se colocaron almohadillas absorbentes (Millipore, Cork), divididas en cuartos, en placas de cultivo de 2 ml y se empaparon con 0.5 ml de KK2 que contenía los cannabinoides a 20  $\mu$ M. Se usó ácido valproico de 1 mM como control positivo mientras que KK2 que contenía DMSO al 1% se usó como control solo de disolvente. Los filtros de nitrocelulosa que contenían células se cortaron en cuartos y se colocaron sobre almohadillas absorbentes y se mantuvieron en un ambiente húmedo a 22°C durante 24 h. La morfología del cuerpo fructífero se registró utilizando un microscopio de disección y una cámara.

#### 10 Análisis bioinformático

15 La secuencia de aminoácidos para posibles objetivos proteicos de *H. sapien* de los cannabinoides enumerados se obtuvo de Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Las búsquedas de homología del genoma de *D. discoideum* se llevaron a cabo utilizando el algoritmo de búsqueda de alineación local básica (BLAST) en línea disponible en [dictybase.org](http://dictybase.org). El software de predicción de la región transmembrana V. 2.0 del servidor TMHMM se utilizó para determinar las posibles regiones transmembrana dentro de las proteínas ortólogas de *D. discoideum*. Las regiones de las proteínas que contienen residuos altamente conservados necesarios para la función de la proteína se analizaron mediante alineación de secuencias múltiples usando ClustalW2.

#### Selección de placa bacterial

20 Se prepararon placas de agar SM con la adición de CBDA o CBD a concentraciones finales de 12.3  $\mu$ M y 16.7  $\mu$ M respectivamente. Se extendió *R. planticola* muerta por calor (75°C durante 30 minutos) sobre las placas y se añadieron células -50 AX2 de tipo silvestre y se dejaron crecer a 22°C. Las placas se comprobaron periódicamente en busca de colonias.

#### Examen de la biblioteca de remi mutant

25 Las células de la biblioteca REMI se hicieron crecer en cultivo con agitación (en medio HL5) durante dos días antes del cribado. Se añadieron células (25,000 en 2 ml de medio) a cada pocillo de una placa de 6 pocillos y se dejaron adherir durante 20 minutos. El medio de cada pocillo se reemplazó con medio que contenía: 4.88  $\mu$ M de CBDA o 9.47  $\mu$  de CBD. Las células se cribaron por triplicado durante un período de tres semanas, se mantuvieron a 22°C reemplazando el medio cada dos días. Las colonias mutantes potencialmente resistentes se aislaron y se transfirieron a placas bacterianas. Se establecieron líneas celulares isogénicas a partir de colonias individuales en las placas bacterianas.

#### Confirmación de la resistencia mutante individual:

35 Las células clonales aisladas del cribado de la biblioteca se cultivaron en medio líquido (medio HL5) para producir una placa confluyente de 10 cm. Se agregaron células (10,000 en 495  $\mu$  de medio) a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se agregaron 5  $\mu$ l de cannabinoide en DMSO a cada pozo para lograr 4.88  $\mu$ M de CBDA o 9.47  $\mu$  de CBD (concentración final de DMSO al 1%), las células se mantuvieron a 22°C. Las células se controlaron durante una semana para determinar su sensibilidad a los dos cannabinoides.

#### Resultados

##### Ensayos de cultivo

40 Primero era necesario determinar si el cultivo de *D. discoideum* era sensible a los cannabinoides: ácido cannabidiólico (CBDA) y cannabidiol (CBD). En estos experimentos, *D. discoideum* se expuso a un intervalo de concentraciones de cada cannabinoide durante el crecimiento en cultivo inmóvil durante un período de una semana. Los dos cannabinoides inhibieron el cultivo celular de *D. discoideum* de una manera dependiente de la dosis (Figuras 3 a 5).

La constante inhibidora del cultivo (IC50) para CBDA fue 0.30  $\mu$ M (Figura 3), con 0.08  $\mu$ M inhibiendo significativamente el crecimiento celular ( $P < 0.05$ ) y 20  $\mu$ M bloqueando el crecimiento.

45 La constante inhibidora del crecimiento (IC50) para CBD fue 1.63  $\mu$ M (Figura 4), con 0.5  $\mu$ M inhibiendo significativamente el crecimiento celular ( $P < 0.05$ ) y 20  $\mu$ M bloqueando el crecimiento.

La comparación de los valores de CI50 de los dos cannabinoides sugiere que CBDA es el más potente, y que CBD muestra una reducción de 8.7 veces en la potencia. Por tanto, el orden de potencia de los cannabinoides en el cultivo celular de *D. discoideum* es CBDA > CBD (Figura 5).

##### 50 Ensayos de desarrollo

Se investigaron los efectos que CBDA y CBD tenían sobre el desarrollo de *D. discoideum*. Esto se logró colocando las células en un entorno con pocos nutrientes en presencia de CBDA o CBD a concentraciones que bloquean el crecimiento celular (20  $\mu$ M).

El desarrollo celular en un filtro de nitrocelulosa durante un período de 24 horas en ausencia de cannabinoides dio lugar a cuerpos fructíferos que consistían en cabezas de esporas mantenidas sobre sustratos por tallos. Se sabe que esta morfología del desarrollo está bloqueada por el ácido valproico (1 mM), un antiepiléptico ampliamente utilizado, donde las células pudieron agregarse, pero no pudieron desarrollarse para formar cuerpos fructíferos.

- 5 Por el contrario, las células de *D. discoideum* tratadas con CBDA o CBD (20µM) pudieron agregarse y desarrollarse para formar cuerpos fructíferos maduros.

#### Análisis bioinformático

10 Luego, se buscaron objetivos conocidos de CBDA y CBD en *H. sapiens* para identificar posibles ortólogos dentro del genoma de *D. discoideum*. A partir de la literatura actual, se han publicado 21 posibles objetivos mamíferos de CBDA y CBD. Utilizando secuencias de proteínas humanas correspondientes a cada objetivo potencial, en combinación con el análisis BLAST, se buscó el genoma de *D. discoideum* en busca de objetivos ortólogos. Con este enfoque, se identificaron 10 posibles ortólogos de *D. discoideum*. Basado en la similitud de la secuencia y el tamaño de las proteínas, y conservación de los sitios y motivos catalíticos, se han identificado tres proteínas para su posterior estudio:

15 1: Transportador equilibrante de nucleósidos 1 (ENT1). Esta proteína es un objetivo potencial para el CBD y desempeña un papel en el transporte de adenosina. *D. discoideum* tiene tres posibles ortólogos ENT1, y los tres tienen una estructura transmembrana múltiple putativa que se encuentra en la proteína de *H. sapiens*. Los tres ortólogos de *D. discoideum* tienen un tamaño de 522, 482 y 430 aa, similar a la proteína ENT1 de *H. sapiens* de 456 aa, y contienen un motivo altamente conservado ubicado dentro de la primera región transmembrana. Este motivo se encuentra dentro de esta proteína de muchas otras especies.

20 2: Monoacilglicérido lipasa alfa (MAGLa). Esta proteína está involucrada en el sistema endocannabinoide. *D. discoideum* tiene un posible ortólogo MAGLa. Este ortólogo tiene 409 aa, de tamaño similar a la proteína MAGLa de *H. sapiens* de 303 aa. Tanto la proteína de *D. discoideum* como la de *H. sapiens* tienen un residuo catalítico conservado de serina, aspartato e histidina que son importantes en la función enzimática y que se conservan ampliamente en muchas otras especies.

25 3: Diacilglicerol lipasa alfa (DAGLa). Esta proteína está involucrada en el sistema endocannabinoide. *D. discoideum* tiene tres posibles ortólogos. Los tres ortólogos de *D. discoideum* tienen un tamaño de 938, 856 y 826 aa, ligeramente más pequeños que la proteína DAGLa de *H. sapiens* de 1042 aa. Los tres ortólogos de *D. discoideum* tienen los mismos residuos conservados de serina y aspartato que son importantes en la función catalítica, y estos se conservan ampliamente en muchas otras especies.

#### 30 Selección de placa bacteriana

Se determinó si el crecimiento de *D. discoideum* sobre placas bacterianas de *R. planticola* era un procedimiento viable en el que se podían aislar células de biblioteca mutantes REMI resistentes. Se cultivaron células AX2 de tipo silvestre sobre placas de agar SM de *R. planticola* muertas por calor. Cada placa de agar SM contenía CBDA o CBD a una concentración final de 12.3 µM y 16.7 µM respectivamente. Después de la incubación durante 4 días, se evaluó la supervivencia celular (cultivo de colonias) en las placas. No se encontraron diferencias en el número de colonias para cada cannabinoide en comparación con el control (solo disolvente).

#### 35 Selección de biblioteca mutant REMI

Luego se identificaron mutantes dentro de la biblioteca que mostraban resistencia a los cannabinoides durante el crecimiento en cultivo líquido. Las células de la biblioteca se cultivaron durante un período de tres semanas en presencia de 4.88 µM de CBDA o 9.47 µ de CBD. Después de un período de dos semanas, las colonias de células parcialmente resistentes eran visibles en placas derivadas de bibliotecas. Las células parcialmente resistentes se transfirieron a placas bacterianas y se pasaron para asegurar que cada mutante fuera isogénico.

#### 40 Confirmación de la resistencia mutante individual

Se confirmó la resistencia de cada línea celular. Todas las líneas celulares se trataron con: CBDA o CBD a una concentración final de 4.88 µM y 9.47 µM respectivamente y se evaluaron después de una semana. Las líneas celulares isogénicas mostraron cierta superposición de resistencia a los diferentes cannabinoides. Se demostró que las células mutantes tienen 3 fenotipos básicos para cada cannabinoide, clasificados como sin resistencia, resistencia débil o resistencia parcial. También se descubrió que las células mutantes tienen resistencia a un cannabinoide o a varios cannabinoides.

#### 50 Conclusiones

El desarrollo de cannabinoides como tratamientos terapéuticos novedosos para la epilepsia ofrece un nuevo y apasionante campo de investigación, con un potencial real para mejorar la salud. Una comprensión completa de los mecanismos de acción y la potencia relativa de estos compuestos es esencial para el desarrollo terapéutico, para comprender cómo los compuestos bloquean las convulsiones y posibles efectos secundarios. Los enfoques

tradicionales para identificar estos mecanismos son muy complejos y lentos. Como enfoque alternativo, se ha utilizado *D. discoideum* para identificar el mecanismo de un tratamiento ampliamente utilizado, el ácido valproico, que se ha verificado en modelos in vivo de mamíferos.

5 En este estudio actual, se ha demostrado que dos cannabinoides, CBDA y CBD bloquean el crecimiento de *D. discoideum*. Las concentraciones que afectan el crecimiento están en el intervalo bajo de  $\mu\text{M}$  y son equivalentes a las concentraciones que se ha demostrado que son anticonvulsivas en modelos animales de convulsiones. Esto sugiere que los objetivos para los dos cannabinoides están presentes en el genoma de *D. discoideum*. Esto también sugiere que los objetivos de *D. discoideum* tienen una sensibilidad similar a los cannabinoides que se muestra en modelos de mamíferos.

10 El efecto inhibitor del crecimiento puede emplearse luego en una selección imparcial para identificar estos cannabinoides objetivos. Usando una biblioteca de mutantes de inserción, se puede cultivar un grupo de mutantes en presencia de cada cannabinoide durante un período de 21 días. Es probable que los mutantes con inserciones en genes que codifican objetivos de cannabinoides muestren resistencia a esta inhibición del crecimiento y, por lo tanto, superen a las células sensibles durante el cribado. La identificación de genes inactivados por inserción en colonias resistentes a cannabinoides identificará los objetivos moleculares (y el mecanismo) de estos cannabinoides en un enfoque imparcial. Este enfoque de cribado en *D. discoideum* se ha utilizado para identificar objetivos y mecanismos de una variedad de compuestos.

20 *D. discoideum* también se usa ampliamente como modelo de desarrollo, donde la formación de un cuerpo fructífero implica agregación y diferenciación celular. Los estudios farmacológicos han utilizado este proceso de desarrollo para identificar los mecanismos de los fármacos. En relación con los cannabinoides estudiados aquí, los dos compuestos no tuvieron ningún efecto sobre el desarrollo de *D. discoideum*, en concentraciones que se ha demostrado que bloquean el crecimiento. En primer lugar, esto sugiere que el bloqueo en el crecimiento de *D. discoideum* no es tóxico, ya que las células pueden desarrollarse y, por lo tanto, es probable que los objetivos cannabinoides estén involucrados en el bloqueo del crecimiento o división celular (citocinesis). Esto también sugiere que el desarrollo de *D. discoideum* no se puede utilizar para estudiar más a fondo estos compuestos. En combinación con un enfoque imparcial para identificar objetivos cannabinoides, *D. discoideum* también proporciona un modelo útil para investigar objetivos mamíferos conocidos.

Se encontró que un total de 25 líneas celulares mutantes mostraron resistencia a la inhibición del crecimiento. La variedad de fenotipos resistentes a diferentes cannabinoides sugiere que hay múltiples genes involucrados

30 Ejemplo 3

Comparación de datos PK para CBD y CBDA a partir de estudios toxicológicos en perros

El objetivo de los estudios fue determinar la toxicidad del CBD (en forma de un compuesto sustancialmente puro - más del 95% de pureza) y CBDA (en forma de una sustancia farmacéutica botánica - más del 60% de CBDA p/p del extracto total y más del 85% p/p del contenido total de cannabinoides) después de la administración oral diaria (sonda) al perro.

35 Este estudio fue diseñado para cumplir con los requisitos conocidos de la Directiva europea 2001/83/EC y todas las enmiendas posteriores junto con cualesquiera directrices de la Conferencia sobre Armonización (ICH).

Se tomaron muestras de sangre para toxicocinética (0,5 ml nominal) de todos los animales el día 1 a las 0.5, 1, 2, 4, 6 y 24 horas después de la dosificación de 100 mg/kg de CBD o CBDA a los animales.

40 Se tomaron muestras de la vena yugular en heparina de litio. Las muestras se mezclaron suavemente a mano y luego continuamente durante al menos 2 minutos en un mezclador automático y se colocaron en un Kryorack hasta la centrifugación, que se llevó a cabo a aproximadamente 4°C tan pronto como fue posible. El plasma resultante se separó en condiciones de poca luz, se transfirió a viales de vidrio transparente etiquetados de forma única, se colocó en cajas a prueba de luz y se congeló inmediatamente a  $\leq -50^\circ\text{C}$ .

45 Los parámetros toxicocinéticos medidos incluyeron  $C_{\text{max}}$  (ng/mL),  $T_{\text{max}}$ (h) y  $\text{AUC}_{0-t}$  (h \* ng/mL) y los resultados se ilustran en la Tabla 7 para CBDA, Tabla 8 para CBD (machos), Tabla 9 para CBD (hembras) y la  $C_{\text{max}}$  y  $\text{AUC}_{0-t}$  comparativas se muestran en la Tabla 10 para los machos y la Tabla 11 para las hembras.

Resultados

Tabla 7

Parámetros toxicocinéticos promedio de CBDA se presentan a continuación:							
	Período	n=3					
		Parámetro <sup>a</sup> Dosis de CBDA BDS (mg CBDA/kg/día)					
		50		100		200	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	Día 1	55600	149000	80500	179000	269000	172000

Parámetros toxicocinéticos promedio de CBDA se presentan a continuación:							
AUC <sub>0-t</sub> (h. ng/mL)	Período	n=3					
		Parámetro <sup>a</sup> Dosis de CBDA BDS (mg CBDA/kg/día)					
		50		100		200	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
	Día 28	71600	64100	116000	159000	94700	156000
C <sub>max</sub> (ng/mL)	Día 1	19100	21100	24900	38600	35000	27100
	Día 28	15700	15000	23400	32500	17700	35900
T <sub>max</sub> (h)	Día 1	1	3	1.3	1.7	2.7	1.7
	Día 28	1.7	2	1.5	1.7	9	1.3

<sup>a</sup> -Resultados se informan como promedio a menos que se indique de otra manera

Tabla 8

Sujeto	C <sub>max</sub> (ng/mL)	t <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)	AUC <sub>0-inf</sub> (h*ng/mL)	AUC <sub>ex</sub> (%)	CL/F (mL/min/kg)	V <sub>z</sub> /F (L/kg)
15	4570	6.0	7.7	51800	60500	14.3	27.5	18.4
16	3620	4.0	5.4	33000	35400	6.8	47.1	21.9
17	1400	6.0	8.5	17200	20300	15.1	82.1	60.5
18	2430	4.0	5.7	28700	31100	7.9	53.6	26.2
19	3090	8.0	n.d.	26400	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	3960	6.0	8.6	47300	55300	14.5	30.1	22.3
N	6	6	5	6	5	5	5	5
Promedio	3180	n.d.	7.2	34100	40500	11.7	48.1	29.9
DE	1140	n.d.	1.5	13100	16900	4.0	22.0	17.3
Min	1400	4.0	5.4	17200	20300	6.8	27.5	18.4
Mediana	3360	6.0	7.7	30800	35400	14.3	47.1	22.3
Max	4570	8.0	8.6	51800	60500	15.1	82.1	60.5
Media geométrica	2970	n.d.	7.0	31900	37600	11.1	44.4	27.0
CV% media geométrica	44.8	n.d.	23	42.2	46.9	39.6	46.9	49.5

Tabla 9

Sujeto	C <sub>max</sub> (ng/mL)	t <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)	AUC <sub>0-inf</sub> (h*ng/mL)	AUC <sub>ex</sub> (%)	CL/F (mL/min/kg)	V <sub>z</sub> /F (L/kg)
115	655	2.0	8.4	3000	3280	8.7	508	367
116	2520	2.0	6.6	20000	22400	10.6	74.5	42.9
117	1900	8.0	n.d.	22600	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
118	411	1.0	4.5	2540	2640	3.7	632	247
119	3270	8.0	n.d.	32400	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
120	3780	6.0	4.7	31300	32800	4.5	50.8	20.8
N	6	6	4	6	4	4	4	4
Promedio	2090	n.d.	6.1	18600	15300	6.9	316	169
DE	1370	n.d.	1.8	13200	14800	3.3	297	167
Min	411	1.0	4.5	2540	2640	3.7	50.8	20.8
Mediana	2210	4.0	5.7	21300	12800	6.6	291	145
Max	3780	8.0	8.4	32400	32800	10.6	632	367
Media geométrica	1590	n.d.	5.9	12300	8930	6.3	187	94.8
CV% media geométrica	113	n.d.	30	172	208	54.2	208	238

Tabla 10

	CBDA (100mg/kg)	CBD (100mg/kg)
C <sub>max</sub>	24,900	3180
AUC <sub>0-t</sub>	80,500	34,100

Tabla 11

	CBDA (100mg/kg)	Nivel de CBD (100mg/kg)
C <sub>max</sub>	38,600	2090ng/mL
AUC <sub>0-t</sub>	179,000	18,600 ng/mL*hr

## Conclusiones:

De las Tablas comparativas 10 y 11 será evidente que una cantidad equivalente de CBDA a CBD da como resultado valores de C<sub>max</sub> y AUC<sub>0-t</sub> que son muy significativamente más altos (en un orden de magnitud) que los de CBD, lo que sugiere que el CBDA está actuando más rápidamente y es más biodisponible que el CBD. Esto tiene importantes implicaciones/beneficios cuando se trata de tratar a los pacientes.

## Conclusión general

Para resumir, los datos presentados en los ejemplos 1, 2 y 3 demuestran que:

CBDA tiene efectos anticonvulsivos en un modelo de epilepsia de mamífero y es eficaz en el tratamiento de convulsiones generalizadas, más particularmente, convulsiones tónico-clónicas. De hecho, este compuesto parece más eficaz que el CBD en muchos de los parámetros probados.

CBDA es significativamente más potente que CBD tras el cultivo de *D. discoideum*; y CBDA actúa más rápidamente y es más biodisponible que CBD.

Estos hallazgos son de gran importancia ya que demuestran que CBDA ofrece un anticonvulsivo alternativo al CBD. El hallazgo de que el CBDA es más potente y más biodisponible que el CBD significa que se puede usar una dosis diaria más pequeña del ingrediente activo en el tratamiento de la epilepsia. A este respecto, del ejemplo 3 parece que se podrían usar dosis de menos de 400 mg y posiblemente dosis tan pequeñas como de 1 mg a 100 mg para tratar sujetos humanos basándose en los datos de PK y AUC<sub>0-t</sub> del ejemplo 3. En este sentido, un paciente adulto típico podría pesar 60 kg y, por lo tanto, una dosis diaria para dicho paciente podría ser de 0.016 mg/kg a 1.6 mg/kg.

## Referencias:

Ames FR y Cridland S (1986). "Efectos anticonvulsivos del cannabidiol." S Afr Med J 69: 14.

Chang, P. et al. "El fármaco antiepiléptico ácido valproico y otros ácidos grasos de cadena media reducen de forma aguda los niveles de fosfoinositido independientemente del inositol en Dictyostelium." Dis. Modelo. Mech. 5.1 (2012): 115-24.

Chang, P. et al. "Control de las convulsiones mediante ácidos grasos de cadena media asociados a la dieta cetogénica." Neurofarmacología 69 (2013): 105-14.

Chang, P., M. C. Walker y R. S. Williams. "Reducción inducida por convulsiones en niveles de PIP3 contribuye a la actividad convulsiva y es rescatada por el ácido valproico." Neurobiol. Dis. 62 (2014): 296-306.

Consroe P, Martin P, Eisenstein D. (1977). "Antagonismo de fármacos anticonvulsivos de las convulsiones inducidas por delta-9-tetrahidrocannabinol en conejos." Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 16:1-13

Consroe P, Benedicto MA, Leite JR, Carlini EA, Mechoulam R. (1982). "Efectos del cannabidiol sobre las convulsiones conductuales causadas por fármacos convulsivos o corriente en ratones." Eur J Pharmacol. 83: 293-8

Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimental C, Gagliardi R et al. (1980). "Administración crónica de cannabidiol a voluntarios sanos y pacientes epilépticos." Pharmacology. 21:175-85

Cunliffe, Baines, Giachello, Lin, Morgan, Reuber, Russell, Walker y Williams Epilepsia "Actualización de procedimientos de investigación: comprensión de las causas de las convulsiones epilépticas e identificación de nuevos tratamientos utilizando organismos modelo no mamíferos". Seizure: European Journal of Epilepsy. 24C (2015):44-51.

Eadie, MJ (diciembre de 2012). "Deficiencias en el tratamiento actual de la epilepsia." Expert Review of Neurotherapeutics 12 (12): 1419-27.

Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Hauser WA, Mathern G, Moshe SL, Perucca E, Wiebe S, French J. (2009) "Definición de epilepsia farmacorresistente: propuesta de consenso del Grupo de Trabajo ad hoc de la Comisión ILAE de Estrategias Terapéuticas." Epilepsia.

Mechoulam R y Carlini EA (1978). "Hacia fármacos derivados de cannabis". Die Naturwissenschaften 65: 174-9.

Porter BE, Jacobson C (diciembre de 2013). "Informe de una encuesta de padres sobre el uso de cannabis enriquecido con cannabidiol en la epilepsia resistente al tratamiento pediátrico" Epilepsy Behaviour. 29(3) 574-7

Thurman, DJ; Beghi, E; Begley, CE; Berg, AT; Buchhalter, JR; Ding, D; Hesdorffer, DC; Hauser, WA; Kazis, L; Kobau, R; Kroner, B; Labiner, D; Liow, K; Logroscino, G; Medina, MT; Newton, CR; Parko, K; Paschal, A; Preux, PM; Sander, JW; Selassie, A; Theodore, W; Tomson, T; Wiebe, S; Comisión de Epidemiología de la ILAE (septiembre de 2011). "Normas para estudios epidemiológicos y vigilancia de la epilepsia." *Epilepsia*. 52 Supl. 7: 2-26

- 5 Williams, R. S. et al. "Hacia una comprensión molecular de las enfermedades humanas utilizando *Dictyostelium discoideum*." *Trends Mol. Medicina*. 12.9 (2006): 415-24.



**REIVINDICACIONES**

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido cannabidiólico (CBDA) para su uso en el tratamiento de la epilepsia, en la que CBDA está en forma de extracto de cannabis altamente purificado, de modo que el CBDA está presente en más del 98% del extracto total (p/p) o se produce sintéticamente.
- 5 2. Una cantidad terapéuticamente eficaz de CBDA para su uso según la reivindicación 1, en la que la epilepsia es una epilepsia generalizada.
3. Una cantidad terapéuticamente eficaz de CBDA para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la epilepsia se caracteriza por convulsiones tónico-clónicas.
- 10 4. Una cantidad terapéuticamente eficaz de CBDA para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz es de al menos 0.1 mg.
5. Una cantidad terapéuticamente eficaz de CBDA para su uso según la reivindicación 1, en la que el extracto altamente purificado comprende menos del 1% (p/p) de tetrahidrocannabinol (THC) o ácido tetrahidrocannabinólico (THCA).
- 15 6. Una cantidad terapéuticamente eficaz de CBDA para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CBDA se usa de forma concomitante con uno o más de otros cannabinoides.
7. Una cantidad terapéuticamente eficaz de CBDA para su uso según la reivindicación 6, en la que el CBDA se usa con cannabidiol (CBD).
8. Una cantidad terapéuticamente eficaz de CBDA para su uso según la reivindicación 7, en la que la relación CBDA: CBD está en el intervalo de 9:1 a 1:9 (CBDA: CBD).
- 20 9. Una cantidad terapéuticamente eficaz de CBDA para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CBDA se usa de forma concomitante con uno o más de otros fármacos antiepilépticos (FAE).
10. Una cantidad terapéuticamente eficaz de CBDA para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el CBDA se usa en una dosis de menos de 400 mg.
- 25 11. Una cantidad terapéuticamente eficaz de CBDA para usar según la reivindicación 10, en la que el CBDA se usa en una dosis de 1 mg a 100 mg.
12. Una composición para su uso en el tratamiento de la epilepsia que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido cannabidiólico (CBDA) y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en la que el CBDA está en forma de un extracto de cannabis altamente purificado, de modo que el CBDA está presente en más del 98% del extracto total (p/p) o se produce sintéticamente.
- 30 13. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, que está formulada para administración como solución líquida oral, sólido, semisólido, gel, espray, aerosol, inhalador, vaporizador, enema o supositorio.

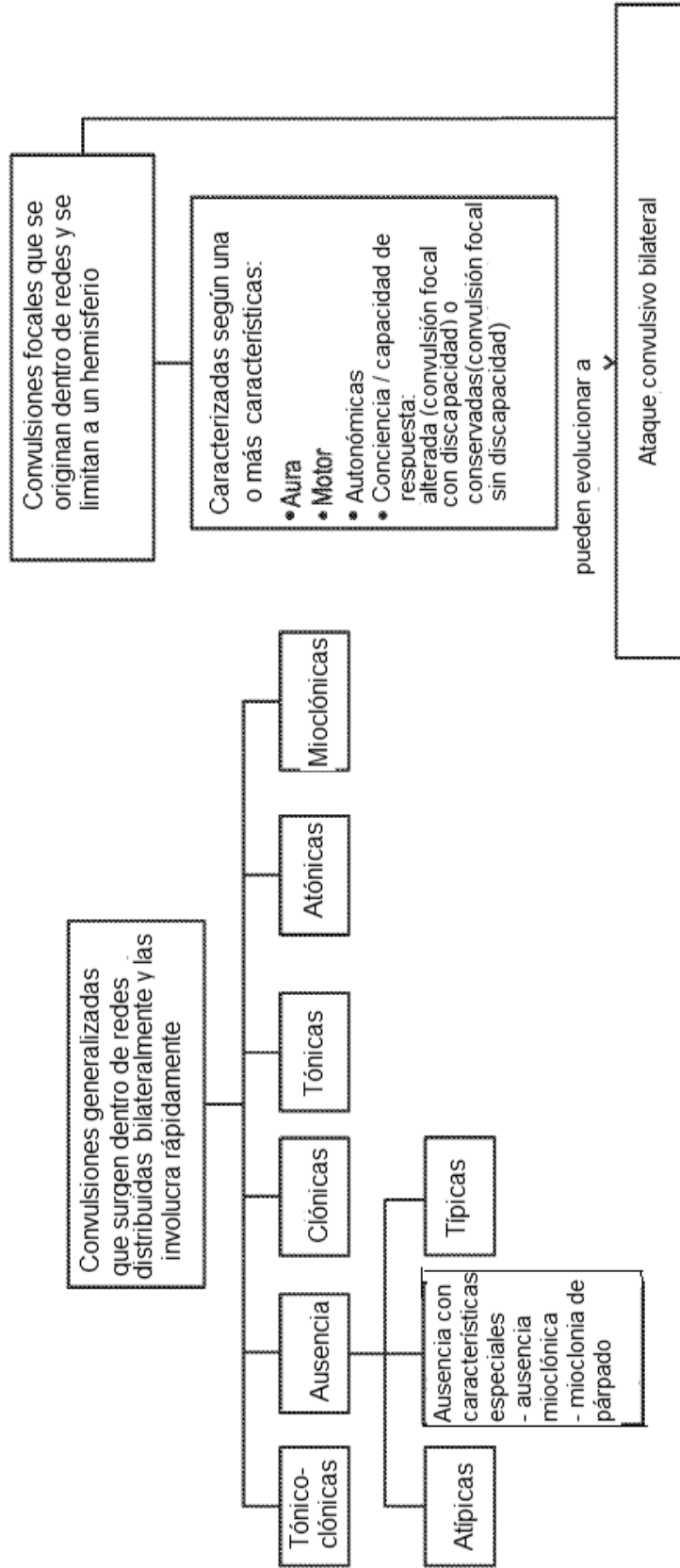


Fig. 1

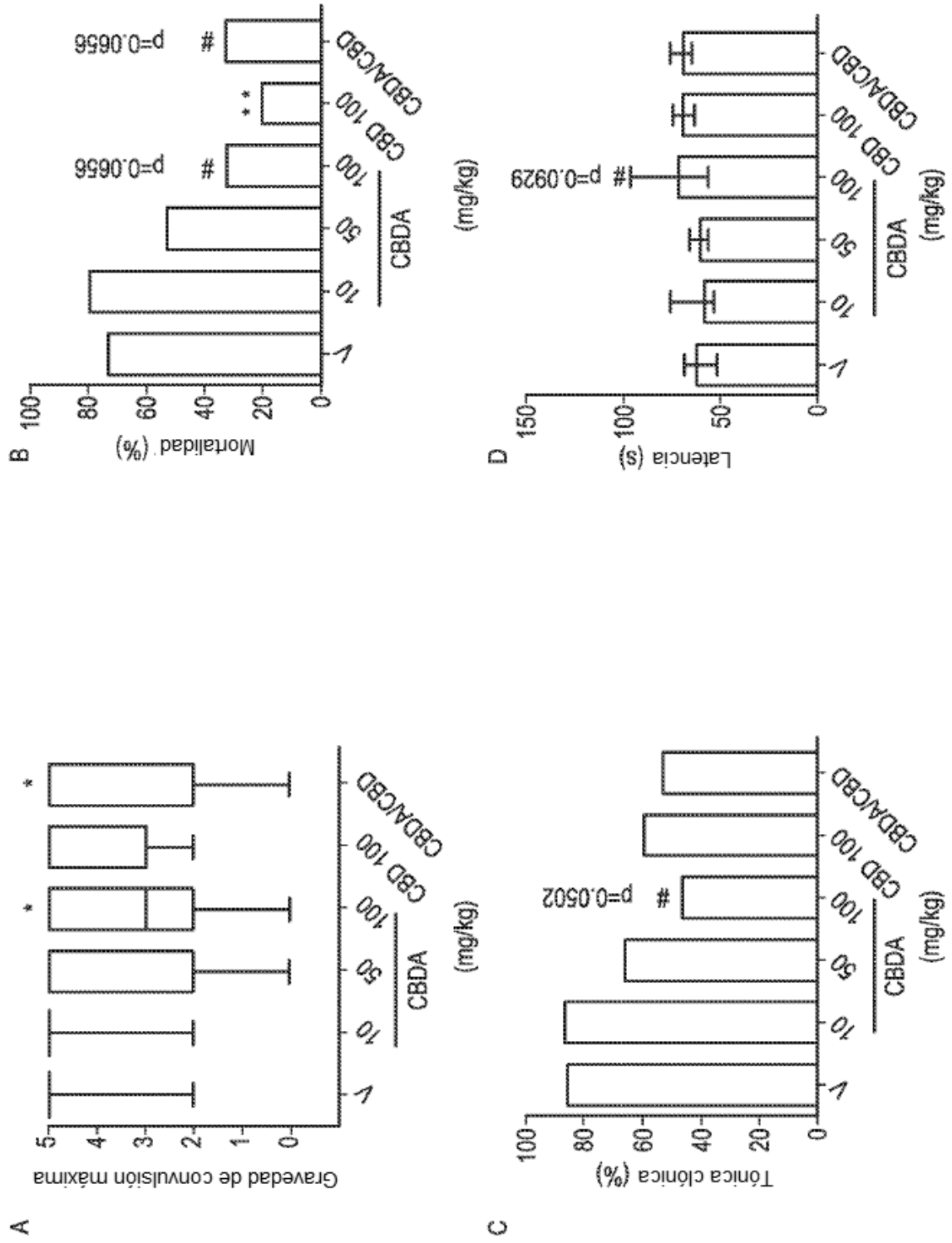


Fig. 2

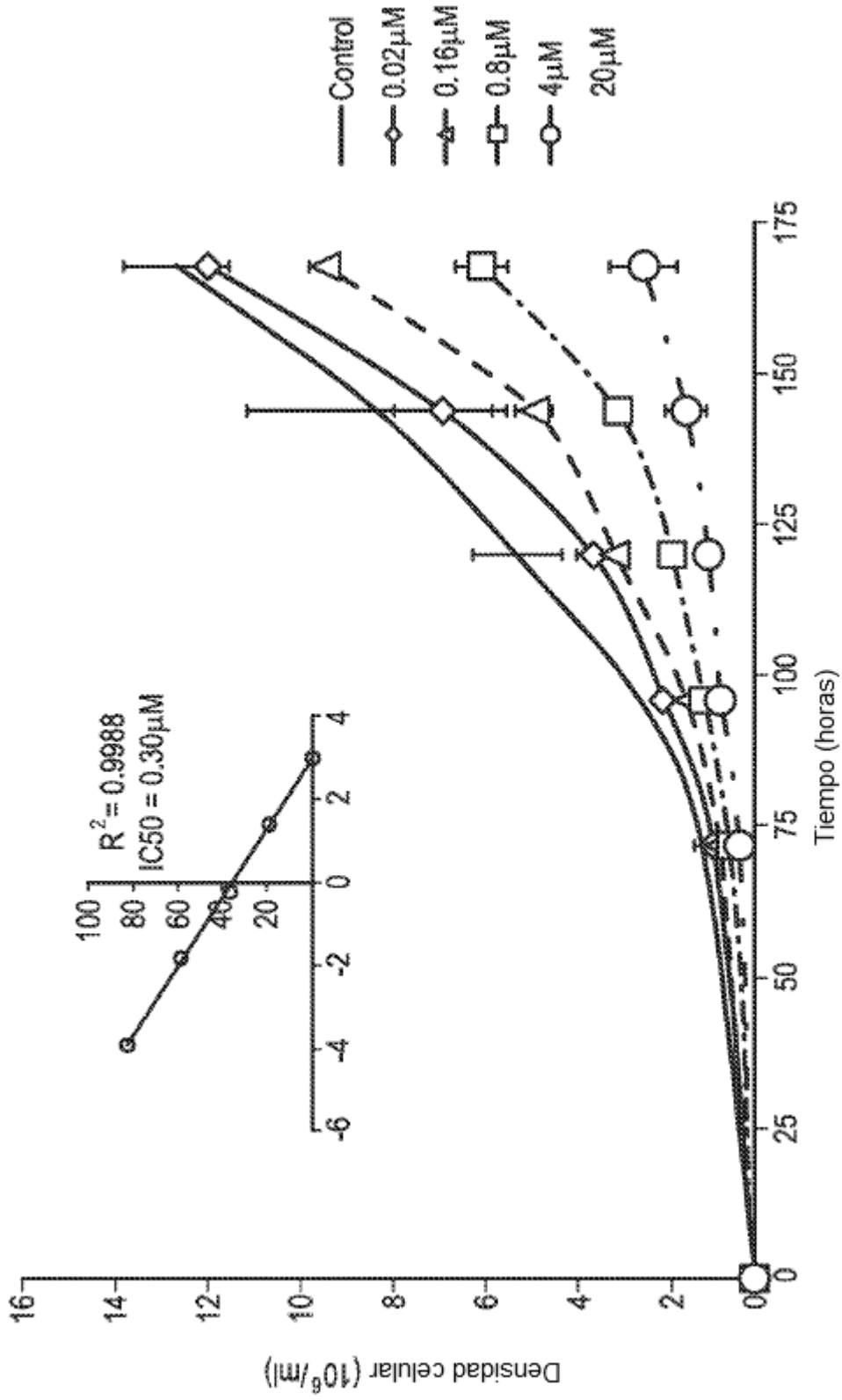


Fig. 3

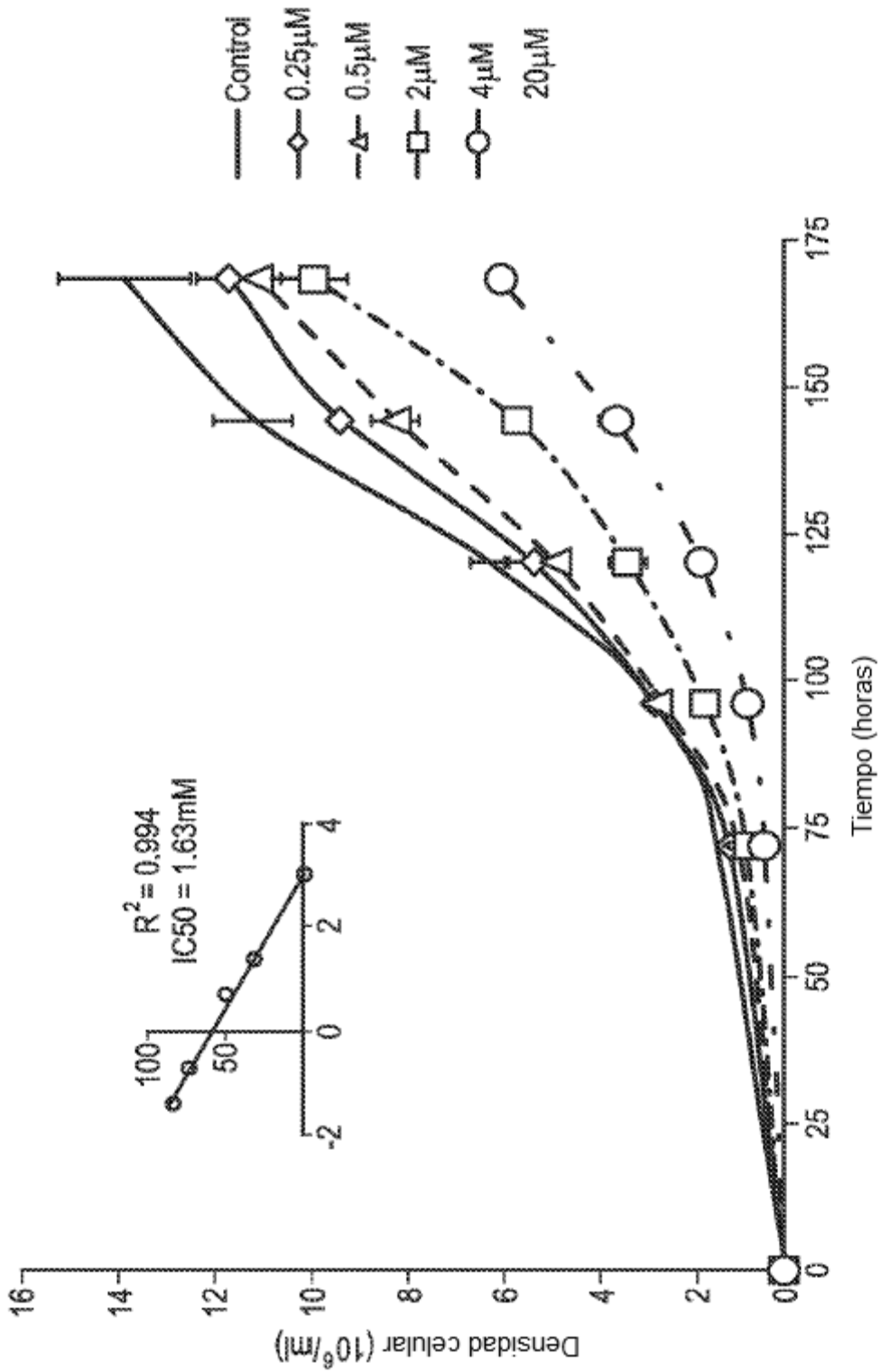


Fig. 4

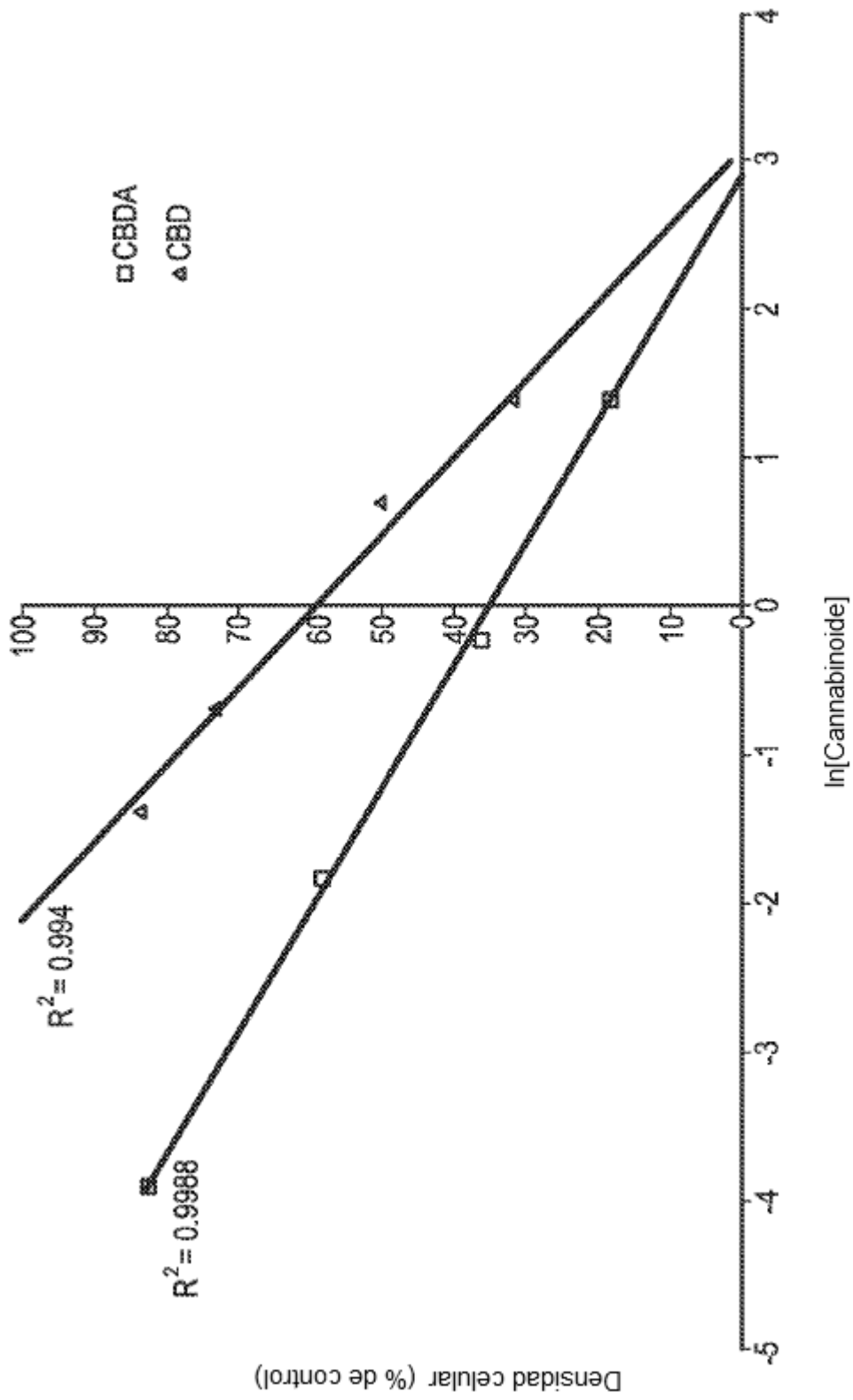


Fig. 5

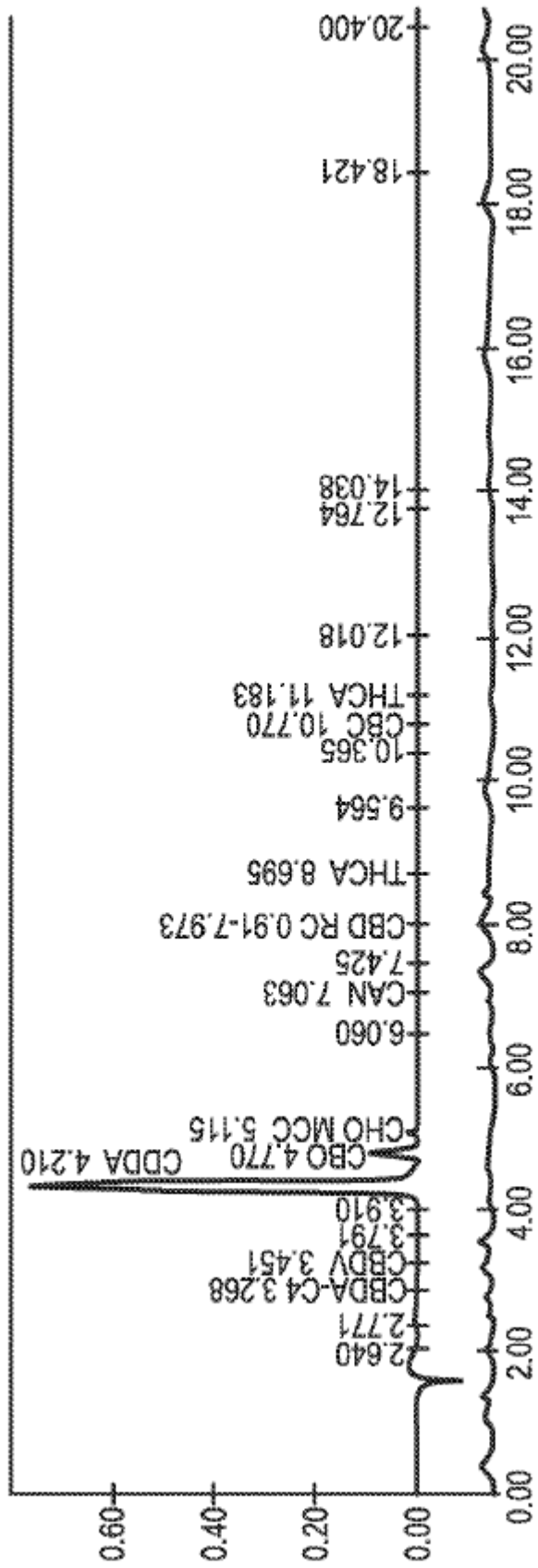


Fig. 6