



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109963595 B

(45) 授权公告日 2023. 02. 03

(21) 申请号 201780071100.5

(22) 申请日 2017.10.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109963595 A

(43) 申请公布日 2019.07.02

(30) 优先权数据
62/406,764 2016.10.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.05.16

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/055989 2017.10.10

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/071452 EN 2018.04.19

(73) 专利权人 GBS全球生物制药公司
地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 A·斯马尔-霍华德 H·特纳

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

专利代理师 陈文平 徐志明

(51) Int.Cl.

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/015 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2016/0250270 A1, 2016.09.01

US 2014/0287068 A1, 2014.09.25

审查员 张萌迪

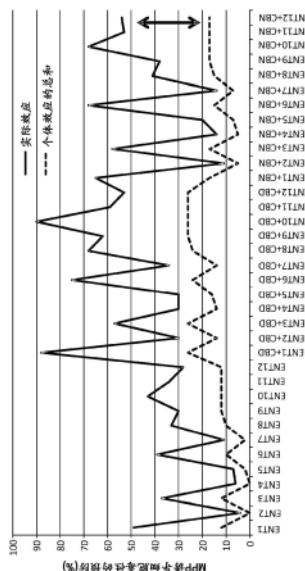
权利要求书3页 说明书19页 附图10页

(54) 发明名称

用于治疗神经退行性疾病的含有大麻素的复合混合物

(57) 摘要

本文提供了适合用作活性药物成分的含大麻素的复合混合物。该复合混合物包含至少第一主要大麻素、至少第一次要大麻素和任选地至少第一选择萜烯。还提供了制备复合混合物的方法,包含该复合混合物的药物组合物,以及使用该药物组合物用于治疗神经变性疾病(包括阿尔茨海默病、帕金森病、路易体痴呆或亨廷顿病)的方法。



1. 一种药物活性成分,其包含:
至少三种次要大麻素,其中该至少三种次要大麻素包括次大麻二酚、大麻环萜酚和大麻萜酚;和
至少五种选择萜烯,其中该至少五种选择萜烯包括柠檬烯、芳樟醇、橙花叔醇、松萜和叶绿醇,
其中所述药物活性成分用于治疗帕金森病。
2. 如权利要求1所述的活性成分,其中所述药物活性成分还包含第一主要大麻素,其为大麻二酚(CBD)。
3. 如权利要求1所述的活性成分,其中所述药物活性成分还包含第一主要大麻素,其为大麻酚(CBN)。
4. 如权利要求1所述的活性成分,其中所述活性成分基本上不含THC。
5. 如权利要求2或3所述的活性成分,其中所述主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成所述活性成分重量的至少75%。
6. 如权利要求5所述的活性成分,其中所述主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成所述活性成分重量的至少80%。
7. 如权利要求6所述的活性成分,其中所述主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成所述活性成分重量的至少85%。
8. 如权利要求7所述的活性成分,其中所述主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成所述活性成分重量的至少90%。
9. 如权利要求8所述的活性成分,其中所述主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成所述活性成分重量的至少95%。
10. 如权利要求9所述的活性成分,其中所述活性成分中除主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯外的所有化合物均可从大麻中提取。
11. 如权利要求5所述的活性成分,其中
所述主要大麻素共同构成所述活性成分重量的5-40%;
所述次要大麻素共同构成所述活性成分重量的5-70%;和
所述选择萜烯共同构成所述活性成分重量的5-70%。
12. 如权利要求11所述的活性成分,其中
所述主要大麻素共同构成所述活性成分重量的10-35%;
所述次要大麻素共同构成所述活性成分重量的30-70%;和
所述选择萜烯共同构成所述活性成分重量的5-50%。
13. 一种制备权利要求1的药物活性成分的方法,其中包括以任何顺序混合以下的步骤:
至少三种次要大麻素,其中该至少三种次要大麻素包括次大麻二酚、大麻环萜酚和大麻萜酚;和
至少五种选择萜烯,其中该至少五种选择萜烯包括柠檬烯、芳樟醇、橙花叔醇、松萜和叶绿醇。
14. 如权利要求13所述的方法,其中所述方法还包括混合将选自大麻二酚(CBD)和大麻酚(CBN)的第一主要大麻素与所述至少三种次要大麻素和所述至少五种选择萜烯混合,其

中所述第一主要大麻素、所述次要大麻素和所述选择萜烯的至少一种添加到大麻提取物中。

15. 如权利要求14所述的方法,还包括测量所述大麻提取物中主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯各自的浓度的在先步骤。

16. 如权利要求14所述的方法,其中添加所述第一主要大麻素、所述次要大麻素或所述选择萜烯中的至少一种以在所述活性成分中达到预定浓度。

17. 如权利要求14所述的方法,还包括制备所述大麻提取物的在先步骤。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述大麻提取物从株系选择为最接近所述活性成分的预定组成大麻株系制备。

19. 如权利要求1-12中任一项所述的活性成分,其通过权利要求13-18中任一项所述的方法产生。

20. 一种药物组合物,其包含权利要求1-12和19中任一项所述的活性成分以及药学上可接受的载体或稀释剂。

21. 如权利要求20所述的药物组合物,其中所述组合物是油。

22. 如权利要求20所述的药物组合物,其中所述组合物是乳液。

23. 如权利要求20所述的药物组合物,其中所述组合物是凝胶。

24. 如权利要求20所述的药物组合物,其中所述组合物是气溶胶。

25. 如权利要求20-24中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于通过吸入施用。

26. 如权利要求20-24中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于通过汽化器施用。

27. 如权利要求20-24中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于通过喷雾器施用。

28. 如权利要求20-24中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于通过雾化器施用。

29. 如权利要求20-24中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于口服施用、颊部施用或舌下施用。

30. 如权利要求20-24中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于静脉内、肌肉内或皮下施用。

31. 如权利要求20-24中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于鞘内或脑室内施用。

32. 如权利要求20-24中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于局部施用。

33. 如权利要求20所述的药物组合物,其中所述活性成分以至少0.01mg/ml的浓度存在于所述药物组合物中。

34. 如权利要求33所述的药物组合物,其中所述活性成分以至少0.1mg/ml的浓度存在于所述药物组合物中。

35. 如权利要求34所述的药物组合物,其中所述活性成分以至少0.5mg/ml的浓度存在于所述药物组合物中。

36. 如权利要求35所述的药物组合物,其中所述活性成分以至少1mg/ml的浓度存在于药物组合物中。

37. 如权利要求20所述的药物组合物在制备用于治疗帕金森病的药物中的用途。

38. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制为通过吸入施用。

39. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制为经口服施用。

40. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制为通过口腔施用来施用。

41. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制为通过舌下施用递送。

42. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制为通过注射施用。

43. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制为通过局部施用来施用。

44. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制为以足以调节神经元存活或多巴胺释放的量施用。

45. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物还包含以小于每剂1g的量施用的主要大麻素。

46. 如权利要求45所述的用途,其中所述药物组合物还包含以小于每剂500mg的量施用的主要大麻素。

47. 如权利要求46所述的用途,其中所述药物组合物还包含以小于每剂100mg的量施用的主要大麻素。

48. 如权利要求47所述的用途,其中所述药物组合物还包含以小于每剂10mg的量施用的主要大麻素。

49. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制用于按照需要施用。

50. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制用于每天施用一次。

51. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制用于每天施用2-4次。

52. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制用于每周施用2-4次。

53. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制用于每周施用一次。

54. 如权利要求37所述的用途,其中所述药物组合物配制用于每两周施用一次。

用于治疗神经退行性疾病的含有大麻素的复合混合物

[0001] 1. 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年10月11日提交的62/406,764号美国临时申请的优先权利益,其全文通过引用在此引入。

2. 背景技术

[0003] 在老龄化人群中,与帕金森病、阿尔茨海默病、路易体痴呆和亨廷顿病相关的神经变性是一种日益增长的健康负担。

[0004] 在这些神经变性疾病中,帕金森病(PD)的病理生理学已被特别好地研究。

[0005] 从机制上讲,PD的运动症状与中脑黑质中产生多巴胺的神经元的死亡以及各脑区中路易体的沉积相关联。还证明了多巴胺反应系统的脱敏,其表明在疾病中多巴胺的产生和效能两者都受到损害。目前批准用于治疗PD的大多数现有药剂解决了多巴胺耗竭的症状,例如运动迟缓,但不改变疾病进展。

[0006] 线粒体功能是PD发病机理的核心。在20世纪80年代,非法药物MPTP(1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶)(线粒体电子传递链复合物I抑制剂)的使用者发生了PD。他们的症状和最终的尸检发现重演了PD的各个方面。虽然路易体明显缺失(也是MPTP处理的灵长类动物中的发现),但多巴胺治疗暂时是成功的,表明PD病理的另一分支是MPTP暴露的特征。自从这些研究以来,大量文献已经确认了线粒体(特别是氧化)与PD之间的联系。此外,已经牵涉到线粒体复合物I和III,并且阐明了它们在PD脑/多巴胺能神经元中活性氧物质的产生和氧化应激之间的联系。

[0007] 已经提出大麻素作为治疗一系列神经障碍(包括PD)的潜在药剂。

[0008] 先前,大麻素似乎是用于靶向作为PD的基础的机制途径并且潜在地改变疾病进展的有希望的药物。首先,它们显然能够充当抗氧化剂,特别是在线粒体上对抗氧化应激。其次,大麻素受体位于PD受损的大脑区域中,苍白球和黑质网状区显示出大脑中一些最高的CB1受体表达水平,并且还表达亲离子型大麻素受体TRPV1。第三,大麻素是神经元中的促生存因子,并且防止氧化诱导的细胞死亡。甚至有证据表明,分离的大麻素化合物可以作为抗聚集(anti-aggregomal)因子发挥作用, δ -9四氢大麻酚(THC)直接结合阿尔茨海默病中的A β 斑块肽并导致解聚。大麻素是促清除的(pro-clearance),促进包涵体的自噬和溶解。

[0009] 总之,内源-大麻素系统的这些功能将其外源对应物非常好地置于病理性脑老化中的理论干预策略的位置。事实上,缺乏CB1的小鼠显示认知衰退的早期发作和PD常见的组织学和分子特征,并且吸烟和摄入大麻与运动功能的短暂和持续改善有关,在患者经历的个案报告中减少疼痛和改善运动功能。

[0010] 尽管已经单独或成对地测试了多种大麻素,但是测试的大麻素组合未显示出预测的治疗作用,并且特别地,未证明其在功效上与使用整个大麻植物相当。这可能是由于每种大麻植物中存在的化合物的复杂性,以及各种大麻株系中存在的巨大变异性。大麻植物的微量成分(大麻素和其他天然存在的组分)也可能对总体治疗作用产生积极或消极的影响。

[0011] 许多研究表明PD的有效治疗不仅应针对多巴胺产生的恢复,还应解决钙过载诱导的细胞死亡的问题。参见,例如,Cali等,Cell Tissue Res.357(2):439-54(2014);Kang等,Nature Communications 3,Article number:1146(2012)。如果这些钙过载诱导组分未被鉴别和去除,含有阳离子通道配体(如TRPV1)的大麻混合物可能具有有限的治疗潜力。

[0012] 因此,一直需要用于治疗PD和其他神经变性疾病的新颖且有效的药理学试剂。特别需要有效治疗PD和其他神经变性疾病的明确限定的大麻素组合物。

3. 发明内容

[0013] 本发明提供了适合用作活性药物成分的新的含大麻素的复合混合物、制备该复合混合物的方法以及包含该复合混合物的药物组合物。本发明还涉及它们用于治疗神经变性疾病的方法。

[0014] 本发明的一个方面涉及药物活性成分,其包含至少第一主要大麻素;至少第一次要大麻素;和任选地,至少第一选择萜烯。在一些实施方案中,第一主要大麻素是大麻二酚(CBD)。在一些实施方案中,第一主要大麻素是大麻酚(CBN)。

[0015] 在一些实施方案中,第一次要大麻素是次大麻二酚。在一些实施方案中,所述成分还包含第二次要大麻素,并且所述第二次要大麻素是大麻环萜酚。在一些实施方案中,该第二次要大麻素是大麻萜酚。在一些实施方案中,该成分包含第三次要大麻素,该第三次要大麻素是大麻环萜酚。

[0016] 在一些实施方案中,所述成分还包含至少第一选择萜烯。在一些实施方案中,活性成分还包含第二选择萜烯。在一些实施方案中,第一和第二萜烯是柠檬烯和芳樟醇。在一些实施方案中,第一和第二萜烯是松萜和叶绿醇。在一些实施方案中,活性成分包括柠檬烯、芳樟醇、橙花叔醇、松萜和叶绿醇。

[0017] 在一些实施方案中,活性成分基本上不含THC,因此具有有限的或没有可证明的精神活性。

[0018] 在一些实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和任选的选择萜烯共同构成活性成分重量的至少75%、80%、85%、90%或95%。

[0019] 在一些实施方案中,活性成分中除主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯之外的所有化合物均可从大麻(*Cannabis sativa*)中提取。

[0020] 在一些实施方案中,主要大麻素共同构成活性成分重量的5-40%;次要大麻素共同构成活性成分重量的5-70%;选择萜烯共同构成活性成分重量的0-70%。

[0021] 在一些实施方案中,主要大麻素共同构成活性成分重量的10-35%;次要大麻素共同构成活性成分重量的30-70%;和选择萜烯共同构成活性成分重量的0-50%。

[0022] 本发明的另一方面涉及通过添加至少第一主要大麻素;添加至少第一次要大麻素;和任选地,添加至少第一选择萜烯制备药物活性成分的方法。在一些实施方案中,将第一主要大麻素、第一次要大麻素和任选的第一选择萜烯加入到大麻提取物中。在一些实施方案中,该方法还包括测量主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯各自的浓度,和/或计算其在大麻提取物中的比活性的在先步骤。

[0023] 在一些实施方案中,加入第一主要大麻素、第一次要大麻素或任选的第一选择萜烯以在活性成分中达到预定浓度。

[0024] 在一些实施方案中,该方法还包括制备大麻提取物的在先步骤。在一些实施方案中,从选定的大麻株系制备大麻提取物。

[0025] 本发明的另一方面涉及通过所述方法产生的药物活性成分。

[0026] 本发明进一步涉及药物组合物,其包含所述药物活性成分和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0027] 在一些实施方案中,该药物组合物是油、乳液、凝胶或气溶胶。

[0028] 在一些实施方案中,配制药组合物用于通过吸入、汽化器、喷雾器或雾化器施用。

[0029] 在一些实施方案中,配制药组合物用于口服、口腔或舌下施用。

[0030] 在一些实施方案中,配制药组合物用于静脉内、肌肉内或皮下施用。在一些实施方案中,配制药组合物用于鞘内或脑室内施用。

[0031] 在一些实施方案中,配制药组合物用于局部施用。

[0032] 在一些实施方案中,活性成分以至少0.01、0.1、0.5或1mg/ml的浓度存在于药物组合物中。

[0033] 本发明的另一方面涉及通过向患有神经变性疾病的患者施用有效量的本文公开的药物组合物来治疗神经变性疾病的方法。在一些实施方案中,神经变性疾病是阿尔茨海默病、帕金森病、路易体痴呆或亨廷顿病。

[0034] 在一些实施方案中,药物组合物通过吸入施用。在一些实施方案中,药物组合物经口服施用。在一些实施方案中,药物组合物通过口腔施用来施用。在一些实施方案中,药物组合物通过舌下施用递送。在一些实施方案中,药物组合物通过注射施用。在一些实施方案中,药物组合物通过局部应用来施用。

[0035] 在一些实施方案中,药物组合物以足以调节神经元存活或多巴胺释放的量施用。

[0036] 在一些实施方案中,主要大麻素的施用量小于每剂1g、500mg、100mg或10mg。

[0037] 在一些实施方案中,药物组合物按照需要(p.r.n.)、每天一次、一天2-4次、一周2-4次、每周一次或每两周一次施用。

[0038] 下面进一步详细描述本发明的这些和其他方面。

4. 附图说明

[0039] 图1A列出了来自实施例1的数据,其中说明了单个主要大麻素和次要大麻素对由1-甲基-4-苯基吡啶(MPP)诱导的神经元细胞死亡的保护作用。与对照相比,保护作用表示为救援MPP诱导的细胞死亡的%救援。每个数据点代表在每种主要或次要大麻素的特定浓度(1、10或100 μ M)下进行的24个(8 \times 3)独立实验的平均。标准偏差在括号中表示。

[0040] 图1B列出了来自实施例1的数据,其中说明了单个选择萜烯的保护作用。数据如上文在图1A中所描述的那样呈现。

[0041] 图2确定了实施例1中测试的子混合物(ENT 1-12)的组成。每种化合物,无论是次要大麻素还是选择萜烯,在ENT组合物中以相等的摩尔浓度存在。

[0042] 图3A提供了来自实施例1的数据,其说明了在具有或不具有主要大麻素(大麻二酚或大麻酚)的情况下不同子混合物(ENT 1-12)对MPP诱导的细胞死亡的保护作用。

[0043] 图3B作为线图提供了图3A中呈现的相同数据集。X轴表示包含子混合物(ENT 1-

12)之一而具有或不具有主要大麻素(CBD或CBN)的测试混合物。Y轴表示与对照相比从MPP诱导的细胞死亡的%救援。

[0044] 图4提供来自实施例2的数据,其中说明具有或不具有主要大麻素(CBD或CBN)的子混合物(ENT 1-12)对多巴胺释放的刺激的影响。响应于不同组合物的测量的多巴胺释放量表示为与响应于已知促分泌组合物PMA/离子霉素的多巴胺释放量的%。

[0045] 图5提供了比较实施例1和实施例2的结果的条形图,其总结了图2-4中呈现的不同组合物针对MPP诱导的细胞死亡的保护作用(实心条)和对多巴胺释放的影响(虚线条)。实心条代表与对照相比的MPP诱导细胞死亡的救援%(左侧的y轴)。虚线条表示作为与响应于PMA/离子霉素的多巴胺释放量相比的%的多巴胺释放量(右侧的y轴)。

[0046] 图6A和6B显示TRPV1可介导Cath.a神经元中的钙依赖性细胞死亡。图6A图示了在HEK野生型细胞、用TRPV1表达构建体转染的HEK细胞和Cath.a细胞中在存在10mM外部CaCl₂的情况下,在80分钟时的细胞死亡(通过台盼蓝阳性测量),在每种情况下不存在刺激(左侧条)和250nM辣椒素刺激后80分钟(右侧条),其表明辣椒素可诱导Cath.a细胞的细胞死亡。图6B显示在HEK野生型细胞、用TRPV1表达构建体转染的HEK细胞和Cath.a细胞中,在不存在外部钙的情况下80分钟时的细胞死亡(%台盼蓝阳性细胞),在每种情况下没有刺激(左侧条)和250M辣椒素刺激后80分钟(右侧条),证明辣椒素诱导的Cath.a细胞的死亡依赖于外部钙的存在。

[0047] 图7显示大麻素和萜烯的混合物(其模拟了目前在美国内华达州(Nevada,USA)药用的大麻品种的实际化学谱,但经改变以去除精神活性大麻素THC和THCA(“株系A混合物”))诱导显著的TRPV1介导的钙进入。结合图6A和6B中呈现的数据,这些数据表明,用于治疗神经变性疾病的含大麻素的复合混合物,和特别是旨在保持多巴胺能细胞功能和存活力的含大麻素的复合混合物,应优先去除或以降低的水平包含触发TRPV1依赖性钙流入的大麻素和萜烯。

[0048] 附图仅出于说明的目的描绘了本发明的各种实施方案。本领域技术人员将从以下讨论中容易地认识到,可以采用本文所示的结构和方法的替代实施方案而不脱离本文所述的本发明的原理。

5. 具体实施方式

[0049] 5.1 定义

[0050] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常所理解的含义。如本文所用,以下术语具有下文所赋予的含义。

[0051] “主要大麻素”是指大麻二酚(CBD)或大麻酚(CBN)。主要大麻素可以通过化学合成、化学修饰获得,或者从源自一种或多种大麻植物的植物材料获得。

[0052] “次要大麻素”是指大麻环萜酚、大麻萜酚或次大麻二酚。次要大麻素可以通过化学合成、化学修饰获得,或者从源自一种或多种大麻植物的植物材料获得。

[0053] “选择萜烯”是指柠檬烯、芳樟醇、橙花叔醇、松萜或叶绿醇。选择萜烯可以通过化学合成、化学修饰、商业上获得,或者从源自一种或多种大麻植物的植物材料获得。

[0054] “子混合物”或“ENT”是包含选自如本文所定义的次要大麻素和/或选择萜烯的多种化合物的混合物。图2提供了在本文提供的实施例中测试的子混合物,ENT 1-12,的具体

组成。

[0055] “含大麻素的复合混合物”是包含主要大麻素和子混合物(ENT)的组合物。

[0056] 如果药物活性成分含有少于0.3% (w/v)的 δ -9四氢大麻酚,则该成分“基本上不含THC”。如果包含药物活性成分的药物组合物含有少于0.3% (w/v)的 δ -9四氢大麻酚,则该药物组合物“基本上不含THC”。

[0057] “大麻提取物”是通过流体和/或气体提取,例如通过用CO₂的超临界流体提取(SFE)从大麻植物材料获得的组合物。大麻提取物通常含有主要大麻素、次要大麻素、选择萜烯以及其他萜烯、植物大麻素(phytocannabinoid)和次级代谢产物。例如,大麻提取物可包括没药醇(bisabolol)、蛇麻烯、萜品烯、石竹烯、茨烯、香叶醇、愈创醇、异胡薄荷醇(isopulegol)、罗勒烯、伞花烃(cymene)、桉油醇、萜品油烯和月桂烯中的一种或多种。

[0058] 5.2. 其他解释性惯例

[0059] 本文所述的范围被理解为该范围内的所有值的简写,包括所列举的端点。例如,1至50的范围应理解为包括选自于由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50所组成的组的任意数字、数字组合或子范围。

[0060] 除非另有说明,否则提及具有一个或多个立体中心的化合物意指其每种立体异构体及立体异构体的所有组合。

[0061] 5.3. 实验结果概述

[0062] 如实施例1中更全面地描述的,我们在通常被用于鉴定能够改变帕金森病中神经变性进展的药剂的体外试验中测试(i)每种主要大麻素,(ii)每种次要大麻素,(iii)每种选择萜烯,(iv)子混合物(ENT)1-12,以及(v)每种ENT混合物与两种主要大麻素中的每一种的组的神经保护作用。

[0063] 单独使用的主要和次要大麻素在10 μ M或100 μ M浓度下显示出一些弱的神经保护作用。然而,即使在100 μ M浓度下,大多数选择萜烯也未显示任何可检测的神经保护作用。

[0064] 相反,我们的数据证明了当在不存在主要大麻素的情况下施用某些子混合物的协同作用。

[0065] 例如,没有主要大麻素的ENT8(大麻环萜酚和次大麻二酚)使MPP诱导的细胞毒性降低了23%,而其单个成分的保护作用的计算总和仅为10%。类似地,ENT1(包含所有3种次要大麻素和所有5种选择萜烯)使MPP诱导的毒性降低37%,而其单个成分的作用总和为12%。ENT10(所有3种次要大麻素和2种选择萜烯,柠檬烯和芳樟醇)使MPP诱导的毒性降低了31%,而其单个成分的救援作用的总和仅为12%。实际效应与计算的个体效应的总和之间的差异(参见图3B中的双箭头)表示协同作用。

[0066] 当子混合物与主要大麻素一起施用观察到甚至更大的协同作用,其中几种组合物将MPP诱导的细胞毒性降低超过50%。例如,ENT10+大麻二酚可使毒性降低64%;ENT1+大麻二酚使细胞毒性降低62%;ENT6+大麻二酚使细胞毒性降低51%;和ENT10+大麻酚提供51%的救援。保护程度显著高于个体效应的总和:例如,ENT10+大麻二酚的单个成分作用的总和仅为26%;ENT1+大麻二酚为26%;ENT6+大麻二酚为24%;和ENT10+大麻酚为17%。

[0067] 由纯化合物制备的测试组合物不含THC。

[0068] 这些数据预测了某些含大麻素的复合混合物在预防或减少帕金森病和其他神经

变性疾病的神经变性中的功效。

[0069] 我们选择在实施例1和实施例2中显示出较高神经保护作用的某些组合物测试了它们刺激PC12细胞的多巴胺释放的能力。

[0070] 某些ENT亚混合物单独地和与主要大麻素组合显著增加多巴胺释放。例如,与阳性对照PMA/离子霉素诱导的分泌(用于标准化,设定为100%)相比,ENT1+大麻二酚增加分泌146%,ENT8+大麻二酚增加分泌138%,ENT1单独增加分泌131%,和ENT1+大麻酚增加分泌131%。

[0071] 这些数据预测了某些含大麻素的复合混合物在治疗帕金森病和其他神经退行性疾病中多巴胺耗竭症状的功效。

[0072] 多个调查研究表明,对于PD的有效治疗不应仅针对多巴胺产生的恢复,还应解决钙过载诱导的细胞死亡的问题。参见,例如,Cali等,Cell Tissue Res.357(2):439-54(2014);Kang等,Nature Communications 3,Article number:1146(2012)。如实施例3中详细描述,我们证明了TRPV1介导的钙流入可以在体外引起Cath.a儿茶酚胺能神经元的死亡,并且证明了大麻素和萜烯的混合物其模拟了目前在美国内华达州药用的大麻品种(其经修改以去除精神活性大麻素THCA和THC)的实际化学谱)能够诱导显著的TRPV1介导的钙进入。这些数据表明,用于治疗神经退行性疾病的含大麻素的复合混合物,特别是旨在保持多巴胺能细胞功能和存活力的含大麻素的复合混合物,应设计成去除或以降低水的平包含引发TRPV1-依赖性钙流入的大麻素和萜烯。

[0073] 5.4. 药物活性成分

[0074] 5.4.1. 主要大麻素、次要大麻素、选择萜烯

[0075] 因此,在第一方面,提供了药物活性成分(在本文中同义地称为“活性成分”和“活性药物成分”),其包含至少第一主要大麻素、至少第一次要大麻素和任选地,至少第一选择萜烯。

[0076] 在一些实施方案中,第一主要大麻素是大麻二酚(CBD)。在一些实施方案中,第一主要大麻素是大麻酚(CBN)。在一些实施方案中,药物活性成分包括大麻二酚和大麻酚。

[0077] 在一些实施方案中,第一次要大麻素是次大麻二酚。在一些实施方案中,第一次要大麻素是大麻萜酚。在一些实施方案中,第一次要大麻素是大麻环萜酚。

[0078] 在一些实施方案中,活性成分还包含第二次要大麻素。

[0079] 在这些实施方案的某些实施方案中,第一次要大麻素是次大麻二酚,并且第二次要大麻素是大麻萜酚。在这些实施方案的某些实施方案中,第一次要大麻素是次大麻二酚,第二次要大麻素是大麻环萜酚。

[0080] 在这些实施方案的某些实施方案中,第一次要大麻素是大麻萜酚,和第二次要大麻素是次大麻二酚。在这些实施方案的某些实施方案中,第一次要大麻素是大麻萜酚,第二次要大麻素是大麻环萜酚。

[0081] 在这些实施方案的某些实施方案中,第一次要大麻素是大麻环萜酚,和第二次要大麻素是次大麻二酚。在这些实施方案的某些实施方案中,第一次要大麻素是大麻环萜酚,和第二次要大麻素是大麻萜酚。

[0082] 在一些实施方案中,活性成分还包含第三次要大麻素。在这些实施方案中,活性成分包括次大麻二酚、大麻萜酚和大麻环萜酚。

[0083] 在某些目前优选的实施方案中,第一主要大麻素是CBD,和第一次要大麻素是次大麻二酚。在其他目前优选的实施方案中,第一主要大麻素是CBN,和第一次要大麻素是次大麻二酚。在这些优选实施方案的一些实施方案中,该成分还包含第二次要大麻素。在这些实施方案的某些实施方案中,第二次要大麻素是大麻环萜酚。在这些实施方案的某些实施方案中,第二次要大麻素是大麻萜酚。

[0084] 在一些实施方案中,活性成分包含至少第一选择萜烯。

[0085] 在一些实施方案中,第一选择萜烯是柠檬烯。在一些实施方案中,第一选择萜烯是芳樟醇。在一些实施方案中,第一选择萜烯是橙花叔醇。在一些实施方案中,第一选择萜烯是松萜。在一些实施方案中,第一选择萜烯是叶绿醇。

[0086] 在一些实施方案中,活性成分还包含第二选择萜烯。

[0087] 在这些实施方案的某些实施方案中,第一选择萜烯是柠檬烯,和第二选择萜烯是芳樟醇。在某些实施方案中,第一选择萜烯是柠檬烯,和第二选择萜烯是橙花叔醇。在某些实施方案中,第一选择萜烯是柠檬烯,和第二选择萜烯是松萜。在某些实施方案中,第一选择萜烯是柠檬烯,和第二选择萜烯是叶绿醇。

[0088] 在这些实施方案的某些实施方案中,第一选择萜烯是芳樟醇,和第二选择萜烯是柠檬烯。在某些实施方案中,第一选择萜烯是芳樟醇,和第二选择萜烯是橙花叔醇。在某些实施方案中,第一选择萜烯是芳樟醇,和第二选择萜烯是松萜。在某些实施方案中,第一选择萜烯是芳樟醇,和第二选择萜烯是叶绿醇。

[0089] 在某些实施方案中,第一选择萜烯是橙花叔醇,和第二选择萜烯是柠檬烯。在某些实施方案中,第一选择萜烯是橙花叔醇,和第二选择萜烯是芳樟醇。在某些实施方案中,第一选择萜烯是橙花叔醇,和第二选择萜烯是松萜。在某些实施方案中,第一选择萜烯是橙花叔醇,和第二选择萜烯是叶绿醇。

[0090] 在某些实施方案中,第一选择萜烯是松萜,和第二选择萜烯是柠檬烯。在某些实施方案中,第一选择萜烯是松萜,和第二选择萜烯是芳樟醇。在某些实施方案中,第一选择萜烯是松萜,和第二选择萜烯是橙花叔醇。在某些实施方案中,第一选择萜烯是松萜,和第二选择萜烯是叶绿醇。

[0091] 在某些实施方案中,第一选择萜烯是叶绿醇,和第二选择萜烯是柠檬烯。在某些实施方案中,第一选择萜烯是叶绿醇,和第二选择萜烯是芳樟醇。在某些实施方案中,第一选择萜烯是叶绿醇,和第二选择萜烯是橙花叔醇。在某些实施方案中,第一选择萜烯是叶绿醇,和第二选择萜烯是松萜。

[0092] 在某些目前优选的实施方案中,第一和第二选择萜烯是柠檬烯和芳樟醇。在一些优选的实施方案中,第一和第二选择萜烯是松萜和叶绿醇。

[0093] 在一些实施方案中,活性成分包含3、4或所有5种选择萜烯。

[0094] 5.4.1.1. 相对含量

[0095] 在典型的实施方案中,主要大麻素共同构成活性成分重量的5-40% (wt%)。

[0096] 在某些实施方案中,主要大麻素共同构成活性成分的5-10wt%、活性成分的10-15wt%、活性成分的15-20wt%、活性成分的20-25wt%、活性成分的25-30wt%、活性成分的30-35wt%或活性成分的35-40wt%。在某些实施方案中,主要大麻素共同构成活性成分的至少5wt%、至少10wt%、至少15wt%、至少20wt%、至少25wt%、至少30wt%、至少35wt%,

但每种情况下不超过活性成分的40wt%。

[0097] 在典型的实施方案中,次要大麻素共同构成活性成分重量的5-70%。

[0098] 在某些实施方案中,次要大麻素共同构成活性成分的5-10wt%、活性成分的10-15wt%、活性成分的15-20wt%、活性成分的20-25wt%、活性成分的25-30wt%、活性成分的30-35wt%或活性成分的35-40wt%。在某些实施方案中,次要大麻素共同构成活性成分的40-45wt%、45-50wt%、50-55wt%、55-60wt%、60-65wt%或65-70wt%。在某些实施方案中,次要大麻素共同构成活性成分的至少5wt%、10wt%、15wt%、20wt%、25wt%、30wt%、35wt%、40wt%、45wt%或50wt%,但在每种情况下,不超过活性成分的70wt%。在某些实施方案中,次要大麻素共同占活性成分的至少55wt%、至少60wt%、至少65wt%,但在每种情况下小于活性成分的70wt%。

[0099] 在典型的实施方案中,选择萜烯共同构成活性成分重量的0-70%。在存在至少一种任意的选择萜烯的实施方案中,选择萜烯共同构成活性成分的5-70wt%。

[0100] 在某些实施方案中,选择萜烯共同占活性成分的至少5wt%、至少10wt%、至少15wt%、至少20wt%、至少25wt%、至少30wt%、至少35wt%、至少40wt%、至少45wt%、至少50wt%、至少55wt%、至少60wt%或至少65wt%,但在每种情况下小于活性成分的70wt%。

[0101] 在一些目前优选的实施方案中,主要大麻素共同构成活性成分重量的10-35%;次要大麻素共同构成活性成分重量的30-70%;和选择萜烯共同构成活性成分重量的0-50%。

[0102] 在一些实施方案中,主要大麻素共同构成活性成分的5-40% (w/v)。

[0103] 在某些实施方案中,主要大麻素共同构成活性成分的5-10% (w/v)、活性成分的10-15% (w/v)、活性成分的15-20% (w/v)、活性成分的20-25% (w/v)、活性成分的25-30% (w/v)、活性成分的30-35% (w/v)或活性成分的35-40% (w/v)。在某些实施方案中,主要大麻素共同构成活性成分的至少5% (w/v)、至少10% (w/v)、至少15% (w/v)、至少20% (w/v)、至少25% (w/v)、至少30% (w/v)、至少35% (w/v),但每种情况下不超过活性成分的40% (w/v)。

[0104] 在一些实施方案中,次要大麻素共同构成活性成分的5-70% (w/v)。

[0105] 在某些实施方案中,次要大麻素共同构成活性成分的5-10% (w/v)、活性成分的10-15% (w/v)、活性成分的15-20% (w/v)、活性成分的20-25% (w/v)、活性成分的25-30% (w/v)、活性成分的30-35% (w/v)或活性成分的35-40% (w/v)。在某些实施方案中,次要大麻素共同构成活性成分的40-45% (w/v)、45-50% (w/v)、50-55% (w/v)、55-60% (w/v)、60-65% (w/v)或65-70% (w/v)。在某些实施方案中,次要大麻素共同构成活性成分的至少5% (w/v)、10% (w/v)、15% (w/v)、20% (w/v)、25% (w/v)、30% (w/v)、35% (w/v)、40% (w/v)、45% (w/v)或50% (w/v),但在每种情况下不超过活性成分的70% (w/v)。在某些实施方案中,次要大麻素共同构成活性成分的至少55% (w/v)、至少60% (w/v)、至少65% (w/v),但是在每种情况下少于活性成分的70% (w/v)。

[0106] 在一些实施方案中,选择萜烯共同构成活性成分的0-70% (w/v)。在其中存在至少一种任意的选择萜烯的实施方案中,选择萜烯共同构成活性成分的5-70% (w/v)。

[0107] 在某些实施方案中,选择萜烯共同构成活性成分的至少5% (w/v)、至少10% (w/v)、至少15% (w/v)、至少20% (w/v)、至少25% (w/v)、至少30% (w/v)、至少35% (w/v)、至少40% (w/v)、至少45% (w/v)、至少50% (w/v)、至少55% (w/v)、至少60% (w/v)或至少65%

(w/v),但在每种情况下小于活性成分的70% (w/v)。

[0108] 在一些目前优选的实施方案中,主要大麻素共同构成活性成分的10-35% (w/v);次要大麻素共同构成活性成分的30-70% (w/v);和选择萜烯共同构成活性成分的0-50% (w/v)。

[0109] 5.4.1.2. 绝对含量

[0110] 在一些实施方案中,药物活性成分由主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯组成。在这些实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成药物活性成分的100wt%。

[0111] 在一些实施方案中,活性成分基本上由主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯组成。

[0112] 在其他实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成药物活性成分重量的小于100% (wt%)。

[0113] 在一些实施方案中,药物活性成分由主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯组成。在这些实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成药物活性成分的100% (w/v)。

[0114] 在一些实施方案中,活性成分基本上由主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯组成。

[0115] 在其他实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成药物活性成分的小于100% (w/v)。

[0116] 5.4.2. 其他组分

[0117] 在一些实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成药物活性成分的小于100wt% (wt%)。

[0118] 在各种这样的实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯共同构成药物活性成分重量的至少75%,但小于100wt%。在具体的实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯共同构成活性成分重量的至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%或至少95%,但小于活性成分的100wt%。在特定的实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯共同构成活性成分重量的至少96%、至少97%、至少98%或至少99%,但小于活性成分的100wt%。

[0119] 在其中主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成药物活性成分重量的小于100% (wt%)的实施方案中,活性成分还包含除主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯之外的化合物。在典型的此类实施方案中,活性成分中的所有其他化合物均可从大麻中提取。在具体的实施方案中,活性成分中的所有其他化合物存在于由大麻制成的提取物中。

[0120] 在一些实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成药物活性成分的小于100% (w/v)。

[0121] 在各种这样的实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯共同构成药物活性成分的至少75% (w/v),但小于100% (w/v)。在具体的实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯共同构成活性成分的至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%或至少95% (w/v),但小于100% (w/v)。在特定的实施方案中,主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯共同构成活性成分的至少96%、至少97%、至少98%或至少99% (w/v),但小于100% (w/v)。

[0122] 在其中主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯共同构成药物活性成分的小于100% (w/v)的实施方案中,活性成分还包含除主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯以外的化合

物。在典型的此类实施方案中,活性成分中的所有其他化合物均可从大麻中提取。在具体的实施方案中,活性成分中的所有其他化合物存在于由大麻制成的提取物中。

[0123] 5.4.2.1. THC含量

[0124] 在各种实施方案中,活性成分基本上不含四氢大麻酚(THC)。这些实施方案保留了活性药物成分治疗神经变性疾病且缺乏精神活性作用方面的治疗特性,提供某些调节和其他优势。

[0125] 在某些实施方案中,活性成分基本上不含THC。在这些实施方案的某些实施方案中,活性成分包含1-10重量百分比(wt%)的THC。在具体的实施方案中,活性成分包含2-9wt%的THC、3-8wt%的THC、4-7wt%的THC。在某些实施方案中,活性成分包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10wt%的THC。

[0126] 在某些实施方案中,活性成分基本上不含THC。在这些实施方案的某些中,活性成分包含1-10% (w/v) 的THC。在具体的实施方案中,活性成分包含2-9% (w/v) 的THC、3-8% (w/v) 的THC、4-7% (w/v) 的THC。在某些实施方案中,活性成分包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10% (w/v) 的THC。

[0127] 5.4.3. 用于制备活性成分的方法

[0128] 在一些实施方案中,通过将化学纯的主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯混合至所需的最终浓度来制备药物活性成分。主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯中的每一种可以独立地通过全合成或通过中间体的合成修饰来化学合成、从成分混合物(如大麻提取物)纯化或者如下面描述的实施例中那样,商业购买。

[0129] 在其他实施方案中,药物活性成分通过将主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯中的任何一种或多种调节至预定的所需最终浓度从起始成分混合物制备。在典型的实施方案中,起始成分混合物是大麻提取物。在目前优选的实施方案中,起始成分混合物是大麻提取物,并且主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯中的一种或多种加入该混合物中以达到预定的所需最终浓度。

[0130] 通常在这样的实施方案中,该方法还包括测定起始成分混合物中每种所需主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯的浓度的较早步骤。

[0131] 在这些实施方案的某些实施方案中,该方法还包括制备大麻提取物的更早的步骤。制备大麻提取物的方法描述于美国专利号6,403,126、8,895,078和9,066,910; Doorenbos等,Cultivation,extraction,and analysis of cannabis sativa L.,Annals of The New York Academy of Sciences,191,3-14(1971);Fairbairn和Liebmann,The extraction and estimation of the cannabinoids in Cannabis sativa L.and its products,Journal of Pharmacy and Pharmacology,25,150-155(1973);Oroszlan和Verzar-petri,Separation,quantitation and isolation of cannabinoids from cannabis sativa L.by overpressured layer chromatography,Journal of Chromatography A,388,217-224(1987)中,其公开内容通过引用整体并入本文。在特定的实施方案中,选择提取方法以提供具有最接近活性成分的预定组成的主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯含量的提取物。

[0132] 在一些实施方案中,该方法还包括选择大麻株系的第一步骤。

[0133] 在某些实施方案中,所选择的株系在整体植物中或在其可提取部分中具有主要大

麻素、次要大麻素和选择萜烯的典型含量(其最接近活性成分的预定组成)。在某些实施方案中,所选择的株系是能够提供最接近活性成分的预定组成的提取物的株系。在具体的实施方案中,所选择的株系在植物、其可提取部分或其提取物中具有最接近所需主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯的预定重量比的典型含量。在具体的实施方案中,所选择的株系在植物、其可提取部分或其提取物中具有需要最少数量的所需主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯的浓度调节的典型含量。在具体的实施方案中,所选择的株系在植物、其可提取部分或其提取物中具有需要最低成本的所需主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯的浓度调节的典型含量。

[0134] 5.4.4. 工艺产品

[0135] 在典型的实施方案中,药物活性成分通过上文4.4.3节中描述的方法之一制备。

[0136] 在其中通过将主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯中的任何一种或多种调节至预定的所需最终浓度而由起始成分混合物制备药物活性成分的实施方案中,活性成分中除主要大麻素、次要大麻素和选择萜烯外的所有化合物存在于起始成分混合物中。在起始成分混合物是大麻提取物的实施方案中,活性成分中除了主要大麻素、次要大麻素和任意的选择萜烯之外的所有化合物都存在于大麻提取物中。

[0137] 5.5. 药物组合物

[0138] 在另一方面,提供了药物组合物。药物组合物包含本文公开的药物活性成分和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0139] 5.5.1. 药物活性成分的含量

[0140] 在典型的实施方案中,活性成分以至少0.01mg/ml、至少0.1mg/ml、至少0.5mg/ml或至少1mg/ml的浓度存在于药物组合物中。在某些实施方案中,活性成分以至少1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml或25mg/ml的浓度存在于药物组合物中。在某些实施方案中,活性成分以至少30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml或50mg/ml的浓度存在于药物组合物中。

[0141] 5.5.2. 一般制剂

[0142] 药物组合物可以是适合于人体医学或兽医学的任何形式,包括液体、油、乳液、凝胶、胶体、气溶胶或固体。

[0143] 药物组合物可以配制用于通过适合于人体医学或兽医学的任何施用途施用,包括肠内和肠胃外施用途。

[0144] 在各种实施方案中,药物组合物配制用于通过吸入施用。在这些实施方案的某些实施方案中,药物组合物配制用于通过汽化器施用。在这些实施方案的某些实施方案中,药物组合物配制用于通过喷雾器施用。在这些实施方案的某些实施方案中,药物组合物配制用于通过气雾器施用。

[0145] 在各种实施方案中,药物组合物配制用于口服施用、口腔施用或舌下施用。

[0146] 在一些实施方案中,药物组合物配制用于静脉内、肌肉内或皮下施用。

[0147] 在一些实施方案中,药物组合物配制用于鞘内或脑室内施用。

[0148] 在一些实施方案中,药物组合物配制用于局部施用。

[0149] 5.5.3. 适于通过吸入施用的药物组合物

[0150] 在一些实施方案中,提供了本文所述的药物组合物的单位剂型,其适于通过汽化

器、喷雾器或气雾器施用药物组合物。在一些实施方案中,剂型是小瓶、安瓿,任选地刻痕以允许使用者打开。在特定实施方案中,喷雾器是喷射雾化器或超声雾化器。

[0151] 可吸入组合物通常在水溶液中施用,例如作为鼻腔或肺部喷雾。用于作为鼻腔喷雾剂分配液体的优选系统公开在第4,511,069号美国专利中。通过将根据本发明的组合物溶解在水中以产生水溶液并使溶液无菌,可以方便地制备这样的制剂。制剂可以存在于多剂量容器中,例如在第4,511,069号美国专利中公开的密封分配系统中。其他合适的鼻腔喷雾递送系统已经被描述于Transdermal Systemic Medication, Y.W.Chien Ed., Elsevier Publishers, New York, 1985; M.Naef等Development and pharmacokinetic characterization of pulmonal and intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans, J.Pharm.Sci.93, 1176-84 (2004)中;以及第4,778,810;6,080,762;7,052,678;和8,277,781号美国专利中(各自通过引用并入本文)。另外的气溶胶递送形式可包括例如压缩空气、射流、超声和压电喷雾器,其递送溶解或悬浮在药用溶剂(例如水、乙醇或其混合物)中的生物活性剂。

[0152] 粘膜制剂以干粉制剂施用,例如,包含其为适当粒径或在合适的粒径范围内的干燥的,通常冻干形式的生物活性剂,用于鼻内递送。适于在鼻腔或肺通道内沉积的最小粒径通常为约0.5微米质量中值当量空气动力学直径(MMAD),通常约1微米MMAD,和更通常约2微米MMAD。适于在鼻腔通道内沉积的最大粒径通常为约10微米MMAD,通常为约8微米MMAD,更通常为约4微米MMAD。这些尺寸范围内的鼻内可吸入粉末可通过各种常规技术生产,例如喷射研磨、喷雾干燥、溶剂沉淀、超临界流体冷凝等。这些具有合适MMAD的干粉可以通过依赖于患者的呼吸在肺或鼻吸入时将粉末分散成雾化量的常规干粉吸入器(DPI)施用于患者。或者,干粉可以通过空气辅助装置施用,该装置使用外部动力源将粉末分散成雾化量,例如活塞泵。

[0153] 5.5.4. 适于口服/口腔/舌下施用的药物组合物

[0154] 用于口服、口腔或舌下施用的制剂可以是胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄耆胶)、粉末、颗粒或作为水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳液,或作为酞剂或糖浆,或作为软锭剂(使用惰性基质,如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等,各自含有预定量的所述多肽治疗剂作为活性成分。除活性化合物外,悬浮液可含有悬浮剂,如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄耆胶,以及它们的混合物。

[0155] 在用于口服、口腔或舌下施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末、颗粒等)中,可以将一种或多种治疗剂与一种或多种药学上可接受的载体混合,例如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或以下任何一种:(1) 填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2) 粘合剂,例如,如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3) 保湿剂,如甘油;(4) 崩解剂,如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸,某些硅酸盐和碳酸钠;(5) 溶液缓凝剂(solution retarding agent),如石蜡;(6) 吸收促进剂,如季铵化合物;(7) 润湿剂,例如,如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8) 吸收剂,如高岭土和膨润土;(9) 润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;和(10) 着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。类似类型的

固体组合物也可用作软和硬填充明胶胶囊中的填充剂,其使用诸如乳糖(lactose)或乳糖(milksugars),以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂。用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酞剂。除活性成分外,液体剂型可含有本领域常用的惰性稀释剂,如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯,以及其混合物。除惰性稀释剂外,口服组合物还可包括助剂,如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0156] 5.5.5. 适应于注射的药物组合物

[0157] 对于静脉内、肌肉内或皮下注射,或在患病部位的注射,活性成分是肠胃外可接受的水溶液形式,其是无热原的并且具有合适的pH、等渗度和稳定性。本领域相关技术人员能够使用例如等渗媒介物如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液制备合适的溶液。根据需要,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0158] 在各种实施方案中,单位剂型是小瓶、安瓿、瓶子或预填充注射器。在一些实施方案中,单位剂型含有0.01mg、0.1mg、0.5mg、1mg、2.5mg、5mg、10mg、12.5mg、25mg、50mg、75mg或100mg的大麻素组合物。在一些实施方案中,单位剂型含有125mg、150mg、175mg或200mg的大麻素组合物。在一些实施方案中,单位剂型含有250mg的大麻素组合物。

[0159] 在典型的实施方案中,单位剂型的药物组合物是液体形式。在各种实施方案中,单位剂型含有0.1mL至50mL之间的药物组合物。在一些实施方案中,单位剂型含有1mL、2.5mL、5mL、7.5mL、10mL、25mL或50mL的药物组合物。

[0160] 在具体的实施方案中,单位剂型是含有浓度为0.01mg/mL、0.1mg/mL、0.5mg/mL或1mg/mL的1mL大麻素组合物的小瓶。在一些实施方案中,单位剂型是含有浓度为0.01mg/mL、0.1mg/mL、0.5mg/mL或1mg/mL的2mL大麻素组合物的小瓶。

[0161] 在一些实施方案中,单位剂型的药物组合物是适合于溶解的固体形式,例如冻干物。

[0162] 适用于皮下、皮内或肌肉内施用的单位剂型实施方案包括预加载的注射器、自动注射器和自动注射笔,每个包含预定量的上文所述的药物组合物。

[0163] 在各种实施方案中,单位剂型是预加载的注射器,其包含注射器和预定量的药物组合物。在某些预加载的注射器实施方案中,注射器适于皮下施用。在某些实施方案中,注射器适合于自我施用。在特定实施方案中,预加载的注射器是一次性注射器。

[0164] 在各种实施方案中,预加载的注射器含有约0.1mL至约0.5mL的药物组合物。在某些实施方案中,注射器含有约0.5mL的药物组合物。在具体的实施方案中,注射器含有约1.0mL的药物组合物。在特定的实施方案中,注射器含有约2.0mL的药物组合物。

[0165] 在某些实施方案中,单位剂型是自动注射笔。自动注射笔包括含有如本文所述的药物组合物的自动注射笔。在一些实施方案中,自动注射笔递送预定体积的药物组合物。在其他实施方案中,自动注射笔配置成递送由用户设定的一定体积的药物组合物。

[0166] 在各种实施方案中,自动注射笔含有约0.1mL至约5.0mL的药物组合物。在具体的实施方案中,自动注射笔含有约0.5mL的药物组合物。在特定的实施方案中,自动注射笔含有约1.0mL的药物组合物。在其他实施方案中,自动注射笔含有约5.0mL的药物组合物。

[0167] 5.5.6. 适于局部施用的药物组合物

[0168] 用于局部施用的药物组合物和制剂可包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体,水性、粉末或油性基质,增稠剂等可能是必需的或期望的。涂覆的避孕套、手套等也可能是有用的。合适的局部制剂包括其中具有本发明特征的含大麻素的复合混合物与局部递送剂如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的那些。合适的脂质和脂质体包括中性的(例如,二油酰磷脂酰乙醇胺DOPE、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性的(例如,二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子的(例如,二油酰四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰磷脂酰乙醇胺DOTMA)。具有本发明特征的含大麻素的复合混合物可以包封在脂质体内或可以与其形成复合物,特别是阳离子脂质体。或者,含大麻素的复合混合物可与脂质(特别是与阳离子脂质)复合。合适的脂肪酸和酯包括但不限于花生四烯酸、油酸、二十烷酸、月桂酸、辛酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、三癸酸酯、油酸单甘油酯、甘油二月桂酸、甘油基1-单癸酸酯、1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱或C1-10烷基酯(例如肉豆蔻酸异丙酯IPM)、单甘油酯、甘油二酯或其药学上可接受的盐。

[0169] 5.6. 剂量范围,一般地

[0170] 可任选地采用体内和/或体外分析来帮助确定使用的最佳剂量范围。制剂中使用的精确剂量还取决于施用途径和病症的严重程度,并应根据医师的判断和每个受试者的情况来决定。可从源自体外或动物模型测试系统的剂量-反应曲线外推有效剂量。

[0171] 5.7. 单位剂型

[0172] 药物组合物可以方便地以单位剂型存在。

[0173] 单位剂型通常适合于药物组合物的一种或多种特定施用途径。

[0174] 在各种实施方案中,单位剂型适于通过吸入施用。在这些实施方案的某些实施方案中,单位剂型适于通过汽化器施用。在这些实施方案的某些实施方案中,单位剂型适于通过喷雾器施用。在这些实施方案的某些实施方案中,单位剂型适于通过气雾器施用。

[0175] 在各种实施方案中,单位剂型适于口服施用、口腔施用或舌下施用。

[0176] 在一些实施方案中,单位剂型适于静脉内、肌肉内或皮下施用。

[0177] 在一些实施方案中,单位剂型适于鞘内或脑室内施用。

[0178] 在一些实施方案中,药物组合物配制用于局部施用。

[0179] 可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗作用的化合物的量。

[0180] 5.8. 使用方法

[0181] 5.8.1. 治疗神经退行性疾病的方法

[0182] 在另一个方面,提供了用于治疗患有对本文所述的含大麻素的复合混合物有反应的疾病的受试者的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的含大麻素的复合混合物。

[0183] 在某些实施方案中,对本文所述活性成分有反应的疾病是脑或中枢神经系统(CNS)的疾病。在一些实施方案中,该疾病是神经变性疾病。在一些实施方案中,所述疾病是阿尔茨海默病、帕金森病、路易体痴呆或亨廷顿病。

[0184] 在典型的实施方案中,含大麻素的复合混合物以如上所述的药物组合物的形式施

用。这些方法特别针对动物,更具体地人类的的治疗性和预防性治疗。

[0185] 本文使用的术语“治疗”、“处理”等通常意指获得所需的药理学和/或生理学作用。就完全或部分预防疾病、病症或其症状而言,该作用可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病或病症和/或可归因于疾病或病症的不良反应(例如症状)而言可以是治疗性的。本文所用的“治疗”包括对哺乳动物,特别是人的疾病或病症的任何治疗,并且包括:(a)在可能易患疾病或病症但尚未被诊断为患有此病的受试者中预防疾病或病症的发生;(b)抑制疾病或病症(例如,阻止其发展);或(c)缓解疾病或病症(例如,引起疾病或病症的消退,提供一种或多种症状的改善)。可以根据本领域已知的标准方法和技术容易地评估任何病症的改善。通过疾病方法治疗的受试者群体包括患有不良病症或疾病的受试者,以及具有发生病症或疾病的风险的受试者。

[0186] 术语“治疗有效剂量”或“有效量”是指对被施用者产生所需作用的剂量或量。确切的剂量或量将取决于治疗的目的,并且本领域技术人员可以使用已知技术确定(参见,例如,Lloyd(1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*)。

[0187] 术语“足量”是指足以产生所需作用的量。

[0188] 术语“治疗有效量”是有效改善疾病症状的量。治疗有效量可以是“预防有效量”,因为预防可以被认为是疗法。

[0189] 术语“改善”是指导引起疾病状态(例如神经变性疾病状态)的治疗中任何治疗上有益的结果,包括其预防、严重性或进展的减轻、缓解或治愈。

[0190] 施用的实际量,施用的速率和时间过程将取决于所治疗疾病的性质和严重程度。治疗的处方,例如关于剂量等的决定,由全科医生和其他医疗专业人员负责,并且通常考虑待治疗的疾病、个体患者的状况、递送的部位、施用方法和医生已知的其他因素。上述技术和方案的实例可以在Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980中找到。

[0191] 在一些实施方案中,药物组合物通过吸入、口服、通过口腔施用、通过舌下施用、通过注射或通过局部应用来施用。

[0192] 在一些实施方案中,药物组合物以足以调节神经元存活或多巴胺释放的量施用。在一些实施方案中,主要大麻素的施用量小于1g、小于500mg、小于100mg、小于10mg/剂。

[0193] 在一些实施方案中,药物组合物每天施用一次、每天施用2-4次、每周施用2-4次、每周一次或每两周施用一次。

[0194] 组合物可以单独施用或与其他治疗组合施用(同时或依次,取决于待治疗的病症)。

[0195] 本发明提供了包含主要大麻素和子混合物的新型组合物。我们已经证明该组合物具有神经保护和刺激多巴胺释放的显著生理学作用,并因此,它们可以对PD具有治疗作用,众所周知PD在疾病进展期间涉及多巴胺缺乏和多巴胺能细胞的死亡。此外,我们已经确定了发挥了显著的协同作用的主要大麻素和子混合物的特定组合。本发明还提供了使用本文确定的药物组合物治疗PD和其他神经变性疾病的方法。

[0196] 5.9. 实施例

[0197] 提供以下实施例是为了说明而非限制。

[0198] 5.9.1. 实施例1: 含大麻素的复合混合物的神经保护作用

[0199] 基于针对1-甲基-4-苯基吡啶鎓(MPP)诱导的神经元细胞死亡的保护作用,评估(i)每种主要大麻素,(ii)每种次要大麻素,(iii)每种选择萜烯,(iv)子混合物(ENT)1-12和(v)每种ENT混合物分别与两种主要大麻素中的每一种组合的神经保护作用。MPP是已知其在注射后引起人类帕金森病的MPTP(1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶)的活性代谢物。众所周知,MPP被摄入多巴胺能神经元中,干扰线粒体中的氧化磷酸化,降低多巴胺水平,并逐渐导致细胞死亡。MPP通常用于其中有效治疗帕金森病的药剂的细胞试验。

[0200] 在Cath.a细胞(CNS儿茶酚胺能细胞系)上体外进行MPP测定。细胞根据ATCC指导培养,参见<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-11179.aspx>,并在实验前通过血清剥夺(0.5%FBS培养,36小时)诱导至CAD分化状态,基本上如Qi等人,J.Neuroscience,17(4):1217-1225(1997)中所述。

[0201] 通过在应用MPP后18小时将每种化合物或化合物的混合物应用于细胞培养物来测试神经保护作用。在暴露于MPP后24小时(其是在暴露于测试化合物或化合物混合物后6小时)评估细胞活力。

[0202] 在3种不同浓度下测试每种单个化合物的神经保护作用,如图1A-B中所述。在附图中,化合物的保护作用表示为与对照(无添加的化合物)相比,MPP诱导的细胞死亡的%救援。每个数据点代表在每种主要或次要大麻素的特定浓度(1、10或100 μ M)下获得的24个实验结果的平均。通过在三个不同的日子重复八个独立实验三次来获得二十四实验结果(“8 \times 3”)。

[0203] 主要和次要大麻素在10 μ M或100 μ M浓度下显示出一些神经保护作用。然而,即使在100 μ M浓度下,大多数选择萜烯未显示任何可检测的神经保护作用。

[0204] 还测试了包含次要大麻素和/或选择萜烯的子混合物(ENT 1-12)的神经保护作用。ENT1-12的组成描述于图2中。在每个实验中,应用ENT混合物以使得ENT混合物的每种成分的最终摩尔浓度变为10 μ M。每种ENT在没有主要大麻素、具有10 μ M(终浓度)CBD和10 μ M(终浓度)CBN的情况下测试。如上所述测试和分析它们的神经保护作用,并在图3A-3B中给出。

[0205] 在图3A中,“实际效应”栏显示了测量子混合物(ENT 1-12)及“无主要大麻素”、“大麻二酚(10 μ M)”和“大麻酚(10 μ M)”的保护作用的实际实验数据。每个数据点代表以10 μ M浓度的每种成分进行的24个(8 \times 3)独立实验的平均。标准偏差用括号表示。“个体效应的总和”栏提供了用相应子混合物的单个成分(参见图1A和1B)及“无主要大麻素”、“大麻二酚(10 μ M)”或“大麻酚(10 μ M)”观察到的保护作用的计算总和。如果单个化合物的作用是独立的并且严格地加性的,则“个体效应的总和”估算保护作用。

[0206] 图3A-3B中的数据显示当不存在主要大麻素的情况下施用某些子混合物的协同作用。

[0207] 例如,没有主要大麻素的ENT8(大麻环萜酚和次大麻二酚)使MPP诱导的细胞毒性降低了23%,而其单个成分的保护作用的总和仅为10%。类似地,ENT1(包含所有3种次要大麻素和所有5种选择萜烯)使MPP诱导的毒性降低37%,而其单个成分的作用总和为12%。ENT10(所有3种次要大麻素和2种选择萜烯,柠檬烯和芳樟醇)使MPP诱导的毒性降低了31%,而其单个成分的救援作用总和仅为12%。大麻素和子混合物的实际效应与计算的个体效应总和之间的差异(参见图3B中的双箭头)代表协同作用。

[0208] 当ENT混合物与主要大麻素一起施用,观察到更大的协同作用。结果如图3A所

示,分别对于ENT加大麻二酚的第五栏中以及对于ENT和大麻酚的第七栏。还提供了其各成分的救援作用的总和用于比较。

[0209] 数据也呈现为图3B中的线图。图3B中的实线显示了“实际效应”数据,其说明了如在MPP测定中测量的具有或不具有主要大麻素(CBN或CBD)的子混合物(ENT 1-12)的保护作用。虚线表示基于图1A-1B中所示的数据的“个体效应的总和”,混合物的单个成分的保护作用的总和。用双向箭头表示的线之间的距离是协同作用的量度。

[0210] 我们已经确定了几种降低MPP诱导的细胞毒性超过50%的组合物:例如,ENT10+大麻二酚使毒性降低64%;ENT1+大麻二酚降低细胞毒性62%;ENT6+大麻二酚降低细胞毒性51%;和ENT10+大麻酚提供51%的救援。保护程度显著高于个体效应的总和:例如,对于ENT10+大麻二酚的单个成分效应的总和仅为26%;对于ENT1+大麻二酚为26%;对于ENT6+大麻二酚为24%;和对于ENT10+大麻酚为17%(图3A-B)。

[0211] 这些数据预测了这些组合物在预防或减少帕金森病和其他神经变性疾病中的神经变性中的功效。此外,在没有THC的情况下观察到功效。

[0212] 5.9.2. 实施例2:含大麻素的复合混合物的多巴胺释放作用

[0213] 我们选择在实施例1中显示出较高神经保护作用的某些组合物,并测试它们对PC12细胞的多巴胺释放的作用。

[0214] 我们在施用PMA/离子霉素(阳性对照)或测试组合物后30分钟从3个重复孔中收集上清液样品,并使用来自Abnova的多巴胺ELISA试剂盒(http://www.abnova.com/protocol_pdf/KA1887.pdf)测量培养基中的多巴胺。PMA/离子霉素公知是通过激活多种细胞内激酶途径(PMA)和提高细胞内游离钙水平(离子霉素)而促分泌的(促分泌素)。

[0215] 测试结果在图4中显示为相对于PMA/离子霉素的分泌增加百分比。“无主要大麻素”栏提供的数据说明了在没有主要大麻素的情况下子混合物的多巴胺释放作用。“大麻二酚(10 μ M)”栏提供了说明相应子混合物之一与10 μ M大麻二酚组合的多巴胺释放作用的数据。“大麻酚(10 μ M)”栏提供了说明所示子混合物与10 μ M大麻酚组合的多巴胺释放作用的数据。

[0216] 响应于不同组合物的多巴胺释放量表示为与响应于PMA/离子霉素(阳性对照)的多巴胺释放量相比的百分比(%)。

[0217] ENT和/或主要大麻素组合物显著增加多巴胺释放。例如,ENT1+大麻二酚具有PMA/离子霉素刺激作用的146%,ENT8+大麻二酚具有138%,ENT1单独具有131%,以及ENT1+大麻酚具有131%。

[0218] 5.9.3. 实施例3:钙流入反筛选的开发

[0219] 许多调查研究表明,用于PD的有效治疗剂不仅应针对多巴胺产生的恢复,还应解决钙过载诱导的细胞死亡的问题。参见,例如,Cali等,Cell Tissue Res.357(2):439-54(2014);Kang等,Nature Communications 3,Article number:1146(2012)。

[0220] 因此,我们研究了HEK野生型细胞、过表达TRPV1的HEK细胞和Cath.a细胞对TRPV1诱导的钙介导的细胞死亡的易感性。

[0221] 将细胞接种到组织培养皿中,并用媒介(HEK野生型和Cath.a)或四环素(1微摩尔)处理16小时,以在37 $^{\circ}$ C,95%的CO₂气氛中诱导TRPV1表达(HEK-TRPV1)。洗涤后,用含有3%的FBS和10毫摩尔CaCl₂或零添加的CaCl₂和1毫摩尔EGTA的改性纳林格溶液代替培养基。细

胞然后用媒介或辣椒素 (1 μ M) 刺激80分钟,然后用细胞刮片脱离并重悬于含有10% (v/v) 台盼蓝的培养基中。2分钟后,在血细胞计数器中计数7微升细胞悬浮液的等分试样,并对至少200个细胞的视野进行台盼蓝阳性或阴性状态评分。

[0222] 图6A和6B显示TRPV1可介导Cath.a神经元中的钙依赖性细胞死亡。图6A显示在HEK野生型细胞、用TRPV1表达构建体转染的HEK细胞和Cath.a细胞中存在10mM外部CaCl₂的情况下在80分钟时的细胞死亡(通过台盼蓝阳性测量),在每种情况下不存在刺激(左条)和用250nM辣椒素刺激80分钟后(右条),表明辣椒素可诱导Cath.a细胞中的细胞死亡。图6B显示在HEK野生型细胞、用TRPV1表达构建体转染的HEK细胞和Cath.a细胞中,不存在外部钙的情况下80分钟时的细胞死亡(台盼蓝阳性细胞百分比),在每种情况下没有刺激(左条)和用250nM辣椒素刺激80分钟后(右条),确认如图6A中所示的辣椒素诱导的Cath.a细胞死亡取决于外部钙的存在。

[0223] 为了评估含大麻素的复合混合物触发TRPV1钙流入和潜在细胞死亡的可能性,我们基于目前在美国内华达州(Nevada,USA)医疗使用的大麻品种的实际化学谱制备了大麻素和萜烯的复合混合物,即株系A混合物。通过故意省略THC和THCA以及省略某些不稳定或不溶性组分,株系A混合物中的实际化学谱进行改变。

[0224] 用pcDNA6TR (Invitrogen,CA) 质粒(编码四环素敏感性TREx阻遏蛋白)稳定转染HEK293细胞系,并保持于37 $^{\circ}$ C下湿润的5%CO₂气氛中的DMEM+10%胎牛血清中(在55 $^{\circ}$ C下灭活1小时)+2mM谷氨酰胺中。通过在10 μ g/ml杀稻瘟素(Blasticidin,Sigma,St Louis,MO)中连续培养维持对TREx 293细胞的选择压力。

[0225] 为了产生具有诱导型TRPV1表达的TREx HEK293细胞,亲本细胞用pcDNA4TO载体中的大鼠TRPV1 cDNA电穿孔,并通过在400 μ g/ml zeocin(Invitrogen,CA)存在下的有限稀释来选择克隆细胞系。使用1 μ g/ml四环素在37 $^{\circ}$ C下诱导TRPV1表达16小时。使用抗FLAG蛋白质印迹筛选稳定细胞系的诱导型蛋白质表达,并确认诱导型表达。电生理学测量进一步证实了在这些诱导细胞中TRPV1的存在和I/V曲线“特征”。

[0226] 在细胞培养系统中通过钙测定来测试由TRPV1介导的钙反应。洗涤细胞并用0.2 μ M 氟-4-乙酰氧基甲酯(“Fluo-4”)在37 $^{\circ}$ C下在以下组成(以mM计)的标准修饰的林格氏溶液中孵育30分钟:NaCl 145,KCl 2.8,CsCl 10,CaCl₂ 10,MgCl₂ 2,葡萄糖10,Hepes \cdot NaOH 10,pH 7.4,330mOsm。将细胞以50,000个细胞/孔转移到96孔板中,并如所示进行刺激。使用Flexstation 3(Molecular Devices,Sunnydale,USA)获取钙信号。使用SoftMax[®]Pro 5(Molecular Devices)分析数据。在指示的情况下,通过制备含有1mM EGTA的0mM CaCl₂的Ringer溶液实现名义上无钙的外部条件。在指示的情况下,辣椒素(10 μ M)和离子霉素(500nM)用作阳性对照以诱导钙反应。在其中指示特异性拮抗TRPV1介导的钙反应的情况下使用辣椒平(Capsazepine)(10 μ M)。在指示的情况下,减去基线踪迹(无刺激,NS)。在指示的情况下,减去仅载体的印迹。在指出的情况下,将包含与相应混合物匹配的各种稀释剂的媒介用作阴性对照。

[0227] 响应于株系A混合物,测试HEK细胞和表达TRPV1的HEK细胞的TRPV1介导的钙流入。图7显示了作为Fluo-4相对荧光单位(Fluo-4RFU)随时间(秒)测量的钙流数据。如图7中所提供的,响应于株系A混合物的应用,观察到显著的TRPV1介导的钙流。

[0228] 这些数据表明,用于治疗神经变性疾病的含大麻素的复合混合物,特别是旨在保

持多巴胺能细胞功能和活力的含大麻素的复合混合物,应对于触发TRPV1介导的钙流入的能力进行反筛选,并设计为省略或以降低的水平包含触发TRPV1依赖性钙流入的大麻素和萜烯。

[0229] 5.9.4. 实施例4:含大麻素的复合混合物的反筛选

[0230] 如实施例3中所述,评估子混合物(ENT) 1-12和单独地与两种主要大麻素中的每一种组合的每种ENT混合物的HEK细胞和表达TRPV1的HEK细胞的钙介导的流入,且证明触发最小的TRPV1介导的钙流入。特别是,ENT1+大麻二酚、ENT8+大麻二酚、单独ENT1以及ENT1+大麻酚被证明触发最小的TRPV1介导的钙流入。

[0231] 6. 通过引用引入

[0232] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文献出于所有目的通过引用整体并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请或其他文献被单独指出为出于所有目的通过引用并入。

[0233] 7. 等同:

[0234] 本公开尤其提供含大麻素的复合混合物的组合物。本公开还提供了通过施用含大麻素的复合混合物来治疗神经变性疾病的方法。虽然已经说明和描述了各种具体实施方式,但是上述说明书不是限制性的。应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以进行各种改变。在阅读本说明书后,许多变化对于本领域技术人员而言将变得显而易见。

	测试化合物	浓度(μm)	MPP诱导细胞毒性的预防(%), (SD)
对照	无	0	0
		1	0
主要大麻素	大麻二酚	10	14 (2.5)
		100	18 (3.3)
		1	7 (0.3)
	大麻酚	10	5 (1.0)
		100	0
		1	0
次要大麻素	大麻环萜酚	10	0
		100	3 (0.1)
		1	0
	大麻萜酚	10	2 (0.25)
		100	3 (1.1)
		1	9 (1.2)
次大麻二酚	10	10	10 (1.3)
		100	14 (1.6)

图1A

测试化合物	浓度(μm)	MPP诱导细胞毒性的预防
柠檬烯	1	0
	10	0
	100	0
芳樟醇	1	0
	10	0
	100	0
橙花叔醇	1	0
	10	0
	100	4 (0.2)
松萜	1	0
	10	0
	100	0
叶绿醇	1	0
	10	0
	100	0

图1B

子混合物	
ENT1	3 次要大麻素(大麻环萜酚/大麻萜酚/次大麻二酚) 5 选择萜烯(柠檬烯/芳樟醇/橙花叔醇/松萜/叶绿醇)
ENT2	5 选择萜烯(柠檬烯/芳樟醇/橙花叔醇/松萜/叶绿醇)
ENT3	3 次要大麻素(大麻环萜酚/大麻萜酚/次大麻二酚)
ENT4	1 次要大麻素(大麻环萜酚) 5 选择萜烯(柠檬烯/芳樟醇/橙花叔醇/松萜/叶绿醇)
ENT5	1 次要大麻素(大麻萜酚) 5 选择萜烯(柠檬烯/芳樟醇/橙花叔醇/松萜/叶绿醇)
ENT6	1 次要大麻素(次大麻二酚) 5 选择萜烯(柠檬烯/芳樟醇/橙花叔醇/松萜/叶绿醇)
ENT7	2 次要大麻素(大麻环萜酚/大麻萜酚)
ENT8	2 次要大麻素(大麻环萜酚/次大麻二酚)
ENT9	2 次要大麻素(大麻萜酚/次大麻二酚) 4 选择萜烯(柠檬烯/芳樟醇/橙花叔醇/松萜/叶绿醇)
ENT10	3 次要大麻素(大麻环萜酚/大麻萜酚/次大麻二酚) 2 选择萜烯(柠檬烯/芳樟醇)
ENT11	3 次要大麻素(大麻环萜酚/大麻萜酚/次大麻二酚) 1 选择萜烯(橙花叔醇)
ENT12	3 次要大麻素(大麻环萜酚/大麻萜酚/次大麻二酚) 2 选择萜烯(松萜/叶绿醇)

图2

	主要大麻素							
	无主要大麻素		大麻二酚(10 μm)		大麻酚(10 μm)		实际效应	
	个体效应的总和	实际效应	个体效应的总和	实际效应	个体效应的总和	实际效应	个体效应的总和	实际效应
ENT1	12	37 (3.8)	26	62 (3.1)	17	48 (2.1)		
ENT2	0	4 (1.1)	14	16 (3.0)	5	6 (0.1)		
ENT3	12	25 (0.5)	26	31 (2.2)	17	41 (4.6)		
ENT4	0	6 (0.7)	14	16 (2.2)	5	9 (0.4)		
ENT5	2	5 (1.0)	16	14 (2.9)	7	13 (1.6)		
ENT6	10	29 (3.4)	24	51 (4.4)	15	53 (2.5)		
ENT7	2	9 (2.1)	14	20 (2.0)	7	7 (1.2)		
ENT8	10	23 (1.3)	24	44 (3.9)	15	26 (2.7)		
ENT9	12	18 (1.5)	26	36 (2.7)	17	21 (1.9)		
ENT10	12	31 (0.7)	26	64 (6.2)	17	51 (1.4)		
ENT11	12	22 (1.8)	26	33 (2.6)	17	36 (2.4)		
ENT12	12	16 (0.9)	26	27 (2.6)	17	37 (3.6)		

MPP诱导细胞毒性的预防 (% (SD))

图3A

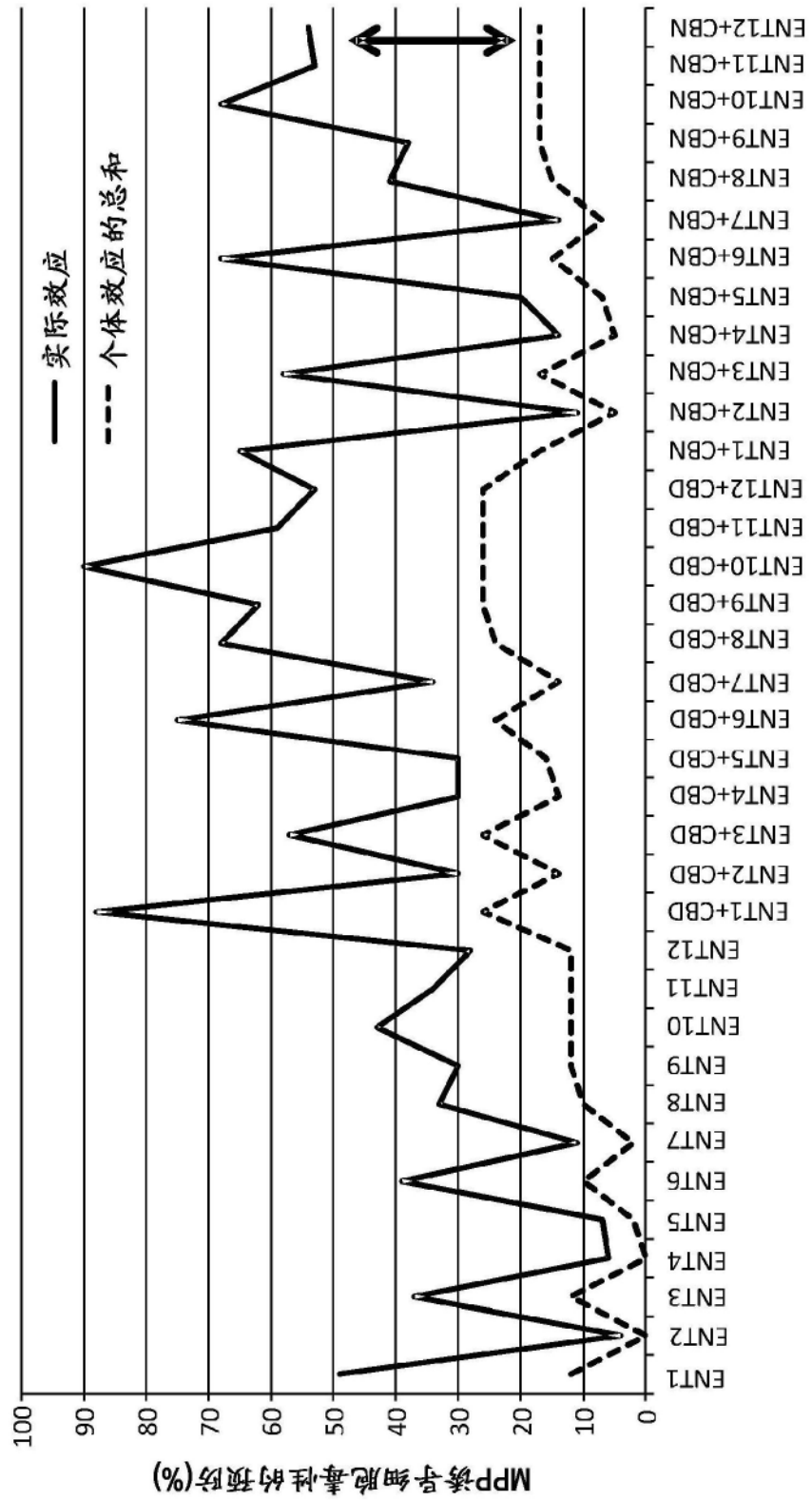


图3B

	主要大麻素		
	无主要大麻素	大麻二酚(10 μm)	大麻酚(10 μm)
ENT1	131	146	131
ENT2	101	107	106
ENT3	121	118	114
ENT4			
ENT5			
ENT6	115	122	118
ENT7			
ENT8	119	138	
ENT9			
ENT10	113	116	118
ENT11	111	103	104
ENT12			

相对于PMA/Iono诱导的多巴胺分泌的多巴胺分泌(%)

图4

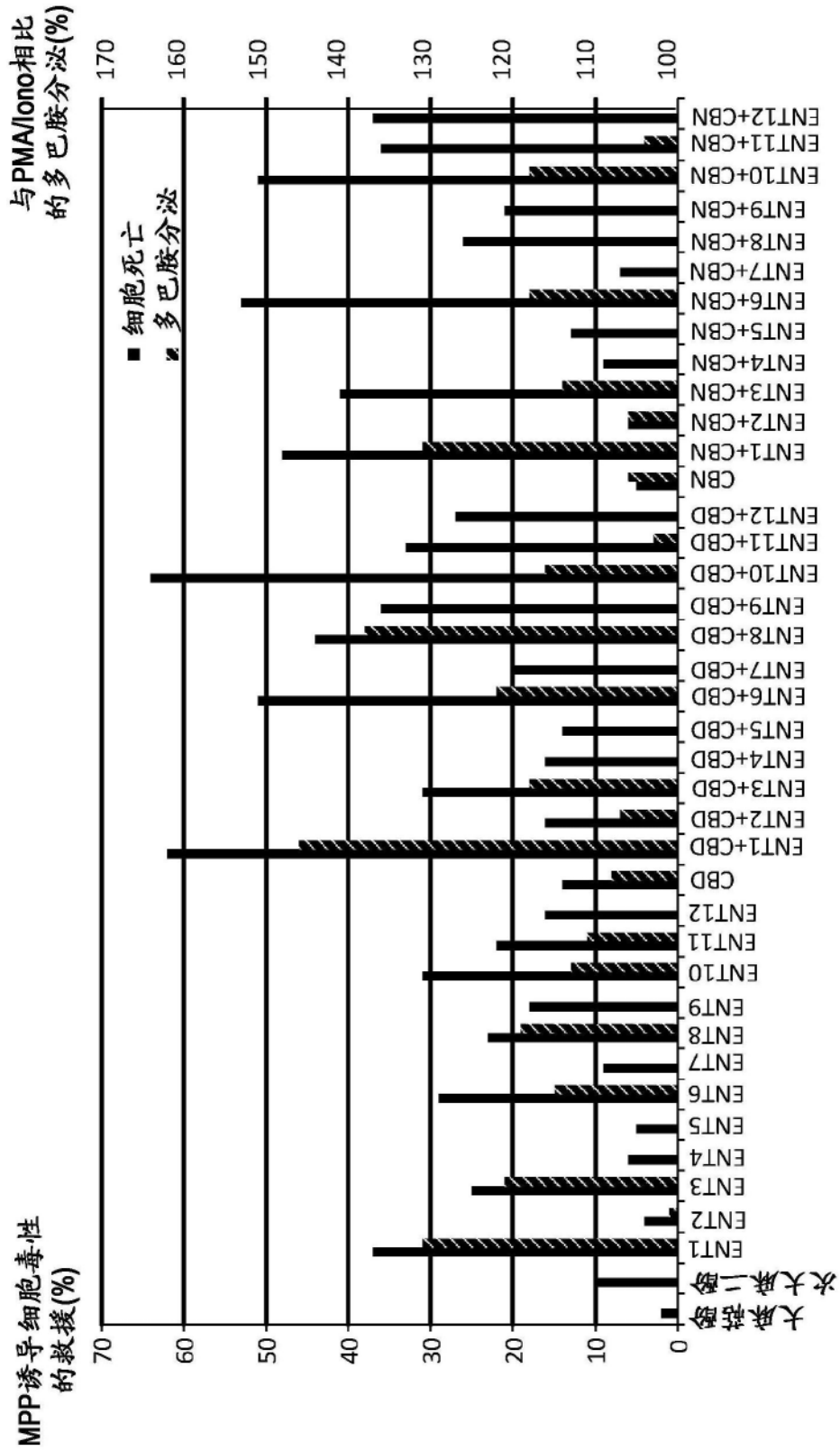


图5

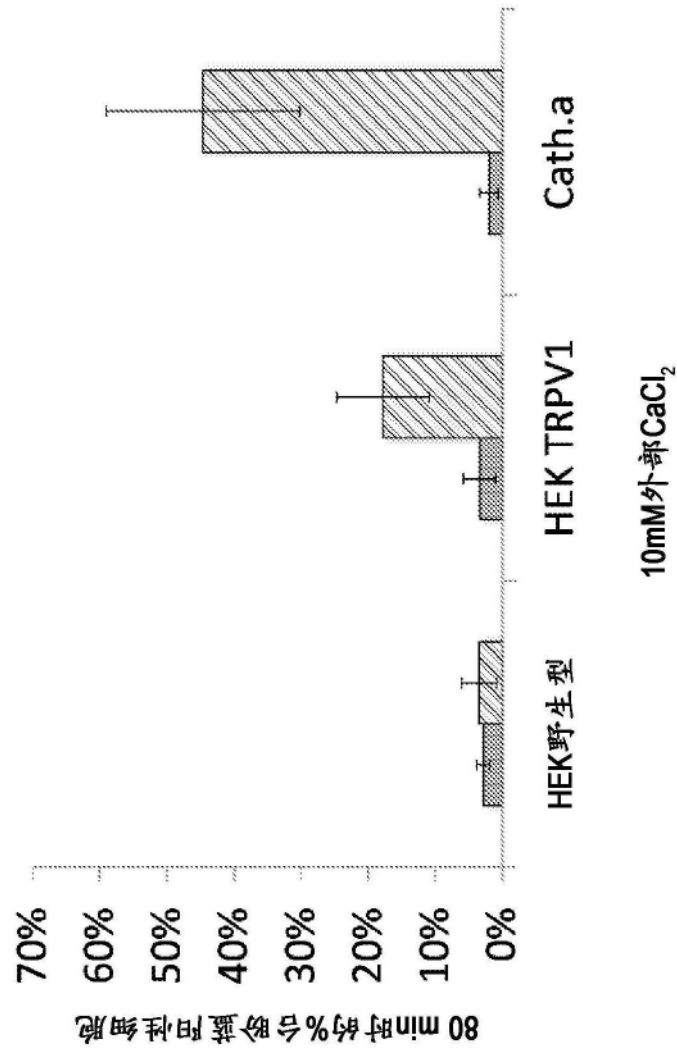


图6A

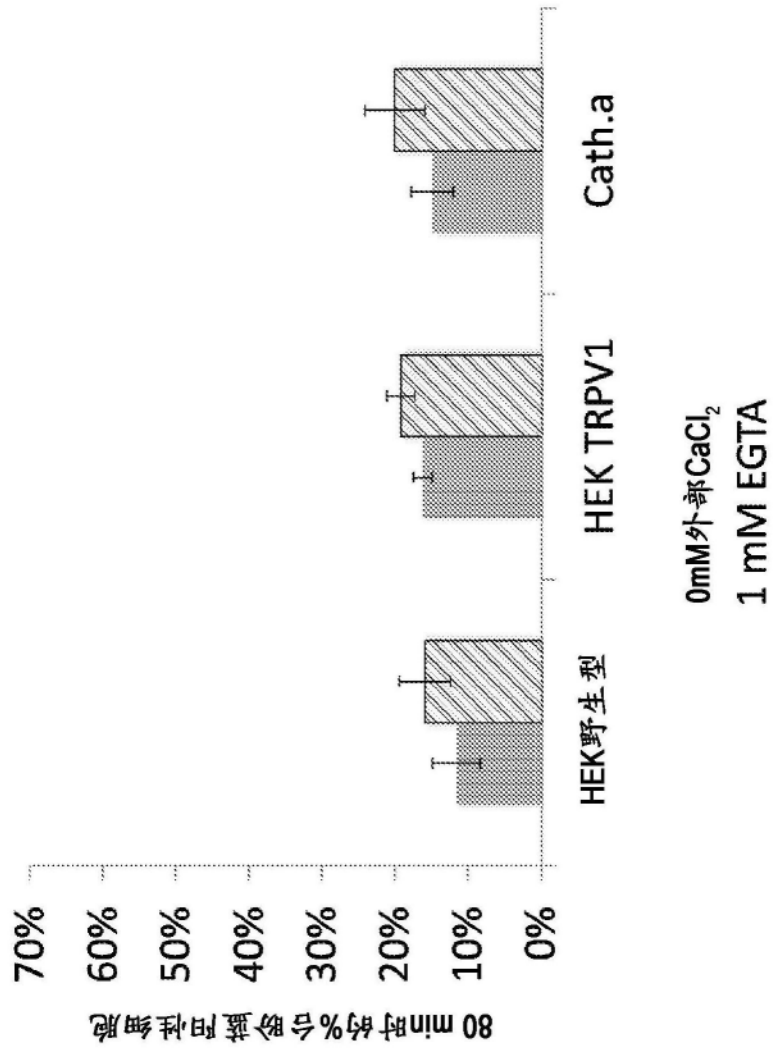


图6B

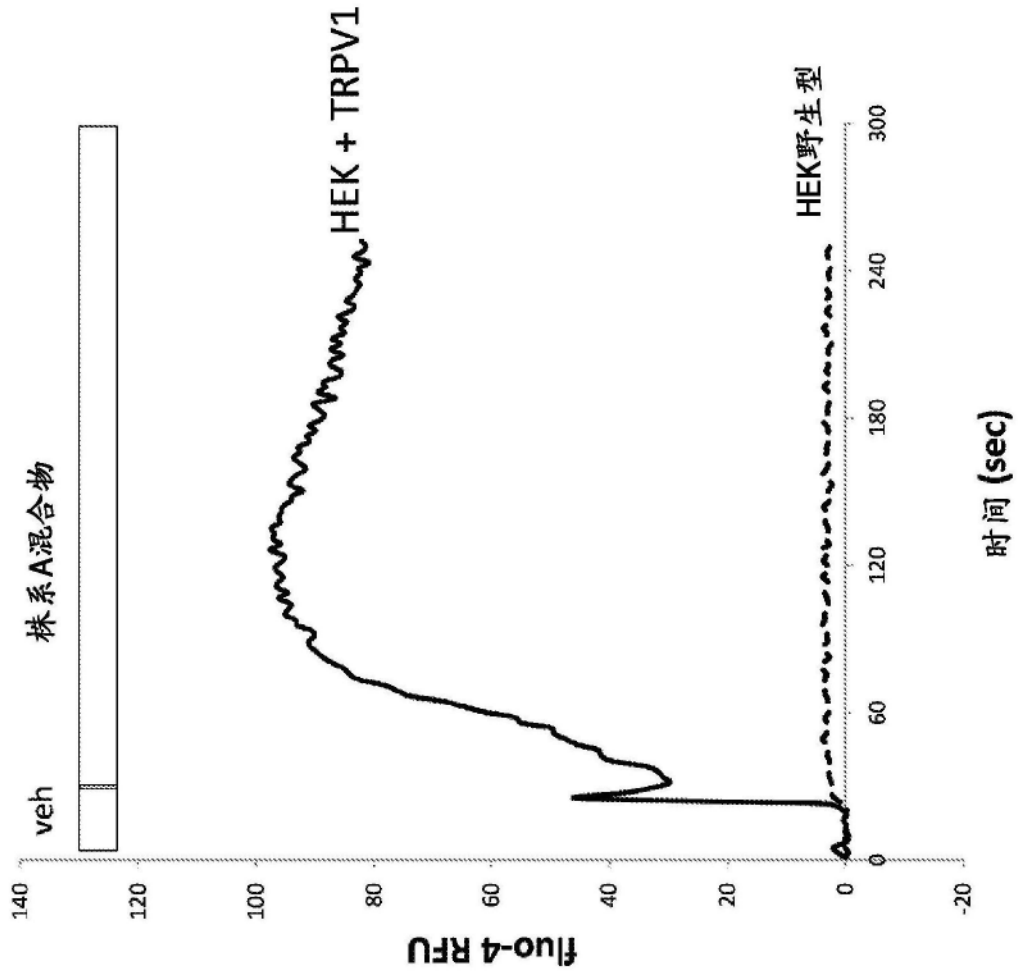


图7