

PROYECTO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO PARA LA PRODUCCION DE CANNABIS SATIVA

Título del proyecto

“Proyecto de estandarización de producción de extractos de Cannabis con propiedades medicinales”

CANNTEK S.A. es una empresa biotecnológica conformada por un equipo multidisciplinario con experiencia de varios años en el estudio, cultivo e industria del Cannabis con fines industriales y medicinales en la República Oriental del Uruguay y en el ámbito del territorio nacional argentino.

A raíz de las experiencias satisfactorias recolectadas en el desarrollo de la actividad, es que tenemos como objetivo adaptar las técnicas de producción de Cannabis a la realidad argentina. A través de la experiencia adquirida, tenemos la capacidad de producir Cannabis en forma estandarizada. Es decir que, a través del control de los parámetros de producción, logramos la estandarización de la genética vegetal, lo que conlleva a producir variedades con niveles consistentes de cannabinoides, flavonoides y terpenos. La estandarización garantiza una composición de dosis uniforme, permitiendo a los pacientes y médicos suscriptores poder adaptar la dosis correspondiente a cada prescripción.

Es por esta razón que lograr llevar adelante programas de investigación con institutos nacionales, universidades, cooperativas cannábicas y ONGs nos permitiría probar la seguridad, eficacia y resultados a través de múltiples ensayos clínicos.

La misión de nuestra empresa es poder implementar nuestra experiencia y trayectoria en la investigación y producción de Cannabis medicinal en Argentina, para lo cual entendemos que este proceso debe ser certificado siguiendo los estándares más altos de calidad a nivel internacional. Para esto último, las guías que marcan nuestro trabajo son aquellas que se encuadran como BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS Y DE RECOLECCIÓN PARA PLANTAS MEDICINALES Y BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN (GMP).

La realidad argentina actual en relación al nuevo mercado incipiente, pero próspero y las últimas actualizaciones normativas en la materia nos brinda la posibilidad de realizar nuestro proyecto en el país.

Por otra parte, las investigadoras del CONICET, la Dra. Sandra Churio y Dra. Alejandra Fanovich forman parte de la Red Argentina de Investigadores en Cannabis Medicinal

(RACME) desde su creación y son asesoras científicas de la ONG Cannabis Medicinal Argentina (CAMEDA). Asimismo han participado como docentes colaboradoras en el dictado del "Curso de formación sobre *Cannabis sativa*: De la planta a la formulación", actividad de posgrado que se ofrece en la FCEyN de la UNMDP.

Sus antecedentes científicos en la temática se ven reflejados en la redacción de dos capítulos de libro sobre Cannabis medicinal:

*Ramírez C.L., M.A. Fanovich, M.S. Churio, "CANNABINOIDS: extraction methods, analysis and physicochemical characterization", Chapter in Studies in Natural Products Chemistry, Ed. Atta-ur-Rahman (2019) Elsevier, Vol.61, 143-173, ISSN 1572-5995, ISBN 9780444641830.

*Fanovich, M.A., Churio, M.S., Ramirez, C.L., "Medicinal cannabis: Pharmaceutical forms and recent analytical methodologies", Chapter in Comprehensive Analytical Chemistry, 2020, 90, pp. 31-63. ISBN: 978-0-444-64341-4.

La Dra. Luciana Barbini tiene experiencia y antecedentes en el estudio de la actividad biológica de extractos de diferentes plantas, en relación con la actividad citotóxica, antitumoral y antiviral en la salud humana. Sus investigaciones han sido plasmadas en diversas reuniones y publicaciones científicas, como ser:

✓ Kott V, Barbini L, Cruañes M, Muñoz J de D, Vivot E, Martino V, Ferraro G, Cavallaro L, Campos R. Antiviral activity in argentine medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 1999; 64:79-84.

✓ Barbini L, Lopez P, Ruffa J, Martino V, Ferraro G, Campos R, Cavallaro L. Induction of apoptosis on human hepatocarcinoma cell lines by an alkyl resorcinol isolated from *Lithraea molleoides*. World Journal of Gastroenterology. 2006 Oct 7; 12(37):5959-63.

✓ Martínez MJ, Andreu A, Barbini L. Plant polyphenolic extracts as potential human anti-hepatocarcinoma agents. Minireview, Plant Science Today 2014 Oct; 1(4): 213-218. <http://dx.doi.org/10.14719/pst.2014.1.4.62>

✓ Martínez MJ, Barbini L, Andreu AB. Chemical characterization of polyphenol extracts from Andean and industrial *Solanum tuberosum* tubers and their cytotoxic activity on

human hepatocarcinoma cells. SDRP Journal of Food Science and Technology, 2018 Feb; 2(2):205-217. Epub: Dec 2017. doi:10.25177/JFST.2.2.5.

Dentro de ese marco, y a los fines de ejecutar en forma conjunta y articulada los objetivos dispuestos por la Ley Nacional 27.350/17 y la ley provincial 14924 , las partes acordaron firmar el Convenio marco de cooperación: Convenio PR5679 (CONICET- CANNTEK S.A.), Proyecto Desarrollo de productos controlados de Cannabis para uso medicinal. EX-2022-128192889-APN-GVT#CONICET.

Por todo lo mencionado se tiene como objeto inmediato solicitar a los organismos nacionales correspondientes la Homologación del convenio de I+D celebrado entre CANNTEK S.A Y CONICET para materializar dicho proyecto de investigación del cultivo de Cannabis.

Se adjunta convenio aprobado de I + D entre CONICET y CANNTEK S.A., anexos 1 y 2 y adenda al convenio original.-

I.I OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la producción de extractos de Cannabis con propiedades medicinales en total acuerdo con la normativa nacional vigente, siguiendo las directivas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en materia de buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales; y desarrollar nuevas formas de administración de extractos de Cannabis medicinal.

I.II OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A.1- Desarrollar técnicas que permitan el cultivo de variedades de Cannabis sativa y el desarrollo del perfil genético de las variedades para su posterior aplicación en monitoreo de la descendencia. Estudiar la adaptabilidad de variedades de Cannabis de diversas latitudes a la zona propuesta.

A.2- Desarrollar un protocolo estandarizado de obtención de extractos de Cannabis a partir de tecnologías limpias. Estudiar y optimizar el proceso de obtención de extractos de Cannabis utilizando tecnología de fluidos supercríticos. Comparar la eficiencia del método con métodos convencionales de extracción.

A3.- Realizar una caracterización completa de los extractos obtenidos

A3a. Caracterización química.

-Caracterizar y cuantificar por técnicas analíticas cromatográficas (HPLC y/o CG-MS) los componentes cannabinoides y terpénicos de los extractos de Cannabis sativa obtenidos por distintas metodologías.

-Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos en base a reacciones de inhibición de especies radicales de prueba mediante Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR). - Determinar la estabilidad de los extractos en presencia y ausencia de iluminación ambiente y saturación con aire.

-Explorar la capacidad de los extractos de fotosensibilizar la formación de especies reactivas de oxígeno mediante irradiación con luz visible.

A3b. Caracterización biológica. Evaluar actividad citotóxica y antiviral.

-Determinar las concentraciones citotóxicas de los extractos en diferentes líneas celulares tumorales humanas, representativas de distintos tipos de cáncer.

-Establecer los mecanismos moleculares implicados en la actividad citotóxica.

-Determinar las concentraciones inhibitorias de la replicación viral de diferentes virus humanos de importancia médica. -Establecer los mecanismos moleculares implicados en la actividad antiviral.

A.4- Obtener prototipos de productos derivados de Cannabis.

Elaborar un protocolo para la preparación de aceites de Cannabis con concentraciones controladas de los principios activos mayoritarios y contrastar su bioequivalencia con productos certificados internacionales. Diseñar y evaluar la potencialidad de obtener micropartículas para contener los principios activos de cannabis.

II. DESCRIPCIÓN TÉCNICA DEL PROYECTO.

II.1 Etapas del proyecto

ETAPA 1

1) Cultivo de material biológico

1.a) Cultivo CANNTEK (la empresa es la responsable de esta actividad)

La empresa es la responsable de la producción inicial del material vegetal para dar inicio a la secuencia de actividades. A continuación, se brindan detalles de los materiales de partida, formas de cultivo, espacio disponible entre otros aspectos para generar el material inicial.

Material de origen:

A.- Se utilizará germoplasma nacional de origen desconocido para trabajar en su fitomejoramiento y lograr a posteriori su inscripción dentro del registro de variedades de cannabis de INASE. La resolución que habilita a no declarar el origen de este tipo de germoplasma es la Resolución Conjunta INASE - Ministerio de Salud N° 5/2021.

B.- Se importarán semillas del banco trilogene seeds y Dinafem Seed variedades tanto altas en CBD y bajas en THC como altas en THC y bajas en CBD, esto para poder experimentar con diferentes combinaciones de ambos cannabinoides dominantes para buscar la mejor eficiencia en diferentes patologías.

Estas variedades pueden encontrarse sujetas a disponibilidad y a que el banco de semillas esté dispuesto a enviar al país. De ser esto imposible se buscará otro banco de semillas que pueda proveer semillas de similares características. Asimismo, las variedades pueden ser modificadas con el fin de poder atender mejor las patologías necesarias, según se converse con los diferentes entes involucrados. Cabe aclarar que simplemente se muestran las variedades que se podrían conseguir con el fin de mostrar el interés de trabajar con variedades que tengan fines medicinales.

Actualmente CANNTEK ha iniciado el trámite frente a INASE para darse de alta en el Registro Nacional de Comercio y Fiscalización de Semillas (RNCyFS) como criadero de semillas de cannabis. La selección del germoplasma y sus variables está a cargo del Ing. Agrónomo Ignacio Luis Álvarez, matrícula 02528, responsable técnico del proyecto y frente a INASE.

Técnicas de cultivo:

El Cannabis es una planta que se puede cultivar con distintas técnicas, nosotros proponemos comenzar este proyecto con algunas ya utilizadas anteriormente en proyectos anteriores (desarrollados en Uruguay) como son las técnicas de cultivo en invernaderos tipo macrotúnel, de tipo "palo y nailon" y parcelas a cielo abierto. En los invernaderos se probarán métodos de cultivo en suelo orgánico vivo y cultivo hidropónico. Comenzando por las más sencillas y probando con otras a medida que se crea conveniente.

Los hongos, insectos, bacterias y el estrés climáticos son los enemigos número uno de un producto de calidad farmacéutica, es por ello que es de fundamental importancia la utilización de correctas técnicas de cultivo, la implementación de suelo vivo, hongos benéficos, micorrizas y fertilización orgánica para lograr los estándares más altos de calidad.

A continuación describiremos brevemente la técnica de cultivo en invernadero y a cielo abierto que son las que se estiman más convenientes.

Cultivo en invernadero:

La técnica de cultivo de cannabis en invernadero tipo macrotunel provee beneficios no sólo a nivel de cultivo sino también a nivel económico. Esta técnica consiste en la construcción de invernaderos, con cubierta translúcida para poder aprovechar la luz solar al máximo disminuyendo el uso de luz artificial, ayudando con la protección del invernadero a controlar plagas, humedad y temperaturas requeridas por el cultivo. Se puede acompañar este invernadero de focos de luz artificial para simular las condiciones climáticas requeridas por el cultivo en condiciones que el clima de la zona no los provea. También se puede contar con sistemas de *black out* cuando se requiera regular las horas de luz que se desea que la planta se encuentre expuesta para poder obtener el mejor rendimiento de cada cultivo.

Además, este tipo de invernadero debe equiparse con sistemas de ventilación natural y/o forzada, sistemas de humidificación, calefacción por agua y/o aire caliente, así como sistemas de control de clima, riego y fertirrigación. El cultivo en invernadero puede ser llevado a cabo en macetas o a tierra directa, nosotros buscaremos utilizar ambos para poder estudiar mejor las adaptabilidades de la planta a la zona con diferentes metodologías, aprovechando los beneficios que cada una posee.

Cultivo a cielo abierto:

La técnica de cultivo a cielo abierto si bien se encuentra más limitada en materia de control de la planta, provee numerosos beneficios a fin de obtener un cultivo de mayor tamaño. Consiste en la obtención de plantines de tamaño adecuado para que no sea vulnerable al exterior, ubicado en parcelas de tierra para que puedan desarrollar raíces y tamaños mayores que el que se lograría en las condiciones limitantes de una maceta. Esto limita a plantar en diferentes épocas del año para poder aprovechar al máximo las condiciones climáticas naturales, las cuales serán analizadas por el equipo técnico para determinar cuáles son las más propicias para la zona. Se utilizará una superficie aproximada de 3000 m² para la producción a cielo abierto.

Método de producción:

Una vez obtenidas las semillas, las mismas se germinarán en un área especial para esta tarea.

A través de una selección rigurosa se elegirán las mejores plantas, teniendo en cuenta el tamaño y el desarrollo que las mismas vayan presentando. Estas serán trasladadas a otro habitáculo, y se encontrarán en etapa de vegetación el tiempo necesario para poder obtener la cantidad de esquejes requeridos para complementar con el ciclo siguiente (los esquejes

seleccionados de germoplasma nacional de origen desconocido se utilizarán además para trabajar en su fitomejoramiento).

A medida que vamos obteniendo los esquejes los mismos serán colocados en pequeñas macetas con tierra o jiffys donde las mismas se colocarán en las condiciones de temperatura y humedad necesaria para poder generar las raíces propias. Una vez desarrollados los esquejes y encontrándose en las condiciones necesarias para poder ser trasplantadas las mismas se irán acomodando en macetas de un mayor tamaño dentro de los invernaderos, y en la parcelas de exterior, para comenzar su desarrollo.

Dentro de los invernaderos se instalarán distintos paneles de luz artificial que ayudarán al crecimiento y desarrollo de las plantas en cuanto se necesite. Se buscará siempre utilizar la menor cantidad de luz artificial necesaria, teniendo en cuenta que a mayor uso energético mayores costos y mayor contaminación. Las plantas que se encuentren en parcela exterior se acomodan en hileras, dejando un paso entre hilera e hilera para poder revisar cada planta en particular y tener un control exhaustivo de las mismas debido a que el control en exterior en cuanto a plagas o problemas de suelo puede ser de mayor complicación que interior. Dicho esto, sabemos que el control en interior puede generar complicaciones en cuanto a condiciones de humedad o temperatura que serán controladas con distintas tecnologías, pero permite un mayor control para un mejor desarrollo, y en el exterior el desarrollo puede llegar a presentar otras complicaciones las cuales serán estudiadas.

Una vez completado el ciclo de las plantas, las mismas serán cortadas y colocadas en un cuarto de secado, donde tendrán que permanecer un tiempo estipulado de aproximadamente un mes para completar el proceso de secado y curado. Este proceso debe ser llevado a cabo en unas condiciones de humedad relativa del ambiente de 45% a 60% para prevenir la aparición de patógenos y a una temperatura de 15 y 18°C para prevenir que se volatilicen diversos compuestos químicos.

Una vez que el porcentaje de humedad de la materia prima alcance el 10% de humedad, se procederá al corte de flores (cogollos), los cuales serán separados de los tallos y las hojas, proceso al cual llamaremos manicura o trimmeado. En este proceso una persona con una tijera o una maquina separa los cogollos del resto de las plantas pudiendo así separar las diferentes partes de la misma. Terminado el proceso de manicura, los cogollos serán guardados en un habitáculo que presente las condiciones necesarias de temperatura y humedad para su almacenamiento hasta que tengan que ser enviados al laboratorio correspondiente para su estudio y producción de extractos.

Es imposible realizar una estimación anticipada en relación con la cantidad de plantas y definición de cuadros de cultivo por m², ya que las mismas se definen en función de variables que se tienen en cuenta al momento exacto de su último trasplante.

Gestión de plagas

En cuanto a la gestión de plagas, buscaremos tratar las mismas con insecticidas orgánicos, siendo que tratamos con materia que en su posterioridad serán utilizadas como objeto para productos medicinales. No se puede detallar los productos a utilizar debido a que como nos encontramos en etapa de investigación, se desconocen las plagas y otros tipos de malestares que pueda presentar el cultivo en la zona en cuestión.

Gestión de residuos

En materia de residuos, sabemos que la planta de Cannabis tiene numerosos usos, no solo en cuanto a usos medicinales sino también en numerosas industrias como la textil o energética, por lo tanto lo que podríamos catalogar como residuos (tallos y hojas) serán eventualmente entregados a los grupos de investigación asociados a este proyecto para investigar nuevos y mejores usos.

En caso de tener excedente, los residuos serán depositados y acopiados en un sector donde se estará generando tierra nueva, con mecanismos de compostaje. Esto nos permitirá reciclar los residuos obteniendo tierra que será luego utilizada en la misma plantación, mejorando el suelo en el que se encuentran las plantas para su mejor desarrollo.

Trazabilidad

Teniendo en mira la certificación en el momento oportuno de BUENAS PRACTICAS AGRICOLAS (BPA) y BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA (BPM) (Disposición 3602/18 ANMAT, Disposición 3827/18 ANMAT) es que se implementará un sistema de trazabilidad en la que cada plantín será etiquetado con un código de identificación para poder realizar un seguimiento desde la semilla hasta la inflorescencia de cannabis. El manejo de la documentación en forma sistematizada colabora en la mejora cualitativa y cuantitativa en la producción, y permite la evaluación de resultados frente a distintas decisiones estratégicas y ayuda a la creación de confianza en la industria del cannabis.

Espacio físico (CANNTEK)

CANNTEK cuenta con un predio de ~ 5 hectáreas, circunscripto este último dentro del establecimiento estancia "La Trinidad", Ruta 2, km 396, (CP 7612) Camet, Partido de General Pueyrredón,

cual se destinará para el desarrollo y ejecución del presente convenio.

Serán montados dos invernaderos, uno de tipo "palo y nylon" de aprox. 300 m² y otro con alta tecnología de tipo macrotunel con acero galvanizado de aprox. 300 m². Con este último tipo de invernáculo se intentará probar una mayor eficiencia en el control climático, ya que más allá de sus características técnicas que permiten un mejor movimiento en el flujo del aire, se instalarán equipos específicos de control climático, tales como iluminación artificial, sistema de "black out", ventilación y extracción forzada de aire, sistemas de aspersión de vapor de agua y riego por goteo.

Por último, se instalará un espacio adecuado para el procesamiento de la materia vegetal de alrededor de 40 m². Allí se realizará el corte, secado, curado, cierre al vacío, acopio y almacenaje tanto de materia primas como de productos elaborados. El mismo será equipado con sistemas de control de humedad, temperatura y flujo de aire, a fin de alcanzar un rango de HR entre el 45 % a 55 % y una temperatura de 16 a 19 °C.

Seguridad

CERCO PERIMETRAL: Un anillo de seguridad con un cerco olímpico romboidal de 2 pulgadas, 2 metros de alto y 2 filas de alambre de púas con postes cada 3 metros. Todo el perímetro alambrado se encontrará cubierto con lona marítima para mayor seguridad. Contará con portón automático, portero eléctrico y monitoreada por cámaras para evitar posibles ingresos no autorizados mientras ingresa el personal o proveedores.

CCTV: Se instalará un circuito cerrado de 7 cámaras IP de alta resolución y visión nocturna en todo el perímetro, interior de invernaderos y oficinas que se controlan desde el búnker de seguridad. Las grabaciones se alojan en un lugar seguro de las instalaciones con copia en la nube por cualquier eventualidad.

BUNKER: En el predio se construirá un búnker para alojar el personal de seguridad desde donde se monitorean las cámaras de seguridad, accesos etc., con comunicación independiente y también están provistos de botones de pánico para guardias y personal permanente que se conectan vía telefonía celular con la Comisaría de la zona.

ALARMA: El perímetro exterior de los invernaderos contará con barreras infrarrojas, el interior de estos contará con sensores de movimiento que disparan una alarma lumínica-sonora en todo el predio y al búnker de seguridad. La alarma estará conectada con la Policía de la zona.

1.b) Cultivo modelo indoor (la empresa es la responsable de esta actividad junto con la Dra. Fanovich)

Se procederá a armar un cultivo indoor de aprox. 60 m² en el 4to piso del INTEMA, ciudad de Mar del Plata. El mismo tiene como objeto producir inflorescencias de Cannabis con los más altos estándares de calidad, controlando todos los factores ambientales de manera artificial.

Dichas instalaciones disponen de: Iluminación artificial (led y hps), sistema de filtrado de agua por osmosis inversa, sistema de riego por goteo, climatización con sistema de aire acondicionado y ventilación forzada a los fines de regular las condiciones de humedad y temperatura interna.

Se contará con una sala de germinación, lugar en donde se germinarán las semillas y se reproducirán esquejes de plantas madre seleccionadas (reproducción asexual), integrada esta última a una sala para crecimiento vegetativo de aprox. 20 m², una sala de floración de aprox. 30 m² y una sala de corte y secado de aprox. 10 m².

Sistemas de cultivo en indoor

Por un lado, se cultivará en macetas con sustrato vivo buscando un producto final agroecológico. Para la mezcla del sustrato se utilizará humus, tierra, turba, perlita, micorrizas, trichodermas, distintos hongos benéficos, algas marinas y microorganismos eficientes. Se utilizarán fertilizantes orgánicos garantizando un óptimo desarrollo de las raíces y de la masa vegetal. El sustrato vivo favorece a desarrollar plantas más resistentes a plagas y enfermedades, aumenta la expresión de los terpenos y flavonoides, se encuentra libre de químicos y enriquece los suelos evitando el agotamiento.

Por otro lado, se implementará un sistema de cultivo hidropónico por goteo con sustrato inerte. En este sistema el agua sirve como medio de cultivo cargado de nutrientes con un pH y electro-conductividad determinadas y controladas a diario. Para lograr esto, se partirá utilizando agua de ósmosis inversa, a través de la utilización de un filtro y depósito para estos fines. Al estar los nutrientes disponibles inmediatamente, y controlando las necesidades nutricionales de la planta en forma constante se puede lograr un rendimiento mayor en relación con la masa (expresada en kg) x m² de inflorescencias, en comparación al cultivo en tierra. Además, este sistema mejora la calidad microbiológica del producto final, ya que al estar utilizando un medio de cultivo inerte se reducen

considerablemente las infecciones por plagas y enfermedades, garantizando un producto totalmente inocuo.

Etapas de crecimiento vegetativo y floración

Una vez germinada la semilla y/o enraizados los esquejes seleccionados se harán dos trasplantes, el primero a macetas de 3 litros donde continuarán su crecimiento hasta su posterior trasplante a maceta final de 15 litros.

Se implementarán dos fotoperíodos distintos, uno de 18 h de luz y 6 h de oscuridad para la etapa vegetativa, y otro de 12 h de luz y 12 h de oscuridad para la etapa de floración.

Se buscará conservar una temperatura entre el rango de 24 y 28 °C y una HR% del 60 al 80% para la sala de crecimiento vegetativo y del 45 al 60 % para la sala de floración.

Sala de secado

En la misma se realizará el corte y secado del material vegetal. Será equipado con sistemas de control de humedad, temperatura y flujo de aire, a fin de alcanzar un rango de HR entre el 45 % a 55 % y una temperatura de 16 a 19 °C.

ETAPA 2

ACTIVIDAD N° 2: Recepción del material vegetal y caracterización inicial (responsable Dra. Churio, Dra. Barbini, DQBQ)

El material vegetal suministrado por la empresa será evaluado documentando su estado y calidad. Se procederá a la caracterización del material seco previo a la cuantificación de humedad.

Se analizará la composición cuantitativa de los principales cannabinoides (THC, CBD, THCA y CBDA) como así también de metales pesados (plomo y cadmio) y pesticidas. Además, se verificará que las muestras sean aptas microbiológicamente. Se seguirá la normativa vigente: Resolución 781/2022-MS y Disposición 6431/2022-ANMAT.

ACTIVIDAD N° 3: Ensayos de extracción (responsable Dra. Fanovich, INTEMA)

Se realizarán ensayos de extracción a partir de material vegetal (cogollos) tratado y sin tratar térmicamente en un equipo de alta presión (P_{máx}:500 bar, V= 500 mL) HPU500 (Eurotechnica) de INTEMA. Se realizarán tratamientos térmicos a distintas temperaturas para aumentar la descarboxilación de las formas ácidas. Se propone tratar a las muestras a 90, 110 y 140 grados, a tiempos que se optimizarán en la práctica.

Se evaluará el efecto de la presión del sistema, la temperatura, las condiciones de flujo, como así también el tiempo de saturación en los diferentes compartimentos del equipo. Se emplearán materiales con diferentes pre-tratamientos y diferentes concentraciones de co-solvente (el cosolvente se elegirá según las normas ICH de solventes residuales) para facilitar los procesos de extracción con CO₂-SC. Se confeccionarán protocolos de trabajo para cada sistema estudiado con el objetivo de lograr la reproducibilidad de las condiciones de operación en el proceso establecido y de las características del producto. Se analizarán las cinéticas de extracción bajo las distintas condiciones del proceso. Se optimizarán las condiciones de extracción teniendo en cuenta el rendimiento y la naturaleza de los compuestos bioactivos extraídos. Se hallarán las condiciones específicas para lograr la extracción de dos tipos de extractos: 1- Extractos de cannabinoides y 2- Extractos de terpenos. Se realizarán ensayos de extracción convencionales (Soxhlet) con etanol para comparar la calidad de los productos. (INTEMA).

Asimismo, se realizarán ensayos de extracción sobre el material gestionado por la empresa como residuo de la producción (hojas y tallos) con el objeto de evaluar la factibilidad de obtener fracciones ricas en compuestos flavonoides de potencial aplicación como ingredientes activos para la elaboración de formulaciones para protección solar.

ACTIVIDAD N° 4: Ensayos de caracterización química de extractos (responsable Dra. Churio, DQBQ)

a) Perfil químico del extracto: Se determinará el perfil químico del extracto, priorizando el análisis de componentes cannabinoides y terpénicos, a través del uso de cromatografías líquida de alta performance (HPLC) y/o gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

b) Capacidad antioxidante de los extractos: Se evaluará el porcentaje de inhibición del radical DPPH mediante EPR en función de la concentración de extracto, a fin de determinar la concentración efectiva 50 (EC50), y comparar con el parámetro obtenido en las mismas condiciones para antioxidantes de referencia (ácido gálico o ácido ascórbico).

c) Estabilidad de los extractos: Se evaluará el efecto de la exposición a iluminación ambiente y al aire sobre la concentración de los componentes característicos de los extractos. Los análisis se realizarán mediante espectrofotometría de absorción UV-visible y HPLC.

d) Explorar la capacidad de los extractos de conducir reacciones de fotosensibilización

Se determinará la formación de especies reactivas de oxígeno, tales como oxígeno singlete, inducidas por irradiación de los extractos con LEDs en el azul y en el verde (por ej. 450 y 530 nm). Para ello se utilizará EPR y la técnica de las trampas de espín. La trampa específica para evaluar oxígeno singlete será el 4-TMP.

ACTIVIDAD N° 5: Ensayos de caracterización biológica de extractos (responsable Dra. Barbini, DQBQ)

Todos los protocolos a utilizar están puestos a punto y disponibles en el Laboratorio. Los detalles metodológicos se describen a continuación.

Estudio de la actividad citotóxica.

Los extractos obtenidos serán empleados en ensayos bioquímicos que permitan determinar la actividad citotóxica sobre células tumorales hepáticas y además estudiar el mecanismo de muerte (apoptosis/autofagia) mediante el cual se ejerce la actividad. Asimismo, se propone estudiar las vías intracelulares de transducción de señales involucradas en la muerte celular inducida.

Se estudiarán líneas celulares de hepatocarcinoma humano (HepG2, Hep3B, Huh-7). Las células HepG2 y Hep3B, derivadas de hepatomas humanos, se obtuvieron de "American Type Tissue Collection (ATCC, HB 8065 and HB 8064, respectivamente). Se cultivarán en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 100 ml/L de suero fetal bovino, 2 mmol/L de glutamina, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 1,0 mmol/L de aminoácidos no esenciales, 1,0 mmol/L de piruvato de sodio. Las células Huh-7, también derivadas de hepatoma humano se cultivarán en medio base D-MEM suplementado como se describe anteriormente. Todas las células se incubarán a 37 °C y 5 % de CO₂.

a.- *Detección de viabilidad.* Se analizará la viabilidad de las líneas celulares tratadas con los diferentes extractos. Se analizará el efecto tóxico de las mismas sobre las líneas celulares de hepatoma. Para esto se analizará la viabilidad de las células tratadas con diferentes concentraciones de los extractos, mediante el ensayo de MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-compuesto de tetrazolio) (Promega), durante distintos tiempos. Este ensayo mide la actividad de dehidrogenasas mitocondriales en las células viables, basándose en una reacción colorimétrica que permite medir la bioreducción de un compuesto de tetrazolio (MTS) a formazán. La formación de este producto se mide a 490 nm en un espectrofotómetro de placa multiwell. El valor de absorbancia es proporcional al número de células viables. Se incluirán controles de células sin tratar y el porcentaje de viabilidad celular se normalizará a los valores de absorbancia de estos controles. El porcentaje de

viabilidad celular se normalizará a los valores de absorbancia de las células controles sin tratar. Se determinará la concentración citotóxica 50 % y 90 % (CC50 y CC90, respectivamente) para los distintos extractos y líneas celulares.

b.- Detección de la muerte programada por apoptosis. Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio. Una suspensión celular se teñirá con naranja de acridina/bromuro de etidio (4 µg/ml, Sigma). Se observará bajo microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse 400) y se fotografiará (Nikon Coolpix 4500). Se calculará el porcentaje de células viables (verde brillante), células apoptóticas tempranas (núcleo verde compacto), células apoptóticas tardías (núcleo naranja/rojo brillante) y células necróticas (núcleo naranja/rojo difuso).

bi.- Detección del ADN fragmentado. Se extraerá el ADN genómico de las células tratadas con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), según las instrucciones del fabricante. Los ADNs extraídos se almacenarán a 4 °C hasta su uso, y se separarán por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Las bandas o ladder del DNA clivado se visualizarán en un transiluminador, mediante la tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 µg/mL, BioRad).

bii.- Análisis del ciclo celular. Se cosecharán las células tratadas, se teñirá el ADN con yoduro de propidio (Sigma, 50 µg/mL) y se digerirá con RNAsa (Sigma, 0.5 mg/mL). Se analizarán por citometría de flujo, detectando fluorescencia roja (488 nm de excitación y detector de paso de banda de 620 ± 15 nm), proporcional al contenido de ADN. Se colectarán un mínimo de 10000 células por muestra. En los histogramas de ADN se detectarán los picos de fluorescencia, correspondientes al contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) y a las células apoptóticas con un pico "subG0", el cual representa al ADN degradado.

c.- Determinación de vías intracelulares de transducción de señales implicadas en la apoptosis. Se estudiarán los posibles efectos sobre las siguientes vías: i) activación de caspasas, ii) diferencias de expresión de proteínas regulatorias de la apoptosis, los miembros de la familia de Bcl-2 [inhibidores (Bcl-2 y Bcl-XL) o estimuladores (Bad, Bid, Bax) de la apoptosis]. Para analizar los niveles de expresión de las proteínas se utilizará la técnica de Western Blot. Para ello, las células serán lisadas con un buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas totales se determinará mediante el método de Bradford. Se realizarán SDS-Page de distintos porcentajes, en los que se cargarán cantidades iguales de proteínas totales por calle. Estos geles se electrotransferirán a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore), las cuales serán bloqueadas y posteriormente inmunodetectadas (anticuerpos primarios Santa Cruz Biotechnology, segundo anticuerpo-peroxidasa Dako, revelado por

electroquimioluminiscencia ECL Amersham), utilizando distintos anticuerpos primarios. Las bandas resultantes de la inmunodetección y del peso molecular correspondiente a cada una de ellas se cuantificarán mediante densitometría de estas utilizando el programa Image-J. Los valores de la cuantificación se normalizarán a un control de carga de proteínas totales (beta-actina).

d.- Detección de autofagia: En las células tratadas con los extractos se determinará la inducción de autofagia como consecuencia de los tratamientos. Los controles negativos serán las células sin tratar. Los controles positivos de la inducción de autofagia se obtendrán mediante la privación de nutrientes en los cultivos celulares. A) Mediante microscopía electrónica de transmisión. En las células tratadas se estudiará la aparición de ultraestructuras características de la autofagia (vesículas autofágicas: autofagosomas, autolisosomas), visualizadas como vesículas doble membrana. B) Detección de autofagia mediante microscopía confocal. En las células transfectadas se estudiará la presencia de LC3 asociada al autofagosoma, por marcación con anticuerpo anti-LC3 fluorescente. La co-localización de esta proteína con LAMP-1 (lysosome associated membrane protein-1), detectada mediante un anticuerpo marcado con otro fluoróforo, permitirá demostrar la fusión del lisosoma con el autofagosoma para formar los autolisosomas. C) Estudio de la expresión de las proteínas asociadas al proceso de autofagia: LC3, beclina-1, p62 por Western Blot. Se utilizarán anticuerpos específicos (Santa Cruz Biotechnology), membranas PVDF (Immobilon-P, Millipore), segundo anticuerpo-peroxidasa (Dako), revelado por electroquimioluminiscencia (ECL GE Healthcare). Se usará beta-actina para normalizar la carga de proteína total en los geles].

Estudio de la actividad antiviral.

Se estudiará la actividad antiviral frente a los siguientes virus: hepatitis B, herpes simplex-1 (HSV-1), sincicial respiratorio (RSV) y adenovirus-7 (ADV-7).

Para HBV se emplearán las células HepG2 2.15 (transfectadas de manera estable con HBV, productoras de viriones infectivos), las cuales se cultivarán en medio base D-MEM suplementado como se describe anteriormente y se incubarán a 37 °C y 5 % de CO₂. Para los otros virus se usarán células Vero y HEp-2, que se cultivarán en medio MEM suplementado y en las mismas condiciones de incubación.

a.- Determinación de la máxima concentración no citotóxica (MCNC) de los extractos en las diferentes líneas celulares. Se analizará el efecto tóxico de los extractos mediante MTS (descrito anteriormente) y se determinará la MCNC de cada extracto para cada línea celular.

b.- *Estudio de la inhibición en la replicación viral (actividad antiviral).* Para HBV (virus no cultivable) se determinará la inhibición de la secreción de antígenos virales. Las células se tratarán con distintas concentraciones a partir de la MCNC y se cuantificará la producción de HBsAg (antígeno de superficie) y HBeAg (antígeno e) en los sobrenadantes de cultivos tratados, mediante ensayos de ELISA. Además, se cuantificará del ADN viral por PCR en tiempo real, tanto en los sobrenadantes como en las células tratadas.

Para los otros virus (que son cultivables) se realizarán ensayos de cuantificación viral. Primero se hará un screening de actividad antiviral en los extractos. Para ello, diluciones seriadas en base 10 se sembrarán sobre las monocapas celulares crecidas en placas de 96 pocillos con diferentes concentraciones de los extractos, utilizando la MCNC como la concentración más alta. Un control de la infección se realizará en ausencia de los extractos. Las placas se incubarán a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 72 horas. Luego, se fijarán, teñirán con cristal violeta y se observará el efecto citopático. Los extractos se considerarán positivos cuando el título viral se reduzca un 99 % en su presencia con respecto al control de la infección.

En segundo lugar, se determinará la DE 50% (dosis efectiva 50 %) por el método de placas, determinando la reducción en el título viral o en las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL) en presencia de los extractos. Para ello, monocapas crecidas en placas de 24 pocillos se infectarán con diluciones de los stocks virales en presencia de concentraciones crecientes de los extractos. Luego de una incubación de una hora, se agregará medio de placa (medio de infección con metilcelulosa) y la incubación continuará en presencia de los extractos. Luego de 72 horas, las monocapas se fijarán, teñirán y se contarán las placas de lisis generadas. La DE50 se calculará como la concentración del extracto que reduce a un 50 % el número de placas formadas (UFP) en comparación a las placas generadas en el control de la infección (en ausencia del extracto).

ETAPA 3

ACTIVIDAD N° 6: Desarrollo de prototipos como productos medicinales derivados de Cannabis

Protocolo de preparación de aceites: Se elaborará un protocolo para la preparación de aceites de Cannabis con concentraciones controladas de los principios activos mayoritarios y se contrastará su bioequivalencia con productos certificados internacionales. (DQBQ-IFIMAR)

Evaluación de otros productos con Cannabis: Se desarrollarán micropartículas a partir de la encapsulación de extractos utilizando polímeros biocompatibles como

policaprolactona o quitosano comerciales mediante técnicas convencionales. Se estudiará la liberación de los principios activos encapsulados mediante ensayos in vitro. Los ensayos se llevarán a cabo empleando 100 mg de muestra (para cada material), los cuales serán suspendidos en fluido corporal simulado (SBF) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ bajo agitación constante del sistema (90 rpm). Para cada ensayo, las micropartículas serán colocadas dentro de membranas inertes de acetato de celulosa de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Gamafil®). A tiempos preestablecidos se tomarán alícuotas de la solución (3 mL), reponiendo el volumen extraído con SBF fresco. Las alícuotas extraídas serán finalmente analizadas empleando la solución SBF como blanco, a fin de determinar la cantidad máxima de principio activo liberado. Se determinará la cantidad total de principio activo incorporado evaluando la cantidad de sustancia liberada a tiempo "infinito" (esto es, hasta obtener un valor constante liberado), y la cantidad retenida en cada sistema luego del ensayo a tiempo infinito. El contenido de sustancia activa liberada a partir de una masa conocida de micropartículas se determinará por espectrofotometría UV-visible y por HPLC. La evaluación del contenido de sustancia activa retenida se llevará a cabo a partir de la disolución de las micropartículas en solvente orgánico y la medición de las sustancias activas como en el caso del contenido liberado. De acuerdo con la masa total obtenida (liberada + retenida), se determinará el porcentaje en peso de sustancia activa en cada sistema de micropartículas. (INTEMA)

III.- RESULTADOS ESPERADOS Y CAMPO DE APLICACION DE LOS RESULTADOS

a) **Resultados esperados:** Con la ejecución de este proyecto se espera lograr una eficiente sinergia entre el sector productivo y el sector académico en un área de relevancia socio-económica como lo es el Cannabis medicinal.

Se plantea obtener:

1. Informe de resultados de caracterización inicial.
2. Informe de resultados sobre obtención de extractos de Cannabis.
3. Informe de caracterización química de extractos.
4. Informe de caracterización biológica de los extractos.
5. Informe interno entre las UE que contenga los protocolos desarrollados considerados como know-how.

b) **Campo de aplicación de los resultados:** Se espera que los resultados puedan ser aplicados a la industria farmacéutica.

IV.- CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tarea	MESES																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓											
2						✓	✓	✓	✓									
3								✓	✓	✓	✓	✓						
4									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
5											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
6											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
7															✓	✓	✓	✓
8																✓	✓	✓

V.- GRUPO DE INVESTIGACION

APELLIDO Y NOMBRE	INSTITUCION	CUIL	CATEGORIA	FUNCION
BARBINI Luciana Fernanda	CONICET	27-21802692-9	Investigadora	Responsable técnica I
CHURIO María Sandra	CONICET	27-16226888-6	Investigadora	Investigadora
GRANONE Luis Ignacio	CONICET	20-34344654-4	CPA	Técnico
FANOVICH María Alejandra	CONICET	27-20062416-0	Investigadora	Responsable técnica II
LERE Martín	CONICET	20-25265226-5	CPA	Técnico

VI.- PERSONAL DE CANNTEK

APELLIDO Y NOMBRE	INSTITUCION	CUIL
RACCA Martin	CANNTEK	20-34134268-7
BELTRAN DEPONTI Matias Nicolas	CANNTEK	20-34768496-2
PARODI Tomas	CANNTEK	20-35621343-3
GARRIGA LACAZE Justo *	CANNTEK	20-36617008-2
ALVAREZ Ignacio Luis	CANNTEK	20-37379830-5

VII.- CONCLUSIÓN

En resumen, se puede decir que este proyecto tiene como objeto la investigación de la planta de Cannabis con fines medicinales, buscando adaptar especies de Cannabis de otras latitudes al suelo de la provincia de Buenos Aires.

Mediante el estudio e investigación se pretende identificar y patentar variedades de germoplasma nacional, identificar y establecer una guía para la micropropagación de la variedad, y de las diferentes materias obtenidas, lograr generar medicamentos certificados por entes argentinos que puedan satisfacer a las necesidades que hoy se solicitan en el área medicinal para diferentes patologías.

Para llevar a cabo el mismo se tendrán en cuenta ciertos pasos legales, obteniendo las autorizaciones de los diferentes entes nacionales como ser Ministerio de Salud, Ministerios de seguridad y generando convenios con diferentes actores sociales tales como institutos, universidades, cooperativas, ONGs, laboratorios que estudian la materia, y con otros entes particulares que puedan ser de útil necesidad.

MINISTERIO DE SALUD DE LA NACION	
DEPARTAMENTO	
MESA DE ENTRADAS Y NOTIFICACIONES	
ENTRÓ	SALIÓ
12 MAY 2023	FR

Martin Racca
39134268
+VH P347
M.RACCA@HOTMAIL.COM
2234562723

CONVENIO ESPECIFICO DE INVESTIGACION & DESARROLLO

Entre el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, denominado en adelante "CONICET", representado en este acto por su Gerente de Vinculación Tecnológica, Sergio Romano, con domicilio legal en Godoy Cruz 2290, CABA, de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, por una parte; y la empresa CANNTEK S.A denominada en adelante la "CONTRAPARTE", representada en este acto por su PRÉSIDENTE, Martín Rocco, DNI 34.134.268, con domicilio legal en callo Acuña de Figueroa, 1332, depto 305, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, por la otra, y denominadas conjuntamente las "PARTES", acuerdan celebrar el presente Convenio sujeto a las siguientes cláusulas (y antecedentes):

PRIMERA. OBJETO:

El presente Convenio de Investigación y desarrollo denominado proyecto de estandarización de producción de extractos de Cannabis con propiedades medicinales tiene por Objeto es estandarizar la producción de extractos de Cannabis con propiedades medicinales en total acuerdo con la normativa nacional vigente, siguiendo las directivas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en materia de buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales; y desarrollar nuevas formas de administración de extractos de Cannabis medicinal, en adelante, el "Proyecto".

SEGUNDA. PLAN DE TRABAJO:

Para el desarrollo de las actividades del presente convenio se establece un cronograma de tareas, entrega de informes de avance e Informe final y un grupo de trabajo que se encuentran detallados en el Anexo I "Plan de Trabajo".

TERCERA. INFORMES:

Se realizará un informe de avance al finalizar cada una de las etapas del trabajo objeto de este convenio y un Informe final al concluir las tareas, según se detallan en el Anexo I Plan de Trabajo.

CUARTA. UNIDAD EJECUTORA:

El CONICET designa como unidades ejecutoras de las tareas emergentes de este convenio al INTEMA - Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales - con domicilio en Av. Colón 10850, Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina., y al IFIMAR - Instituto de Investigaciones Físicas de Mar del Plata - con domicilio en

Convenio aprobado por Res 1170/2019, IF-2019-35748758-APN-GVT#CONICET

CONVENIO 2023/04062 PNL-APN#CONICET

Martin Rocco
ABOGADO
T. XVI F. 347 C.A.M.D.S.

Martin Rocco

Deán Funes 3350, Mar del Plata, Buenos Aires - Argentina , en adelante denominados "UNIDADES EJECUTORAS" -

QUINTA. REPRESENTANTES TÉCNICOS:

Con el fin de establecer canales permanentes y fluidos de comunicación, las partes designan como representantes técnicos para este convenio a:

Por CONICET: Maria Alejandra Fanovich, investigadora independiente, mafanovi@fi.mdp.edu.ar, con lugar de trabajo en el INTEMA y Maria Luciana F. Barbini, investigadora adjunta, lbarbini@mdp.edu.ar, con lugar de trabajo en el Departamento de Química y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UNMDP)

Por la CONTRAPARTE: Martín Racca, m racca@holmail.com

SEXTA. PRECIO – CRONOGRAMA DE PAGOS:

El presente convenio no implica erogaciones para CONICET .

a. La CONTRAPARTE se compromete a abonar a CONICET la suma total de **DOLARES Seis mil quinientos, U\$S 6.500.** Cabe aclarar que las facturas se emitirán en Pesos al valor de Dólar Oficial tipo vendedor cotización Banco Nación -

El pago se efectuará de la siguiente forma y una vez cumplida la condición que en cada caso se indica: (elegir la opción que corresponda)

- I. Cuota inicial del 50%, correspondiente a la suma de **DOLARES TRES MIL DOSCIENTOS CINCUENTA (U\$S 3.250)** que será pagadera dentro de los 15 días de la aprobación del presente convenio, por parte del Ministerio de Salud.
- II. Segunda cuota del 25%, correspondiente a la suma de **DOLARES MIL SEISCIENTOS VEINTICINCO (U\$S 1.625)**, contra entrega del informe de la Segunda Etapa.
- III. Tercera y última cuota del 25%, correspondiente a la suma de **DOLARES MIL SEISCIENTOS VEINTICINCO (U\$S 1.625)**, contra entrega del informe de la Tercer Etapa.

SEPTIMA. ADMINISTRACIÓN DE LOS FONDOS:

Para la administración de la totalidad de los fondos que constituyen el precio pagado por la CONTRAPARTE, CONICET designa a FUNDACION PARA LA

Convenio aprobado por Res. 1170/2019. IF-2019-36299756-APN-GVTR#CONICET

~~CONY E-0023764062 P02-01N#GONICENICET~~

TRANSFERENCIA E INNOVACION TECNOLOGICA- INNOVA-T, en adelante la "UVT" / "ADMINISTRADORA DE FONDOS", con domicilio en Av. Rivadavia 1917 (CP C1033AAJ), Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Mail: innovat@innovat.org.ar; teléfono +54 11 52187741 al 44), que actuará como Unidad de Vinculación Tecnológica conforme los términos de la Ley N° 23.877.

En tal sentido, emitirá por cuenta y orden de CONICET, facturas en Pesos al valor de Dólar Oficial tipo vendedor cotización Banco Nación a la CONTRAPARTE, de acuerdo a lo acordado en la Cláusula Séxta "PRECIO - CRONOGRAMA DE PAGOS" del presente Convenio.-

OCTAVA. EL CONICET SE COMPROMETE A:

(seleccionar las opciones que correspondan).

- Cumplir con el objeto del presente Convenio y desarrollar las tareas previstas en el plan de trabajo acordado en el Anexo I.-
- Aportar los recursos humanos, permitir el uso de instalaciones y/o el equipamiento necesario para llevar a cabo las tareas acordadas en el plan de trabajo del Anexo I.
- Entregar a la CONTRAPARTE a través de su representante técnico los informes de avance e informe final acordados en el Anexo I del presente convenio.-

Marín Rocco
ABOGADO
T19VI P1347 C.A.M.d.P

NOVENA. LA CONTRAPARTE SE COMPROMETE A:

(seleccionar las opciones que corresponda).

- Pagar el precio a CONICET; estando obligado a los pagos que se detallan en la cláusula sexta "PRECIO - CRONOGRAMA DE PAGOS" del presente Convenio.
- Cumplir con los aportes detallados en el presupuesto acordado en el Anexo II.
- Cumplir con el objeto del presente Convenio y desarrollar las tareas previstas en el plan de trabajo acordado en el Anexo I.
- Suministrar el lugar físico y la utilización del equipamiento existente con el objeto de desarrollar las tareas previstas en el Anexo I de este Convenio.
- Entregar a CONICET informes periódicos por medio del representante técnico.-

DECIMA. PROPIEDAD DE LOS RESULTADOS DE INVESTIGACION

a. Cada parte continúa siendo propietaria de sus propios conocimientos previos, su know-how, sus sistemas de computación, diseños, modelos, marcas, obras, creaciones y/u otros resultados protegidos o no, sea que estos hayan sido obtenidos con

Convenio aprobado por Res. 1170/2019 - E-2019-25729375- ANEXO 7 (52) CESA P.02-01PN#G01M#CONICET

Martín Racca
ABOGADO
T.XVI.F. 347 C.A.M.d.P.

anterioridad a la firma de este convenio, o desarrollados o adquiridos con independencia de las tareas previstas en el mismo.

b. Se entenderá por resultados de investigación los datos, conocimientos y/o información, generados por el equipo de trabajo a partir de la ejecución de las acciones previstas en el plan de trabajo del Anexo I, tangibles o intangibles, cualquiera sea su forma o naturaleza, así como cualquier derecho unido a ellos, incluidos los derechos de propiedad intelectual, tales como derechos de autor, derechos sobre diseños y modelos industriales, patentes, u otras formas de protección semejantes que sean susceptibles de protección por la legislación de patentes de invención o por otro tipo de registro legal, o aquellos resultados que no sean protegibles legalmente por patentes o por otro tipo de registro pero que puedan ser utilizados en el proceso productivo y adquieran por ello importancia económica.

c. La propiedad sobre los mencionados resultados de investigación surgidos del presente convenio pertenecerán a: CONICET y sus Instituciones Académicas/de ciencia y Tecnología Asociadas (según cuando corresponda por convenio marco)

DECIMO PRIMERA. USO DE LOS RESULTADOS:

En caso de que a partir del presente convenio surgieran resultados de investigación susceptibles de explotación o con valor comercial, LA CONTRAPARTE tendrá la opción de adquirir una licencia exclusiva para el uso y/o explotación comercial de dichos resultados por un plazo de hasta 90 días luego de finalizado el convenio. Durante este plazo, CONICET se abstendrá de otorgar/negociar con terceros otras licencias para el uso y/o explotación comercial de los resultados.

La opción de licencia deberá ejercerse mediante notificación fehaciente a la Gerencia de Vinculación Tecnológica dentro del plazo indicado. Si se eligiese ejercer la opción, las partes darán inmediatamente comienzo a las negociaciones tendientes a celebrar el contrato de licencia dentro del plazo máximo de 120 DÍAS días contados a partir de la fecha de ejercicio de la Opción.

Caso contrario los resultados de investigación la tecnología y/o capacidad resultante podrá ofrecerse a otro tercero interesado.

DECIMO SEGUNDA. PUBLICACIONES:

La CONTRAPARTE reconoce la necesidad del CONICET de efectuar publicaciones y en general divulgar los resultados del Proyecto. Sin perjuicio de ello y a fin de proteger también los derechos de la CONTRAPARTE, el Representante Técnico del CONICET

Convenio aprobado por Res. 1170/2019 IF-2019-36298756-APN-GVT#CONICET

IV

CONICET-0203764063602-CIPN#CONICET

entregará el Representante Técnico de la CONTRAPARTE, el borrador que será sometido a publicación y/o la transcripción de la presentación a congreso correspondiente con una antelación de veinte (20) días a la fecha de presentación. La CONTRAPARTE deberá contestar en un plazo no mayor a los veinte (20) días y en caso de ausencia de respuesta CONICET podrá realizar la publicación pertinente. En los trabajos publicados constarán los autores, su grado de participación, así como el hecho de que el trabajo a publicar se origina en el presente Convenio. -

DECIMO TERCERA. UTILIZACIÓN DE LOGOS, NOMBRES, MARCAS Y/O EMBLEMAS:

La CONTRAPARTE deberá utilizar el logo, nombre, marca y/o emblema de CONICET en toda publicación o actividad de difusión de las tareas y/o resultados del presente convenio. En los casos que los fines perseguidos sean comerciales, se deberá además hacer una evaluación económica del uso del logo, nombre, marca y/o emblema de CONICET conforme a lo establecido en la resolución 794/15, que se negociará en la respectiva licencia.-

DECIMO CUARTA. CONFIDENCIALIDAD:

- a. Las Partes se comprometen a no revelar a terceros ninguna información técnica ni de ningún otro carácter, sea con fines comerciales o científicos, originada en la otra Parte, anterior o subsiguiente a la firma del presente-
- b. Las Partes se comprometen a no revelar el resultado de las tareas que constituyen el objeto de este Convenio-
- c. Las Partes se obligan a comprometer al personal que tuviera acceso a tal información a no revelarla a terceros y mantenerla estrictamente confidencial, asumiendo en forma personal quien así obrare, la responsabilidad civil y/o penal que le fuera aplicable-
- d. La confidencialidad sobre los resultados regirá por el período de duración de este convenio y durante cinco (5) años con posterioridad al mismo, salvo que las partes de común acuerdo y por escrito sean relevadas sobre aspectos de la información desarrollada que podrán divulgarse o publicarse y en qué forma; o luego de concluido el proyecto, en todos aquellos casos en que la información hubiere caído en dominio público. -

DECIMO QUINTA. DURACION - PRORROGA:

Convenio aprobado por Res. 1170/2019. IF-2019-36298756-APH-GVT#CONICET

CONICET (2023) 04062 P02-01PN#GOM#CONICET

Marlín Rocca
ABOGADO
T.XVI P. 367 C.A.M.d.P.

El presente Convenio tendrá una vigencia de ~~18~~ meses - contados a partir de la firma del presente.-

De estimarlo conveniente, las partes podrán renovar el plazo del Convenio por el mismo periodo y por única voz, previa solicitud y manifestación formal de común acuerdo, la cual deberá materializarse a través de una Adenda al presente.-

DECIMO SEXTA. PROHIBICIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS:

Las Partes no podrán ceder a terceros los derechos derivados del presente Convenio, sin el consentimiento previo de la otra Parte.-

DECIMO SEPTIMA. RESCISIÓN ANTICIPADA – RESOLUCIÓN SIN EXPRESIÓN DE CAUSA:

Las Partes acuerdan que será causal de rescisión de este Convenio el incumplimiento de las obligaciones asumidas por alguna de las Partes. En caso que una de las partes incumpla una obligación sustancial de este Convenio, y no remedie o subsane dicho incumplimiento dentro de los 90 DÍAS días hábiles de recibida la notificación de la otra parte exigiendo el cumplimiento de la obligación, dara derecho a la parte cumplidora a resolver el contrato sin derecho a reclamo alguno de la parte incumplidora. A fin de justificar que remedió o subsanó dicho incumplimiento deberá remitir dentro del plazo mencionado notificación y documentación por escrito que acredite fehacientemente que ha solucionado tal incumplimiento. También podrá resolverse este Convenio cuando por razones de fuerza mayor o debido al dictado de nuevas normas legales, impidan a alguna de las partes el cumplimiento de las cláusulas del Convenio, sin que dicho incumplimiento genere el derecho a reclamarse mutuamente compensación alguna.-

DECIMO OCTAVA. INDIVIDUALIDAD Y AUTONOMIA DE LAS PARTES. SEGUROS:

- a. Las personas involucradas en las tareas que utilicen las instalaciones de la UNIDAD EJECUTORA estarán sujetos a las normas y reglamentos internos de aplicación al caso.-
- b. En toda circunstancia o hecho que tenga relación con este Convenio las Partes mantendrán la individualidad y autonomía de sus respectivas estructuras técnicas y administrativas y asumirán individualmente sus responsabilidades. El presente Convenio no constituye ningún tipo de sociedad, asociación o relación de dependencia o empleo entre las Partes, y por lo tanto, las Partes no serán consideradas solidariamente responsables por ninguna cuestión de responsabilidad civil o laboral en las que hayan incurrido individualmente.-

Marlín Rocca
ABOGADO
T.XVI.F.347 C.A.M.A.P.

- c. Con respecto a los recursos humanos aportados por cada una de las Partes destinados a la ejecución del Convenio, se deja expresamente establecido que no existirá relación de dependencia, ni habrá vínculo laboral alguno cualquiera sea su forma y/o naturaleza en relación a la otra Parte. En consecuencia, las Partes se eximen recíprocamente de cualquier reclamo, acción y/u obligación respecto del personal dependiente y/o contratistas y/o subcontratistas de la otra Parte.
- d. Cada una de las Partes se comprometo a contar con las coberturas de seguro legalmente obligatorias de acuerdo a las actividades de su competencia. Estos seguros deberán cubrir a los agentes de CONICET en los sitios donde se lleven a cabo la ejecución de las tareas acordadas en el Plan de Trabajo.
- e. El presente convenio no limita el derecho de las Partes a la celebración de otros convenios semejantes con otras instituciones.-

Martín Rocca
 ABOGADO
 T+XVI 347 C.A.M.d.P

DECIMO NOVENA. SOLUCIÓN DE CONTROVERSIAS:

Ante cualquier controversia derivada de la aplicación o Interpretación del presente Convenio, las Partes se comprometen a agotar las medidas tendientes a poner fin al conflicto a través de sus representantes técnicos, en caso de no poder arribar a un acuerdo se someterán a los Tribunales Federales de la Capital Federal.

VIGESIMA. COMUNICACIONES - NOTIFICACIONES:

A todos los efectos del presente Convenio, las Partes constituyen domicilio en los consignados en el encabezamiento, o donde lo comuniquen fehacientemente en el futuro. Las enviadas a CONICET serán dirigidas a la atención de la Gerencia de Vinculación Tecnológica.-

En prueba de conformidad se firman dos (2) ejemplares de un mismo tenor y a un solo efecto, en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, a los DIA días del mes de MES del año AÑO.-

Martín Rocco
ABOGADO
TXVI EP 247 C.A. M.R.P.

Anexo I

A. TITULO DEL TRABAJO:

"Desarrollo de productos controlados de Cannabis para uso medicinal"

B. OBJETIVO DEL PLAN DE TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la producción de extractos de Cannabis con propiedades medicinales en total acuerdo con la normativa nacional vigente, siguiendo las directivas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en materia de buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales; y desarrollar nuevas formas de administración de extractos de Cannabis medicinal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A.1.- Desarrollar técnicas que permitan el cultivo de variedades de *Cannabis sativa* y el desarrollo del perfil genético de las variedades para su posterior aplicación en monitoreo de la descendencia. Estudiar la adaptabilidad de variedades de Cannabis de diversas latitudes a la zona propuesta.

A.2.- Desarrollar un protocolo estandarizado de obtención de extractos de Cannabis a partir de tecnologías limpias. Estudiar y optimizar el proceso de obtención de extractos de Cannabis utilizando tecnología de fluidos supercríticos. Comparar la eficiencia del método con métodos convencionales de extracción.

A3.- Realizar una caracterización completa de los extractos obtenidos

A3a. Caracterización química.

-Caracterizar y cuantificar por técnicas analíticas cromatográficas (HPLC y/o CG-MS) los componentes cannabinoides y terpénicos de los extractos de *Cannabis sativa* obtenidos por distintas metodologías.

-Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos en base a reacciones de inhibición de especies radicales de prueba mediante Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR).

-Determinar la estabilidad de los extractos en presencia y ausencia de iluminación ambiente y saturación con aire.

-Explorar la capacidad de los extractos de fotosensibilizar la formación de especies reactivas de oxígeno mediante irradiación con luz visible.

A3b. Caracterización biológica. Evaluar actividad citotóxica y antiviral.

-Determinar las concentraciones citotóxicas de los extractos en diferentes líneas celulares tumorales humanas, representativas de distintos tipos de cáncer.

-Establecer los mecanismos moleculares implicados en la actividad citotóxica.

Convenio aprobado por Res 1170/2019. IF-2019-36298756-APN-GVT#CONICET

CONV-2023-04063-POL-CIPN#CONICET

VIII

- Determinar las concentraciones inhibitorias de la replicación viral de diferentes virus humanos de importancia médica.
- Establecer los mecanismos moleculares implicados en la actividad antiviral.

A.4- Obtener prototipos de productos derivados de Cannabis.
 Elaborar un protocolo para la preparación de aceites de Cannabis con concentraciones controladas de los principios activos mayoritarios y contrastar su bioequivalencia con productos certificados internacionales. Diseñar y evaluar la potencialidad de obtener micropartículas para contener los principios activos de cannabis.

C. PLAN DE ACTIVIDADES

Nº	1. ACTIVIDAD	2. DESCRIPCIÓN	3. ENTREGABLES	4. RESPONSABLE DEL ENTREGABLE
1	E T A P A 1 Cultivo de material vegetal	1.a. Cultivo CANNEK (CANNEK) 1.b. Cultivo modelo Indoor (INTEMA)	Material vegetal	MARTÍN RACCA
2	Recepción del material vegetal y caracterización inicial.	Se realizarán ensayos microbiológicos, de pesticidas, metales pesados y de humedad sobre el material entregado por CANNEK para reportar las características según la normativa vigente. (DQBQ)	Informe de Caracterización inicial	CHURIO BARBINI
3	Ensayos de extracción	Se realizarán ensayos de extracción con CO ₂ supercrítico (con y sin cosolventes) y con solventes líquidos mediante técnicas convencionales. Se buscará obtener extractos ricos en terpenos y otros ricos en cannabinoides. (INTEMA)	Informe sobre Extractos De Cannabis	FANOVICH
4	Ensayos de caracterización	Se determinará el perfil químico de los extractos mediante	Informe de caracterización	CHURIO

Martín Rocca
 ABOGADO
 TIXVI #347 C.A.M.S.P.

Marilín Rocca
 ABOGADO
 T. XVI F. 347 C.A.M.d.P.

A P A 2	química de extractos	de métodos de análisis cromatográfico HPLC y GC-MS apuntando a determinar presencia y cantidades relativas de cannabinoides y terpenos. Se evaluarán propiedades como: actividad antioxidante (mediante el método de inhibición del radical DPPH mediante EPR), estabilidad química (por análisis espectrofotométrico de absorción UV-visible en función del tiempo y condiciones de almacenamiento) y capacidad fotosensibilizadora (por irradiación estacionaria y detección de oxígeno singlete mediante trampas de espín en EPR) (DQBQ-IFIMAR)	química de extractos	
5	Ensayos de caracterización biológica de extractos	Se analizará la actividad citotóxica de los extractos frente a diversas líneas celulares tumorales humanas y se analizará la actividad antiviral de los mismos frente a virus humanos de importancia médica (hepatitis, virus respiratorios, herpes virus, etc.) (DQBQ)	Informe de caracterización biológica de los extractos	BARBINI
E T A P A 3	Desarrollo de prototipos como productos medicinales derivados de Cannabis	Se elaborará un protocolo para la preparación de aceites de Cannabis con concentraciones controladas de los principios activos mayoritarios y se contrastará su bioequivalencia con productos certificados internacionales. (DQBQ-IFIMAR) Se desarrollarán micropartículas conteniendo extractos de Cannabis a partir de polímeros comerciales biocompatibles. Se evaluará la liberación de principios activos de Cannabis en ensayos in vitro estandarizados. (INTEMA)	Informe interno entre las UE	BARBINI CHURIO FANOVICH

Descripción de las actividades:

ETAPA 1

1) Cultivo de material biológico

1.a) Cultivo CANNTEK (la empresa es la responsable de esta actividad)

Convenio aprobado por Res. 1170/2019. IF-2019-36298756-APN-GVT#CONICET

CONYB-0237-0406202-APN#CONICET

La empresa es la responsable de la producción inicial del material vegetal para dar inicio a la secuencia de actividades. A continuación, se brindan detalles de los materiales de partida, formas de cultivo, espacio disponible entre otros aspectos para generar el material inicial.

Material de origen:

A.- Se utilizará germoplasma nacional de origen desconocido para trabajar en su fitomejoramiento y lograr a posteriori su inscripción dentro del registro de variedades de cannabis de INASE. La resolución que habilita a no declarar el origen de este tipo de germoplasma es la Resolución Conjunta INASE - Ministerio de Salud N° 5/2021.
B.- Se importarán semillas del banco trílogone seeds y Dinafem Seed variedades tanto altas en CBD y bajas en THC como altas en THC y bajas en CBD, esto para poder experimentar con diferentes combinaciones de ambos cannabinoides dominantes para buscar la mejor eficiencia en diferentes patologías. Estas variedades pueden encontrarse sujetas a disponibilidad y a que el banco de semillas esté dispuesto a enviar al país. De ser esto imposible se buscará otro banco de semillas que pueda proveer semillas de similares características. Asimismo, las variedades pueden ser modificadas con el fin de poder atender mejor las patologías necesarias, según se converse con los diferentes entes involucrados. Cabe aclarar que simplemente se muestran las variedades que se podrían conseguir con el fin de mostrar el interés de trabajar con variedades que tengan fines medicinales. Actualmente CANNTEK ha iniciado el trámite frente a INASE para darse de alta en el Registro Nacional de Comercio y Fiscalización de Semillas (RNCyFS) como criadero de semillas de cannabis. La selección del germoplasma y sus variables está a cargo del Ing. Agrónomo Ignacio Luis Álvarez, matrícula 02528, responsable técnico del proyecto y frente a INASE.

Técnicas de cultivo:

El Cannabis es una planta que se puede cultivar con distintas técnicas, nosotros proponemos comenzar este proyecto con algunas ya utilizadas anteriormente en proyectos anteriores (desarrollados en Uruguay) como son las técnicas de cultivo en invernaderos tipo macrotúnel, de tipo "palo y nailon" y parcelas a cielo abierto. En los invernaderos se probarán métodos de cultivo en suelo orgánico vivo y cultivo hidropónico. Comenzando por las más sencillas y probando con otras a medida que se crea conveniente.

Los hongos, insectos, bacterias y el estrés climáticos son los enemigos número uno de un producto de calidad farmacéutica, es por ello que es de fundamental importancia la utilización de correctas técnicas de cultivo, la implementación de suelo vivo, hongos benéficos, micorrizas y fertilización orgánica para lograr los estándares más altos de calidad.

A continuación describiremos brevemente la técnica de cultivo en invernadero y a cielo abierto que son las que se estiman más convenientes.

Cultivo en invernadero:

La técnica de cultivo de cannabis en invernadero tipo macrotúnel provee beneficios no sólo a nivel de cultivo sino también a nivel económico. Esta técnica consiste en la construcción de invernaderos, con cubierta translúcida para poder aprovechar la luz solar al máximo disminuyendo el uso de luz artificial, ayudando con la protección del invernadero a controlar plagas, humedad y temperaturas requeridas por el cultivo. Se puede acompañar este invernadero de focos de luz artificial para simular las condiciones climáticas requeridas por el cultivo en condiciones que el clima de la zona no los provea. También se puede contar con sistemas de *black out* cuando se requiera regular las horas de luz que se desea que la planta se encuentre expuesta para poder obtener el mejor rendimiento de cada cultivo.

Martín Rocco
ABOGADO
T. XVI 4337 CA.M.D.P.

Además, este tipo de invernadero debe equiparse con sistemas de ventilación natural y/o forzada, sistemas de humidificación, calefacción por agua y/o aire caliente, así como sistemas de control de clima, riego y fertilización. El cultivo en invernadero puede ser llevado a cabo en macetas o a tierra directa, nosotros buscaremos utilizar ambos para poder estudiar mejor las adaptabilidades de la planta a la zona con diferentes metodologías, aprovechando los beneficios que cada una posea.

Cultivo a cielo abierto:

La técnica de cultivo a cielo abierto si bien se encuentra más limitada en materia de control de la planta, provee numerosos beneficios a fin de obtener un cultivo de mayor tamaño. Consiste en la obtención de plantines de tamaño adecuado para que no sea vulnerable al exterior, ubicado en parcelas de tierra para que puedan desarrollar raíces y tamaños mayores que el que se lograría en las condiciones limitantes de una maceta. Esto limita a plantar en diferentes épocas del año para poder aprovechar al máximo las condiciones climáticas naturales, las cuales serán analizadas por el equipo técnico para determinar cuáles son las más propicias para la zona. Se utilizará una superficie aproximada de 3000 m² para la producción a cielo abierto.

Método de producción:

Una vez obtenidas las semillas, las mismas se germinarán en un área especial para esta tarea.

A través de una selección rigurosa se elegirán las mejores plantas, teniendo en cuenta el tamaño y el desarrollo que las mismas vayan presentando. Estas serán trasladadas a otro habitáculo, y se encontrarán en etapa de vegetación el tiempo necesario para poder obtener la cantidad de esquejes requeridos para complementar con el ciclo siguiente (los esquejes seleccionados de germoplasma nacional de origen desconocido se utilizarán además para trabajar en su fitomejoramiento).

A medida que vamos obteniendo los esquejes los mismos serán colocados en pequeñas macetas con tierra o jiffys donde las mismas se colocarán en las condiciones de temperatura y humedad necesaria para poder generar las raíces propias. Una vez desarrollados los esquejes y encontrándose en las condiciones necesarias para poder ser trasplantadas las mismas se irán acomodando en macetas de un mayor tamaño dentro de los invernaderos, y en la parcelas de exterior, para comenzar su desarrollo.

Dentro de los invernaderos se instalarán distintos paneles de luz artificial que ayudarán al crecimiento y desarrollo de las plantas en cuanto se necesite. Se buscará siempre utilizar la menor cantidad de luz artificial necesaria, teniendo en cuenta que a mayor uso energético mayores costos y mayor contaminación. Las plantas que se encuentren en parcela exterior se acomodan en hileras, dejando un paso entre hilera e hilera para poder revisar cada planta en particular y tener un control exhaustivo de las mismas debido a que el control en exterior en cuanto a plagas o problemas de suelo puede ser de mayor complicación que interior. Dicho esto, sabemos que el control en interior puede generar complicaciones en cuanto a condiciones de humedad o temperatura que serán controladas con distintas tecnologías, pero permite un mayor control para un mejor desarrollo, y en el exterior el desarrollo puede llegar a presentar otras complicaciones las cuales serán estudiadas.

Una vez completado el ciclo de las plantas, las mismas serán cortadas y colocadas en un cuarto de secado, donde tendrán que permanecer un tiempo estipulado de aproximadamente un mes para completar el proceso de secado y curado. Este proceso debe ser llevado a cabo en unas condiciones de humedad relativa del ambiente de 45% a 60% para prevenir la aparición de patógenos y a una temperatura de 15 y 18°C para prevenir que se volatilicen diversos compuestos químicos.

Una vez que el porcentaje de humedad de la materia prima alcance el 10% de humedad, se procederá al corte de flores (cogollos), los cuales serán separados de los tallos y las hojas, proceso al cual llamaremos manicura o trimmeado. En este proceso una persona con una tijera o una máquina separa los cogollos del resto de las plantas pudiendo así separar las diferentes partes de la misma. Terminado el proceso de manicura, los

cogollos serán guardados en un habitáculo que presente las condiciones necesarias de temperatura y humedad para su almacenamiento hasta que tengan que ser enviados al laboratorio correspondiente para su estudio y producción de extractos.
Es imposible realizar una estimación anticipada en relación con la cantidad de plantas y definición de cuadros de cultivo por m², ya que las mismas se definen en función de variables que se llenen en cuenta al momento exacto de su último trasplante.

Gestión de plagas

En cuanto a la gestión de plagas, buscaremos tratar las mismas con insecticidas orgánicos, siendo que tratamos con materia que en su posterioridad serán utilizadas como objeto para productos medicinales. No se puede detallar los productos a utilizar debido a que como nos encontramos en etapa de investigación, se desconocen las plagas y otros tipos de malestares que pueda presentar el cultivo en la zona en cuestión.

Gestión de residuos

En materia de residuos, sabemos que la planta de Cannabis tiene numerosos usos, no solo en cuanto a usos medicinales sino también en numerosas industrias como la textil o energética, por lo tanto lo que podríamos catalogar como residuos (tallos y hojas) serán eventualmente entregados a los grupos de investigación asociados a este proyecto para investigar nuevos y mejores usos.
En caso de tener excedente, los residuos serán depositados y acopiados en un sector donde se estará generando tierra nueva, con mecanismos de compostaje. Esto nos permitirá reciclar los residuos obteniendo tierra que será luego utilizada en la misma plantación, mejorando el suelo en el que se encuentran las plantas para su mejor desarrollo.

Trazabilidad

Teniendo en mira la certificación en el momento oportuno de BUENAS PRACTICAS AGRICOLAS (BPA) y BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA (BPM) (Disposición 3602/18 ANMAT, Disposición 3827/18 ANMAT) es que se implementará un sistema de trazabilidad en la que cada plantín será etiquetado con un código de identificación para poder realizar un seguimiento desde la semilla hasta la inflorescencia de cannabis. El manejo de la documentación en forma sistematizada colabora en la mejora cualitativa y cuantitativa en la producción, y permite la evaluación de resultados frente a distintas decisiones estratégicas y ayuda a la creación de confianza en la industria del cannabis.

Espacio físico (CANNTEK)

CANNTEK cuenta con un predio de ~ 1 hectárea, circunscripta este último dentro del establecimiento estancia "La Trinidad", Ruta 2, km 396, (CP 7612) Camet, Partido de General Pueyrredón.

cual se destinará para el desarrollo y ejecución del presente convenio.

Serán montados dos invernaderos, uno de tipo "palo y nylon" de aprox. 300 m² y otro con alta tecnología de tipo macrotúnel con acero galvanizado de aprox. 300 m². Con este último tipo de invernáculo se intentará probar una mayor eficiencia en el control climático, ya que más allá de sus características técnicas que permiten un mejor movimiento en el flujo del aire, se instalarán equipos específicos de control climático, tales como iluminación artificial, sistema de "black out", ventilación y extracción forzada de aire, sistemas de aspersión de vapor de agua y riego por goteo.

Por último, se instalará un espacio adecuado para el procesamiento de la materia vegetal de alrededor de 40 m². Allí se realizará el corte, secado, curado, cierre al vacío, acopio y almacenaje tanto de materia prima como de productos elaborados. El mismo será equipado con sistemas de control de humedad, temperatura y flujo de aire, a fin de alcanzar un rango de HR entre el 45 % a 55 % y una temperatura de 16 a 19 °C.

Seguridad

Mirfin Rocco
ABOGADO
TIXVIPI 347 C.A.M.d.P.

CERCO PERIMETRAL: Un anillo de seguridad con un cerco olimpico romboidal de 2 pulgadas, 2 metros de alto y 2 filas de alambre de púas con postes cada 3 metros. Todo el perímetro alambrado se encontrará cubierto con lona marítima para mayor seguridad. Contará con portón automático, portero eléctrico y monitoreada por cámaras para evitar posibles ingresos no autorizados mientras ingresa el personal o proveedores.

CCTV: Se instalará un circuito cerrado de 7 cámaras IP de alta resolución y visión nocturna en todo el perímetro, interior de invernaderos y oficinas que se controlan desde el búnker de seguridad. Las grabaciones se alojan en un lugar seguro de las instalaciones con copia en la nube por cualquier eventualidad.

BUNKER: En el predio se construirá un búnker para alojar el personal de seguridad desde donde se monitorean las cámaras de seguridad, accesos etc., con comunicación independiente y también están provistos de botones de pánico para guardias y personal permanente que se conectan vía telefonía celular con la Comisaría de la zona.

ALARMA: El perímetro exterior de los invernaderos contará con barreras infrarrojas, el interior de estos contará con sensores de movimiento que disparan una alarma luminica-sonora en todo el predio y al búnker de seguridad. La alarma estará conectada con la Policía de la zona.

1.b) Cultivo modelo indoor (responsable Dra. Fanovich, INTEMA)

En colaboración con la empresa CANNTEK se procederá a armar un cultivo modelo (4 m²) en el laboratorio de Fluidos Supercríticos del INTEMA (3er piso Lab 333). El mismo tiene la función de reproducir el cultivo de la empresa en el laboratorio con el fin de generar insumos vegetales propios en pequeña escala e implementar modificaciones en las variables de cultivo. Se utilizará el mismo material vegetal de partida que emplee la empresa. Esta actividad contará con la dirección técnica del Ing. Agrónomo Ignacio Luis Álvarez (Matrícula 02528) y la responsable institucional será la Dra. Alejandra Fanovich.

ETAPA 2

ACTIVIDAD N° 2: Recepción del material vegetal y caracterización inicial (responsable Dra. Churio, Dra. Barbiní, DQBQ)

El material vegetal suministrado por la empresa será evaluado documentando su estado y calidad. Se procederá a la caracterización del material seco previo a la cuantificación de humedad.

Se analizará la composición cuantitativa de los principales cannabinoides (THC, CBD, THCA y CBDA) como así también de metales pesados (plomo y cadmio) y pesticidas. Además, se verificará que las muestras sean aptas microbiológicamente. Se seguirá la normativa vigente: Resolución 781/2022-MS y Disposición 6431/2022-ANMAT.

ACTIVIDAD N° 3: Ensayos de extracción (responsable Dra. Fanovich, INTEMA)

Se realizarán ensayos de extracción a partir del material vegetal (el de la empresa y el del cultivo indoor) tratado y sin tratar térmicamente en un equipo de alta presión (Pmáx:500 bar, V= 500 mL) HPU500 (Eurotechnica) de INTEMA. Se realizarán tratamientos térmicos a distintas temperaturas para aumentar la descarboxilación de las formas ácidas. Se propone tratar a las muestras a 90, 110 y 140 grados, a tiempos que se optimizarán en la práctica.

Se evaluará el efecto de la presión del sistema, la temperatura, las condiciones de flujo, como así también el tiempo de saturación en los diferentes compartimentos del equipo. Se emplearán materiales con diferentes pre-tratamientos y diferentes concentraciones de co-solvente (el cosolvente se elegirá según las normas ICH de solventes residuales) para facilitar los procesos de extracción con CO₂-SC. Se confeccionarán protocolos de trabajo para cada sistema estudiado con el objetivo de lograr la reproducibilidad de las condiciones de operación en el proceso establecido y de las características del producto. Se analizarán las cinéticas de extracción bajo las distintas condiciones del proceso. Se optimizarán las condiciones de extracción teniendo en cuenta el rendimiento y la naturaleza de los compuestos bioactivos extraídos. Se hallarán las condiciones específicas para lograr la extracción de dos tipos de extractos: 1- Extractos de cannabinoides y 2- Extractos de terpenos. Se realizarán ensayos de extracción convencionales (Soxhlet) con etanol para comparar la calidad de los productos. (INTEMA).

Asimismo, se realizarán ensayos de extracción sobre el material gestionado por la empresa como residuo de la producción (hojas y tallos) con el objeto de evaluar la factibilidad de obtener fracciones ricas en compuestos flavonoides de potencial aplicación como ingredientes activos para la elaboración de formulaciones para protección solar.

ACTIVIDAD N° 4: Ensayos de caracterización química de extractos (responsable Dra. Churilo, DQBQ)

a) Perfil químico del extracto: Se determinará el perfil químico del extracto, priorizando el análisis de componentes cannabinoides y terpénicos, a través del uso de cromatografías líquida de alta performance (HPLC) y la gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

b) Capacidad antioxidante de los extractos: Se evaluará el porcentaje de inhibición del radical DPPH mediante EPR en función de la concentración de extracto, a fin de determinar la concentración efectiva 50 (EC50), y comparar con el parámetro obtenido en las mismas condiciones para antioxidantes de referencia (ácido gálico o ácido ascórbico).

c) Estabilidad de los extractos: Se evaluará el efecto de la exposición a iluminación ambiente y al aire sobre la concentración de los componentes característicos de los extractos. Los análisis se realizarán mediante espectrofotometría de absorción UV-visible y HPLC.

d) Explorar la capacidad de los extractos de conducir reacciones de fotosensibilización

Se determinará la formación de especies reactivas de oxígeno, tales como oxígeno singlete, inducidas por irradiación de los extractos con LEDs en el azul y en el verde (por ej. 450 y 530 nm). Para ello se utilizará EPR y la técnica de las trampas de espín. La trampa específica para evaluar oxígeno singlete será el 4-TMP.

ACTIVIDAD N° 5: Ensayos de caracterización biológica de extractos (responsable Dra. Barbini, DQBQ)

Todos los protocolos a utilizar están puestos a punto y disponibles en el Laboratorio. Los detalles metodológicos se describen a continuación.

Estudio de la actividad citotóxica.

Los extractos obtenidos serán empleados en ensayos bioquímicos que permitan determinar la actividad citotóxica sobre células tumorales hepáticas y además estudiar

Convenio aprobado por Res. 1170/2019. IF-2019-36298756-APN-GVT#CONICET

UOQOYE-21237-04062-062-01RN#GONICENICET

Martín Rocco
ABOGADO
T. XVI 81.347 C.A.M.I.P.

el mecanismo de muerte (apoptosis/autofagia) mediante el cual se ejerce la actividad. Asimismo, se propone estudiar las vías intracelulares de transducción de señales involucradas en la muerte celular inducida.

Se estudiarán líneas celulares de hepatocarcinoma humano (HepG2, Hep3B, Huh-7). Las células HepG2 y Hep3B, derivadas de hepatomas humanos, se obtuvieron de "American Type Tissue Collection (ATCC, HB 8065 and HB 8064, respectivamente). Se cultivarán en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 100 ml/L de suero fetal bovino, 2 mmol/L de glutamina, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 1,0 mmol/L de aminoácidos no esenciales, 1,0 mmol/L de piruvato de sodio. Las células Huh-7, también derivadas de hepatoma humano se cultivarán en medio base D-MEM suplementado como se describe anteriormente. Todas las células se incubarán a 37 °C y 5 % de CO₂.

a.- *Detección de viabilidad.* Se analizará la viabilidad de las líneas celulares tratadas con los diferentes extractos. Se analizará el efecto tóxico de las mismas sobre las líneas celulares de hepatoma. Para esto se analizará la viabilidad de las células tratadas con diferentes concentraciones de los extractos, mediante el ensayo de MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-compuesto de tetrazolio) (Promega), durante distintos tiempos. Este ensayo mide la actividad de dehidrogenasas mitocondriales en las células viables, basándose en una reacción colorimétrica que permite medir la bioreducción de un compuesto de tetrazolio (MTS) a formazán. La formación de este producto se mide a 490 nm en un espectrofotómetro de placa multiwell. El valor de absorbancia es proporcional al número de células viables. Se incluirán controles de células sin tratar y el porcentaje de viabilidad celular se normalizará a los valores de absorbancia de estos controles. El porcentaje de viabilidad celular se normalizará a los valores de absorbancia de las células controles sin tratar. Se determinará la concentración citotóxica 50 % y 90 % (CC50 y CC90, respectivamente) para los distintos extractos y líneas celulares.

b.- *Detección de la muerte programada por apoptosis.* Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio. Una suspensión celular se teñirá con naranja de acridina/bromuro de etidio (4 µg/ml, Sigma). Se observará bajo microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse 400) y se fotografiará (Nikon Coolpix 4500). Se calculará el porcentaje de células viables (verde brillante), células apoptóticas tempranas (núcleo verde compacto), células apoptóticas tardías (núcleo naranja/rojo brillante) y células necróticas (núcleo naranja/rojo difuso)

bi.- *Detección del ADN fragmentado.* Se extraerá el ADN genómico de las células tratadas con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), según las instrucciones del fabricante. Los ADNs extraídos se almacenarán a 4 °C hasta su uso, y se separarán por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Las bandas o ladder del DNA clivado se visualizarán en un transiluminador, mediante la tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 µg/mL, BioRad).

bii.- *Análisis del ciclo celular.* Se cosecharán las células tratadas, se teñirá el ADN con yoduro de propidio (Sigma, 50 µg/mL) y se digerirá con RNAsa (Sigma, 0,5 mg/mL). Se analizarán por citometría de flujo, detectando fluorescencia roja (488 nm de excitación y detector de paso de banda de 620 ± 15 nm), proporcional al contenido de ADN. Se colectarán un mínimo de 10000 células por muestra. En los histogramas de ADN se

detectarán los picos de fluorescencia, correspondientes al contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) y a las células apoptóticas con un pico "subG0", el cual representa al ADN degradado.

c.- *Determinación de vías intracelulares de transducción de señales implicadas en la apoptosis.* Se estudiarán los posibles efectos sobre las siguientes vías: i) activación de caspasas, ii) diferencias de expresión de proteínas regulatorias de la apoptosis, los miembros de la familia de Bcl-2 (inhibidores (Bcl-2 y Bcl-XL) o estimuladores (Bad, Bid, Bax) de la apoptosis). Para analizar los niveles de expresión de las proteínas se utilizará la técnica de Western Blot. Para ello, las células serán lisadas con un buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas totales se determinará mediante el método de Bradford. Se realizarán SDS-Page de distintos porcentajes, en los que se cargarán cantidades iguales de proteínas totales por carril. Estos geles se electrotransferirán a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore), las cuales serán bloqueadas y posteriormente inmunodetectadas (anticuerpos primarios Santa Cruz Biotechnology, segundo anticuerpo-peroxidasa Dako, revelado por electroquimioluminiscencia ECL Amersham), utilizando distintos anticuerpos primarios. Las bandas resultantes de la inmunodetección y del peso molecular correspondiente a cada una de ellas se cuantificarán mediante densitometría de estas utilizando el programa Image-J. Los valores de la cuantificación se normalizarán a un control de carga de proteínas totales (beta-actina).

d.- *Detección de autofagia:* En las células tratadas con los extractos se determinará la inducción de autofagia como consecuencia de los tratamientos. Los controles negativos serán las células sin tratar. Los controles positivos de la inducción de autofagia se obtendrán mediante la privación de nutrientes en los cultivos celulares. A) Mediante microscopía electrónica de transmisión. En las células tratadas se estudiará la aparición de ultraestructuras características de la autofagia (vesículas autofágicas: autofagosomas, autolisosomas), visualizadas como vesículas doble membrana. B) Detección de autofagia mediante microscopía confocal. En las células transfectadas se estudiará la presencia de LC3 asociada al autofagosoma, por marcación con anticuerpo anti-LC3 fluorescente. La co-localización de esta proteína con LAMP-1 (lysosome associated membrane protein-1), detectada mediante un anticuerpo marcado con otro fluoróforo, permitirá demostrar la fusión del lisosoma con el autofagosoma para formar los autolisosomas. C) Estudio de la expresión de las proteínas asociadas al proceso de autofagia: LC3, beclina-1, p62 por Western Blot. Se utilizarán anticuerpos específicos (Santa Cruz Biotechnology), membranas PVDF (Immobilon-P, Millipore), segundo anticuerpo-peroxidasa (Dako), revelado por electroquimioluminiscencia (ECL GE Healthcare). Se usará beta-actina para normalizar la carga de proteína total en los geles.

Estudio de la actividad antiviral.

Se estudiará la actividad antiviral frente a los siguientes virus: hepatitis B, herpes simplex-1 (HSV-1), sincicial respiratorio (RSV) y adenovirus-7 (ADV-7).

Para HBV se emplearán las células HepG2 2.15 (transfectadas de manera estable con HBV, productoras de viriones infectivos), las cuales se cultivarán en medio base D-MEM

Martín Rocco
ABOGADO
T.M.V. # 347 C.A., M.d.P.

Martín Rocca
ABOGADO
T.XVI EP 347 C.A.M.d.P.

suplementado como se describe anteriormente y se incubarán a 37 °C y 5 % de CO₂. Para los otros virus se usarán células Vero y HEP-2, que se cultivarán en medio MEM suplementado y en las mismas condiciones de incubación.

a.- *Determinación de la máxima concentración no citotóxica (MCNC)* de los extractos en las diferentes líneas celulares. Se analizará el efecto tóxico de los extractos mediante MTS (descrito anteriormente) y se determinará la MCNC de cada extracto para cada línea celular.

b.- *Estudio de la inhibición en la replicación viral (actividad antiviral)*. Para HBV (virus no cultivable) se determinará la inhibición de la secreción de antígenos virales. Las células se tratarán con distintas concentraciones a partir de la MCNC y se cuantificará la producción de HBsAg (antígeno de superficie) y HBeAg (antígeno e) en los sobrenadantes de cultivos tratados, mediante ensayos de ELISA. Además, se cuantificará del ADN viral por PCR en tiempo real, tanto en los sobrenadantes como en las células tratadas.

Para los otros virus (que son cultivables) se realizarán ensayos de cuantificación viral. Primero se hará un screening de actividad antiviral en los extractos. Para ello, diluciones seriadas en base 10 se sembrarán sobre las monocapas celulares crecidas en placas de 96 pocillos con diferentes concentraciones de los extractos, utilizando la MCNC como la concentración más alta. Un control de la infección se realizará en ausencia de los extractos. Las placas se incubarán a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 72 horas. Luego, se fijarán, teñirán con cristal violeta y se observará el efecto citopático. Los extractos se considerarán positivos cuando el título viral se reduzca un 99 % en su presencia con respecto al control de la infección.

En segundo lugar, se determinará la DE 50% (dosis efectiva 50 %) por el método de placas, determinando la reducción en el título viral o en las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL) en presencia de los extractos. Para ello, monocapas crecidas en placas de 24 pocillos se infectarán con diluciones de los stocks virales en presencia de concentraciones crecientes de los extractos. Luego de una incubación de una hora, se agregará medio de placa (medio de infección con metilcelulosa) y la incubación continuará en presencia de los extractos. Luego de 72 horas, las monocapas se fijarán, teñirán y se contarán las placas de lisis generadas. La DE50 se calculará como la concentración del extracto que reduce a un 50 % el número de placas formadas (UFP) en comparación a las placas generadas en el control de la infección (en ausencia del extracto).

ETAPA 3

ACTIVIDAD N° 6: Desarrollo de prototipos como productos medicinales derivados de Cannabis

Protocolo de preparación de aceites: Se elaborará un protocolo para la preparación de aceites de Cannabis con concentraciones controladas de los principios activos mayoritarios y se contrastará su bioequivalencia con productos certificados internacionales. (DQBQ-IFIMAR)

Evaluación de otros productos con Cannabis: Se desarrollarán micropartículas a partir de la encapsulación de extractos utilizando polímeros biocompatibles como policaprolactona o quitosano comerciales mediante técnicas convencionales. Se estudiará la liberación de los principios activos encapsulados mediante ensayos in vitro. Los ensayos se llevarán a cabo empleando 100 mg de muestra (para cada material), los cuales serán suspendidos en fluido corporal simulado (SBF) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ bajo agitación constante del sistema (90 rpm). Para cada ensayo, las micropartículas serán colocadas dentro de membranas inertes de acetato de celulosa de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Gamafit®). A tiempos preestablecidos se tomarán alícuotas de la solución (3 mL), reponiendo el volumen extraído con SBF fresco. Las alícuotas extraídas serán finalmente analizadas empleando la solución SBF como blanco, a fin de determinar la cantidad máxima de principio activo liberado. Se determinará la cantidad total de principio activo incorporado evaluando la cantidad de sustancia liberada a tiempo "infinito" (esto es, hasta obtener un valor constante liberado), y la cantidad retenida en cada sistema luego del ensayo a tiempo infinito. El contenido de sustancia activa liberada a partir de una masa conocida de micropartículas se determinará por espectrofotometría UV-visible y por HPLC. La evaluación del contenido de sustancia activa retenida se llevará a cabo a partir de la disolución de las micropartículas en solvente orgánico y la medición de las sustancias activas como en el caso del contenido liberado. De acuerdo con la masa total obtenida (liberada + retenida), se determinará el porcentaje en peso de sustancia activa en cada sistema de micropartículas. (INTEMA)

Mgtrín Rocco
 ABOGADO
 T. XVI P. 347 C.A.M.d.P.

D. RESULTADOS ESPERADOS Y CAMPO DE APLICACION DE LOS RESULTADOS

a) **Resultados esperados:** Con la ejecución de este proyecto se espera lograr una eficiente sinergia entre el sector productivo y el sector académico en un área de relevancia socio-económica como lo es el Cannabis medicinal.

Se plantea obtener:

- 1- Informe de resultados de caracterización inicial.
- 2- Informe de resultados sobre obtención de extractos de Cannabis.
- 3- Informe de caracterización química de extractos.
- 4- Informe de caracterización biológica de los extractos.
- 5- Informe interno entre las UE que contenga los protocolos desarrollados considerados como know-how.

b) **Campo de aplicación de los resultados:** Se espera que los resultados puedan ser aplicados a la industria farmacéutica.

E. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tarea	MESES																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓											

Convenio aprobado por Res. 1170/2019. IF-2019-36298756-APH-GVT#CONICET

XIX

CONVENIO 237/0406A D02 GPN#GON#CONICET

MARILYN ROCCO
ABOGADO
TUXVI P. 347 C.A.M.A.P.

2019. 2019
2. 011

Anexo II: Presupuesto

CANTEK abonará a CONICET la suma total de 6500 USD (SEIS MIL QUINIENTOS DOLARES) al tipo de cambio vendedor de Banco Nación para la ejecución de la totalidad de los trabajos objeto de este Convenio. Dicho monto se abonará en tres (3) cuotas de la siguiente manera:

- Cuota inicial del cincuenta por ciento (50 %) que será pagadera dentro de los 15 días de que el Ministerio de Salud apruebe por resolución el presente convenio;
- Segunda cuota del veinticinco por ciento (25 %) contra entrega del informe de la segunda etapa.
- Una tercera y última cuota del veinticinco por ciento (25 %) contra entrega del informe de la tercera etapa.

Tabla Pago/Aporte en Especie – Valor aproximado

<u>Concepto</u>	<u>Detalle</u>	<u>Importe total estimado</u>
Material vegetal	Gastos de producción del material vegetal	US 60.000
Insumos cultivo indoor	Dos equipos de iluminación Lumatek de 600w. Sistema de riego por goteo. Sistema de deshumidificación de ambiente	US 2.500
Total		US 62.500

Martín Rocca
 ABOGADO
 T19VI F1 347 C.A.M.d.P.

Martín Rocca
 34134268





República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número: IF-2023-03637647-APN-GRH#CONICET

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Martes 10 de Enero de 2023

Referencia: Documentación Adicional

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 22 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2023.01.10 12:55:16 -03:00

MARTIN RACCA
20341342687

CONVE-2023-04062562-APN-GVT#CONICET

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Página 23 de 23
Date: 2023.01.10 12:55:17 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

**Hoja Adicional de Firmas
Convenio**

Número: CONVE-2023-04062562-APN-GVT#CONICET

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Miércoles 11 de Enero de 2023

Referencia: Convenio pre-aprobado de I+D entre CONICET y CANNTEK S.A

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 23 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2023.01.11 11:22:00 -03:00

Sergio Gaston Romano
Gerente
Gerencia de Vinculación Tecnológica
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2023.01.11 11:22:04 -03:00

ADENDA AL CONVENIO DE I+D Pre-aprobado
entre CONICET y CANNTEK S.A

Entre el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, denominado en adelante el "CONICET", representado en este acto por su Gerente de Vinculación Tecnológica, Sergio Romano, con domicilio en Godoy Cruz Nro. 2290 de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, por una parte; y la empresa CANNTEK S.A, [30-71771538-8], denominada en adelante la "EMPRESA", representada en este acto por su Presidente, Dr. Martin Racca DNI 34.134.268, con domicilio en calle Acuña de Figueroa 1332, Dpto. 305, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, por la otra; y en conjunto denominadas las "Partes", acuerdan celebrar la presente Adenda, en adelante la "Adenda", el cual se sujetará a las siguientes cláusulas y condiciones:

PRIMERA. OBJETO: La presente Adenda tiene por objeto: cambio de plan de trabajo – modificación de actividad y responsables de Etapa 1, del convenio pre-aprobado de I+D entre CONICET y CANNTEK S.A, celebrado con fecha 11 de enero de 2023 conforme se detalla en el ANEXO 1.

SEGUNDA. INALTERABILIDAD DE LAS CLAUSULAS: El resto de las cláusulas que no se modifican en la presente Adenda mantienen plena vigencia y se mantienen inalterables.

En prueba de conformidad se firman 2 ejemplares de un mismo tenor y a un solo efecto, en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, a los ____ días del mes de _____ del año _____.

A3b. Caracterización biológica. Evaluar actividad citotóxica y antiviral.

-Determinar las concentraciones citotóxicas de los extractos en diferentes líneas celulares tumorales humanas, representativas de distintos tipos de cáncer.

-Establecer los mecanismos moleculares implicados en la actividad citotóxica.

-Determinar las concentraciones inhibitorias de la replicación viral de diferentes virus humanos de importancia médica.

-Establecer los mecanismos moleculares implicados en la actividad antiviral.

A.4- Obtener prototipos de productos derivados de Cannabis.

Elaborar un protocolo para la preparación de aceites de Cannabis con concentraciones controladas de los principios activos mayoritarios y contrastar su bioequivalencia con productos certificados internacionales. Diseñar y evaluar la potencialidad de obtener microparticulas para contener los principios activos de cannabis.

C. PLAN DE ACTIVIDADES

Nº		1. ACTIVIDAD	2. DESCRIPCION	3. ENTREGABLES	4. RESPONSABLE DEL ENTREGABLE
1	E T A P A 1	Cultivo de material vegetal	1.a. Cultivo CANNTEK (CANNTEK) 1.b. Cultivo modelo <i>indoor</i> (INTEMA)	Material vegetal	MARTÍN RACCA
2		Recepción del material vegetal y caracterización inicial.	Se realizarán ensayos microbiológicos, de pesticidas, metales pesados y de humedad sobre el material entregado por CANNTEC para reportar las características según la normativa vigente. (DQBQ)	Informe de Caracterización inicial	CHURIO BARBINI
3	E T A	Ensayos de extracción	Se realizarán ensayos de extracción con CO ₂ supercrítico (con y sin cosolventes) y con solventes líquidos mediante técnicas convencionales Se buscará obtener extractos ricos en terpenos y otros ricos en cannabinoides. (INTEMA)	Informe sobre Extractos De Cannabis	FANOVICH
4	P A	Ensayos de caracterización química de extractos	Se determinará el perfil químico de los extractos mediante métodos de análisis cromatográfico HPLC y GC-MS apuntando a determinar presencia y cantidades relativas de	Informe de caracterización química de extractos	CHURIO

	2		cannabinoides y terpenos. Se evaluarán propiedades como: actividad antioxidante (mediante el método de inhibición del radical DPPH mediante EPR), estabilidad química (por análisis espectrofotométrico de absorción UV-visible en función del tiempo y condiciones de almacenamiento) y capacidad fotosensibilizadora (por irradiación estacionaria y detección de oxígeno singlete mediante trampas de espín en EPR) (DQBQ-IFIMAR)		
5		Ensayos de caracterización biológica de extractos	de Se analizará la actividad citotóxica de los extractos frente a diversas líneas celulares tumorales humanas y se analizará la actividad antiviral de los mismos frente a virus humanos de importancia médica (hepatitis, virus respiratorios, herpes virus, etc.) (DQBQ)	Informe de caracterización biológica de los extractos	BARBINI
6	E T A P A 3	Desarrollo de prototipos como productos medicinales derivados de Cannabis	de Se elaborará un protocolo para la preparación de aceites de Cannabis con concentraciones controladas de los principios activos mayoritarios y se contrastará su bioequivalencia con productos certificados internacionales. (DQBQ-IFIMAR) Se desarrollarán micropartículas conteniendo extractos de Cannabis a partir de polímeros comerciales biocompatibles. Se evaluará la liberación de principios activos de Cannabis en ensayos in vitro estandarizados. (INTEMA)	Informe interno entre las UE	BARBINI CHURIO FANOVICH

Descripción de las actividades:

ETAPA 1

1) Cultivo de material biológico

1.a) Cultivo CANNTEK (la empresa es la responsable de esta actividad)

La empresa es la responsable de la producción inicial del material vegetal para dar inicio a la secuencia de actividades. A continuación, se brindan detalles de los materiales de partida, formas de cultivo, espacio disponible entre otros aspectos para generar el material inicial.

Material de origen:

A.- Se utilizará germoplasma nacional de origen desconocido para trabajar en su fitomejoramiento y lograr a posteriori su inscripción dentro del registro de variedades de cannabis de INASE. La resolución que habilita a no declarar el origen de este tipo de germoplasma es la Resolución Conjunta INASE - Ministerio de Salud N° 5/2021.

B.- Se importarán semillas del banco trilogene seeds y Dinafem Seed variedades tanto altas en CBD y bajas en THC como altas en THC y bajas en CBD, esto para poder experimentar con diferentes combinaciones de ambos cannabinoides dominantes para buscar la mejor eficiencia en diferentes patologías.

Estas variedades pueden encontrarse sujetas a disponibilidad y a que el banco de semillas esté dispuesto a enviar al país. De ser esto imposible se buscará otro banco de semillas que pueda proveer semillas de similares características. Asimismo, las variedades pueden ser modificadas con el fin de poder atender mejor las patologías necesarias, según se converse con los diferentes entes involucrados. Cabe aclarar que simplemente se muestran las variedades que se podrían conseguir con el fin de mostrar el interés de trabajar con variedades que tengan fines medicinales.

Actualmente CANNTEK ha iniciado el trámite frente a INASE para darse de alta en el Registro Nacional de Comercio y Fiscalización de Semillas (RNCyFS) como criadero de semillas de cannabis. La selección del germoplasma y sus variables está a cargo del Ing. Agrónomo Ignacio Luis Álvarez, matrícula 02528, responsable técnico del proyecto y frente a INASE.

Técnicas de cultivo:

El Cannabis es una planta que se puede cultivar con distintas técnicas, nosotros proponemos comenzar este proyecto con algunas ya utilizadas anteriormente en proyectos anteriores (desarrollados en Uruguay) como son las técnicas de cultivo en invernaderos tipo macrotunel, de tipo "palo y nailon" y parcelas a cielo abierto. En los invernaderos se probarán métodos de cultivo en suelo orgánico vivo y cultivo hidropónico. Comenzando por las más sencillas y probando con otras a medida que se crea conveniente.

Los hongos, insectos, bacterias y el estrés climáticos son los enemigos número uno de un producto de calidad farmacéutica, es por ello que es de fundamental importancia la utilización de correctas técnicas de cultivo, la implementación de suelo vivo, hongos benéficos, micorrizas y fertilización orgánica para lograr los estándares más altos de calidad.

A continuación describiremos brevemente la técnica de cultivo en invernadero y a cielo abierto que son las que se estiman más convenientes.

Cultivo en invernadero:

La técnica de cultivo de cannabis en invernadero tipo macrotunel provee beneficios no sólo a nivel de cultivo sino también a nivel económico. Esta técnica consiste en la construcción de invernaderos, con cubierta translúcida para poder aprovechar la luz solar al máximo disminuyendo el uso de luz artificial, ayudando con la protección del invernadero a controlar plagas, humedad y temperaturas requeridas por el cultivo. Se puede acompañar este invernadero de focos de luz artificial para simular las condiciones climáticas requeridas por el cultivo en condiciones que el clima de la zona no los provea. También se puede contar con sistemas de *black out* cuando se requiera regular las horas de luz que se desea que la planta se encuentre expuesta para poder obtener el mejor rendimiento de cada cultivo.

Además, este tipo de invernadero debe equiparse con sistemas de ventilación natural y/o forzada, sistemas de humidificación, calefacción por agua y/o aire caliente, así como sistemas de control de clima, riego y fertirrigación. El cultivo en invernadero puede ser llevado a cabo en macetas o a tierra directa, nosotros buscaremos utilizar ambos para poder estudiar mejor las adaptabilidades de la planta a la zona con diferentes metodologías, aprovechando los beneficios que cada una posee.

Cultivo a cielo abierto:

La técnica de cultivo a cielo abierto si bien se encuentra más limitada en materia de control de la planta, provee numerosos beneficios a fin de obtener un cultivo de mayor tamaño. Consiste en la obtención de plántulas de tamaño adecuado para que no sea vulnerable al exterior, ubicado en parcelas de tierra para que puedan desarrollar raíces y tamaños mayores que el que se lograría en las condiciones limitantes de una maceta. Esto limita a plantar en diferentes épocas del año para poder aprovechar al máximo las condiciones climáticas naturales, las cuales serán analizadas por el equipo técnico para determinar cuáles son las más propicias para la zona. Se utilizará una superficie aproximada de 3000 m² para la producción a cielo abierto.

Método de producción:

Una vez obtenidas las semillas, las mismas se germinarán en un área especial para esta tarea.

A través de una selección rigurosa se elegirán las mejores plantas, teniendo en cuenta el tamaño y el desarrollo que las mismas vayan presentando. Estas serán trasladadas a otro habitáculo, y se encontrarán en etapa de vegetación el tiempo necesario para poder obtener la cantidad de esquejes requeridos para cumplimentar con el ciclo siguiente (los esquejes seleccionados de germoplasma nacional de origen desconocido se utilizarán además para trabajar en su fitomejoramiento).

A medida que vamos obteniendo los esquejes los mismos serán colocados en pequeñas macetas con tierra o jiffys donde las mismas se colocarán en las condiciones de temperatura y humedad necesaria para poder generar las raíces propias. Una vez desarrollados los esquejes y encontrándose en las condiciones necesarias para poder ser trasplantadas las mismas se irán acomodando en macetas de un mayor tamaño dentro de los invernaderos, y en las parcelas de exterior, para comenzar su desarrollo.

Dentro de los invernaderos se instalarán distintos paneles de luz artificial que ayudarán al crecimiento y desarrollo de las plantas en cuanto se necesite. Se buscará siempre utilizar la menor cantidad de luz artificial necesaria, teniendo en cuenta que a mayor uso energético mayores costos y mayor contaminación. Las plantas que se encuentren en parcela exterior se acomodan en hileras, dejando un paso entre hilera e hilera para poder revisar cada planta en particular y tener un control exhaustivo de las mismas debido a que el control en exterior en cuanto a plagas o problemas de suelo puede ser de mayor complicación que interior. Dicho esto, sabemos que el control en interior puede generar complicaciones en cuanto a condiciones de humedad o temperatura que serán controladas con distintas tecnologías, pero permite un mayor control para un mejor desarrollo, y en el exterior el desarrollo puede llegar a presentar otras complicaciones las cuales serán estudiadas.

Una vez completado el ciclo de las plantas, las mismas serán cortadas y colocadas en un cuarto de secado, donde tendrán que permanecer un tiempo estipulado de aproximadamente un mes para completar el proceso de secado y curado. Este proceso debe ser llevado a cabo en unas condiciones de humedad relativa del ambiente de 45% a 60% para prevenir la aparición de patógenos y a una temperatura de 15 y 18°C para prevenir que se volatilicen diversos compuestos químicos.

Una vez que el porcentaje de humedad de la materia prima alcance el 10% de humedad, se procederá al corte de flores (cogollos), los cuales serán separados de los tallos y las hojas, proceso al cual llamaremos manicura o trimmeado. En este proceso una persona con una tijera o una máquina separa los cogollos del resto de las plantas pudiendo así separar las diferentes partes de la misma. Terminado el proceso de manicura, los cogollos serán guardados en un habitáculo que presente las condiciones necesarias de temperatura y humedad para su almacenamiento hasta que tengan que ser enviados al laboratorio correspondiente para su estudio y producción de extractos.

Es imposible realizar una estimación anticipada en relación con la cantidad de plantas y definición de cuadros de cultivo por m², ya que las mismas se definen en función de variables que se tienen en cuenta al momento exacto de su último trasplante.

Gestión de plagas

En cuanto a la gestión de plagas, buscaremos tratar las mismas con insecticidas orgánicos, siendo que tratamos con materia que en su posterioridad serán utilizadas como objeto para productos medicinales. No se puede detallar los productos a utilizar debido a que como nos encontramos en etapa de investigación, se desconocen las plagas y otros tipos de malestares que pueda presentar el cultivo en la zona en cuestión.

Gestión de residuos

En materia de residuos, sabemos que la planta de Cannabis tiene numerosos usos, no solo en cuanto a usos medicinales sino también en numerosas industrias como la textil o energética, por lo tanto lo que podríamos catalogar como residuos (tallos y hojas) serán eventualmente entregados a los grupos de investigación asociados a este proyecto para investigar nuevos y mejores usos.

En caso de tener excedente, los residuos serán depositados y acopiados en un sector donde se estará generando tierra nueva, con mecanismos de compostaje. Esto nos permitirá reciclar los residuos obteniendo tierra que será luego utilizada en la misma plantación, mejorando el suelo en el que se encuentran las plantas para su mejor desarrollo.

Trazabilidad

Teniendo en mira la certificación en el momento oportuno de BUENAS PRACTICAS AGRICOLAS (BPA) y BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA (BPM) (Disposición 3602/18 ANMAT, Disposición 3827/18 ANMAT) es que se implementará un sistema de trazabilidad en la que cada plantín será etiquetado con un código de identificación para poder realizar un seguimiento desde la semilla hasta la inflorescencia de cannabis. El manejo de la documentación en forma sistematizada colabora en la mejora cualitativa y cuantitativa en la producción, y permite la evaluación de resultados frente a distintas decisiones estratégicas y ayuda a la creación de confianza en la industria del cannabis.

Espacio físico (CANNTEK)

CANNTEK cuenta con un predio de ~ 5 hectáreas, circunscripto este último dentro del establecimiento estancia "La Trinidad", Ruta 2, km 396, (CP 7612) Camel, Partido de General Pueyrredón,

cual se destinará para el desarrollo y ejecución del presente convenio.

Serán montados dos invernaderos, uno de tipo "palo y nylon" de aprox. 300 m² y otro con alta tecnología de tipo macrotunel con acero galvanizado de aprox. 300 m². Con este último tipo de invernáculo se intentará probar una mayor eficiencia en el control climático, ya que más allá de sus características técnicas que permiten un mejor movimiento en el flujo del aire, se instalarán equipos específicos de control climático, tales como iluminación artificial, sistema de "black out", ventilación y extracción forzada de aire, sistemas de aspersión de vapor de agua y riego por goteo.

Por último, se instalará un espacio adecuado para el procesamiento de la materia vegetal de alrededor de 40 m². Allí se realizará el corte, secado, curado, cierre al vacío, acopio y almacenaje tanto de materia primas como de productos elaborados. El mismo será equipado con sistemas de control de humedad, temperatura y flujo de aire, a fin de alcanzar un rango de HR entre el 45 % a 55 % y una temperatura de 16 a 19 °C.

Seguridad

CERCO PERIMETRAL: Un anillo de seguridad con un cerco olímpico romboidal de 2 pulgadas, 2 metros de alto y 2 filas de alambre de púas con postes cada 3 metros. Todo el perímetro alambrado se encontrará cubierto con lona marítima para mayor seguridad. Contará con portón automático, portero eléctrico y monitoreada por cámaras para evitar posibles ingresos no autorizados mientras ingresa el personal o proveedores.

CCTV: Se instalará un circuito cerrado de 7 cámaras IP de alta resolución y visión nocturna en todo el perímetro, interior de invernaderos y oficinas que se controlan desde el búnker de seguridad. Las grabaciones se alojan en un lugar seguro de las instalaciones con copia en la nube por cualquier eventualidad.

BUNKER: En el predio se construirá un búnker para alojar el personal de seguridad desde donde se monitorean las cámaras de seguridad, accesos etc., con comunicación independiente y también están provistos de botones de pánico para guardias y personal permanente que se conectan vía telefonía celular con la Comisaría de la zona.

ALARMA: El perímetro exterior de los invernaderos contará con barreras infrarrojas, el interior de estos contará con sensores de movimiento que disparan una alarma lumínica-sonora en todo el predio y al búnker de seguridad. La alarma estará conectada con la Policía de la zona.

AGREGADO

1.b) Cultivo modelo indoor (la empresa es la responsable de esta actividad junto con la Dra. Fanovich)

Se procederá a armar un cultivo indoor de aprox. 60 m² en el 4to piso del INTEMA, ciudad de Mar del Plata. El mismo tiene como objeto producir inflorescencias de Cannabis con los más altos estándares de calidad, controlando todos los factores ambientales de manera artificial.

Dichas instalaciones disponen de: Iluminación artificial (led y hps), sistema de filtrado de agua por osmosis inversa, sistema de riego por goteo, climatización con sistema de aire acondicionado y ventilación forzada a los fines de regular las condiciones de humedad y temperatura interna.

Se contará con una sala de germinación, lugar en donde se germinarán las semillas y se reproducirán esquejes de plantas madre seleccionadas (reproducción asexual), integrada esta última a una sala para crecimiento vegetativo de aprox. 20 m², una sala de floración de aprox. 30 m² y una sala de corte y secado de aprox. 10 m².

Sistemas de cultivo en indoor

Por un lado, se cultivará en macetas con sustrato vivo buscando un producto final agroecológico. Para la mezcla del sustrato se utilizará humus, tierra, turba, perlita, micorrizas, trichodermas, distintos hongos benéficos, algas marinas y microorganismos eficientes. Se utilizarán fertilizantes orgánicos garantizando un óptimo desarrollo de las raíces y de la masa vegetal. El sustrato vivo favorece a desarrollar plantas más resistentes a plagas y enfermedades, aumenta la expresión de los terpenos y flavonoides, se encuentra libre de químicos y enriquece los suelos evitando el agotamiento.

Por otro lado, se implementará un sistema de cultivo hidropónico por goteo con sustrato inerte. En este sistema el agua sirve como medio de cultivo cargado de nutrientes con un pH y electro-conductividad determinadas y controladas a diario. Para lograr esto, se partirá utilizando agua de ósmosis inversa, a través de la utilización de un filtro y depósito para estos fines. Al estar los nutrientes disponibles inmediatamente, y controlando las necesidades nutricionales de la planta en forma constante se puede lograr un rendimiento mayor en relación con la masa (expresada en kg) x m² de inflorescencias, en comparación al cultivo en tierra. Además, este sistema mejora la calidad microbiológica del producto final, ya que al estar utilizando un medio de cultivo inerte se reducen considerablemente las infecciones por plagas y enfermedades, garantizando un producto totalmente inocuo.

Etapa de crecimiento vegetativo y floración

Una vez germinada la semilla y/o enraizados los esquejes seleccionados se harán dos trasplantes, el primero a macetas de 3 litros donde continuarán su crecimiento hasta su posterior trasplante a maceta final de 15 litros.

Se implementarán dos fotoperíodos distintos, uno de 18 h de luz y 6 h de oscuridad para la etapa vegetativa, y otro de 12 h de luz y 12 h de oscuridad para la etapa de floración.

Se buscará conservar una temperatura entre el rango de 24 y 28 °C y una HR% del 60 al 80% para la sala de crecimiento vegetativo y del 45 al 60 % para la sala de floración.

Sala de secado

En la misma se realizará el corte y secado del material vegetal. Será equipado con sistemas de control de humedad, temperatura y flujo de aire, a fin de alcanzar un rango de HR entre el 45 % a 55 % y una temperatura de 16 a 19 °C.

ETAPA 2

ACTIVIDAD N° 2: Recepción del material vegetal y caracterización inicial (responsable Dra. Churio, Dra. Barbini, DQBQ)

El material vegetal suministrado por la empresa será evaluado documentando su estado y calidad. Se procederá a la caracterización del material seco previo a la cuantificación de humedad.

Se analizará la composición cuantitativa de los principales cannabinoides (THC, CBD, THCA y CBDA) como así también de metales pesados (plomo y cadmio) y pesticidas. Además, se verificará que las muestras sean aptas microbiológicamente. Se seguirá la normativa vigente: Resolución 781/2022-MS y Disposición 6431/2022-ANMAT.

ACTIVIDAD N° 3: Ensayos de extracción (responsable Dra. Fanovich, INTEMA)

Se realizarán ensayos de extracción a partir del material vegetal (el de la empresa y el del cultivo indoor) tratado y sin tratar térmicamente en un equipo de alta presión (P_{máx}:500 bar, V= 500 mL HPU500 (Eurotechnica) de INTEMA. Se realizarán tratamientos térmicos

a distintas temperaturas para aumentar la descarboxilación de las formas ácidas. Se propone tratar a las muestras a 90, 110 y 140 grados, a tiempos que se optimizarán en la práctica.

Se evaluará el efecto de la presión del sistema, la temperatura, las condiciones de flujo, como así también el tiempo de saturación en los diferentes compartimentos del equipo. Se emplearán materiales con diferentes pre-tratamientos y diferentes concentraciones de co-solvente (el cosolvente se elegirá según las normas ICH de solventes residuales) para facilitar los procesos de extracción con CO₂-SC. Se confeccionarán protocolos de trabajo para cada sistema estudiado con el objetivo de lograr la reproducibilidad de las condiciones de operación en el proceso establecido y de las características del producto. Se analizarán las cinéticas de extracción bajo las distintas condiciones del proceso. Se optimizarán las condiciones de extracción teniendo en cuenta el rendimiento y la naturaleza de los compuestos bioactivos extraídos. Se hallarán las condiciones específicas para lograr la extracción de dos tipos de extractos: 1- Extractos de cannabinoides y 2- Extractos de terpenos. Se realizarán ensayos de extracción convencionales (Soxhlet) con etanol para comparar la calidad de los productos. (INTEMA).

Asimismo, se realizarán ensayos de extracción sobre el material gestionado por la empresa como residuo de la producción (hojas y tallos) con el objeto de evaluar la factibilidad de obtener fracciones ricas en compuestos flavonoides de potencial aplicación como ingredientes activos para la elaboración de formulaciones para protección solar.

ACTIVIDAD N° 4: Ensayos de caracterización química de extractos (responsable Dra. Churio, DQBQ)

a) *Perfil químico del extracto:* Se determinará el perfil químico del extracto, priorizando el análisis de componentes cannabinoides y terpénicos, a través del uso de cromatografías líquida de alta performance (HPLC) y /o gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

b) *Capacidad antioxidante de los extractos:* Se evaluará el porcentaje de inhibición del radical DPPH mediante EPR en función de la concentración de extracto, a fin de determinar la concentración efectiva 50 (EC50), y comparar con el parámetro obtenido en las mismas condiciones para antioxidantes de referencia (ácido gálico o ácido ascórbico).

c) *Estabilidad de los extractos:* Se evaluará el efecto de la exposición a iluminación ambiente y al aire sobre la concentración de los componentes característicos de los extractos. Los análisis se realizarán mediante espectrofotometría de absorción UV-visible y HPLC.

d) *Explorar la capacidad de los extractos de conducir reacciones de fotosensibilización*

Se determinará la formación de especies reactivas de oxígeno, tales como oxígeno singlete, inducidas por irradiación de los extractos con LEDs en el azul y en el verde (por ej. 450 y 530 nm). Para ello se utilizará EPR y la técnica de las trampas de espín. La trampa específica para evaluar oxígeno singlete será el 4-TMP.

ACTIVIDAD N° 5: Ensayos de caracterización biológica de extractos (responsable Dra. Barbini, DQBQ)

Todos los protocolos a utilizar están puestos a punto y disponibles en el Laboratorio. Los detalles metodológicos se describen a continuación.

Estudio de la actividad citotóxica.

Los extractos obtenidos serán empleados en ensayos bioquímicos que permitan determinar la actividad citotóxica sobre células tumorales hepáticas y además estudiar el mecanismo

de muerte (apoptosis/autofagia) mediante el cual se ejerce la actividad. Asimismo, se propone estudiar las vías intracelulares de transducción de señales involucradas en la muerte celular inducida.

Se estudiarán líneas celulares de hepatocarcinoma humano (HepG2, Hep3B, Huh-7). Las células HepG2 y Hep3B, derivadas de hepatomas humanos, se obtuvieron de "American Type Tissue Collection (ATCC, HB 8065 and HB 8064, respectivamente). Se cultivarán en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 100 ml/L de suero fetal bovino, 2 mmol/L de glutamina, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 1,0 mmol/L de aminoácidos no esenciales, 1,0 mmol/L de piruvato de sodio. Las células Huh-7, también derivadas de hepatoma humano se cultivarán en medio base D-MEM suplementado como se describe anteriormente. Todas las células se incubarán a 37 °C y 5 % de CO₂.

a.- *Detección de viabilidad.* Se analizará la viabilidad de las líneas celulares tratadas con los diferentes extractos. Se analizará el efecto tóxico de las mismas sobre las líneas celulares de hepatoma. Para esto se analizará la viabilidad de las células tratadas con diferentes concentraciones de los extractos, mediante el ensayo de MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-compuesto de tetrazolio) (Promega), durante distintos tiempos. Este ensayo mide la actividad de dehidrogenasas mitocondriales en las células viables, basándose en una reacción colorimétrica que permite medir la bioreducción de un compuesto de tetrazolio (MTS) a formazán. La formación de este producto se mide a 490 nm en un espectrofotómetro de placa multiwell. El valor de absorbancia es proporcional al número de células viables. Se incluirán controles de células sin tratar y el porcentaje de viabilidad celular se normalizará a los valores de absorbancia de estos controles. El porcentaje de viabilidad celular se normalizará a los valores de absorbancia de las células controles sin tratar. Se determinará la concentración citotóxica 50 % y 90 % (CC50 y CC90, respectivamente) para los distintos extractos y líneas celulares.

b.- *Detección de la muerte programada por apoptosis.* Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio. Una suspensión celular se teñirá con naranja de acridina/bromuro de etidio (4 µg/ml, Sigma). Se observará bajo microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse 400) y se fotografiará (Nikon Coolpix 4500). Se calculará el porcentaje de células viables (verde brillante), células apoptóticas tempranas (núcleo verde compacto), células apoptóticas tardías (núcleo naranja/rojo brillante) y células necróticas (núcleo naranja/rojo difuso).

bi.- *Detección del ADN fragmentado.* Se extraerá el ADN genómico de las células tratadas con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), según las instrucciones del fabricante. Los ADNs extraídos se almacenarán a 4 °C hasta su uso, y se separarán por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Las bandas o ladder del DNA clivado se visualizarán en un transiluminador, mediante la tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 µg/mL, BioRad).

bii.- *Análisis del ciclo celular.* Se cosecharán las células tratadas, se teñirá el ADN con yoduro de propidio (Sigma, 50 µg/mL) y se digerirá con RNasa (Sigma, 0,5 mg/mL). Se analizarán por citometría de flujo, detectando fluorescencia roja (488 nm de excitación y detector de paso de banda de 620 ± 15 nm), proporcional al contenido de ADN. Se coleccionarán un mínimo de 10000 células por muestra. En los histogramas de ADN se detectarán los picos de fluorescencia, correspondientes al contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) y a las células apoptóticas con un pico "subG0", el cual representa al ADN degradado.

c.- *Determinación de vías intracelulares de transducción de señales implicadas en la apoptosis.* Se estudiarán los posibles efectos sobre las siguientes vías: i) activación de caspasas, ii) diferencias de expresión de proteínas regulatorias de la apoptosis, los miembros de la familia de Bcl-2 [inhibidores (Bcl-2 y Bcl-XL) o estimuladores (Bad, Bid, Bax) de la apoptosis]. Para analizar los niveles de expresión de las proteínas se utilizará la

técnica de Western Blot. Para ello, las células serán lisadas con un buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas totales se determinará mediante el método de Bradford. Se realizarán SDS-Page de distintos porcentajes, en los que se cargarán cantidades iguales de proteínas totales por calle. Estos geles se electrotransferirán a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore), las cuales serán bloqueadas y posteriormente inmunodetectadas (anticuerpos primarios Santa Cruz Biotechnology, segundo anticuerpo-peroxidasa Dako, revelado por electroquimioluminiscencia ECL Amersham), utilizando distintos anticuerpos primarios. Las bandas resultantes de la inmunodetección y del peso molecular correspondiente a cada una de ellas se cuantificarán mediante densitometría de estas utilizando el programa Image-J. Los valores de la cuantificación se normalizarán a un control de carga de proteínas totales (beta-actina).

d.- Detección de autofagia: En las células tratadas con los extractos se determinará la inducción de autofagia como consecuencia de los tratamientos. Los controles negativos serán las células sin tratar. Los controles positivos de la inducción de autofagia se obtendrán mediante la privación de nutrientes en los cultivos celulares. A) Mediante microscopía electrónica de transmisión. En las células tratadas se estudiará la aparición de ultraestructuras características de la autofagia (vesículas autofágicas: autofagosomas, autolisosomas), visualizadas como vesículas doble membrana. B) Detección de autofagia mediante microscopía confocal. En las células transfectadas se estudiará la presencia de LC3 asociada al autofagosoma, por marcación con anticuerpo anti-LC3 fluorescente. La colocalización de esta proteína con LAMP-1 (lysosome associated membrane protein-1), detectada mediante un anticuerpo marcado con otro fluoróforo, permitirá demostrar la fusión del lisosoma con el autofagosoma para formar los autolisosomas. C) Estudio de la expresión de las proteínas asociadas al proceso de autofagia: LC3, beclina-1, p62 por Western Blot. Se utilizarán anticuerpos específicos (Santa Cruz Biotechnology), membranas PVDF (Immobilon-P, Millipore), segundo anticuerpo-peroxidasa (Dako), revelado por electroquimioluminiscencia (ECL GE Healthcare). Se usará beta-actina para normalizar la carga de proteína total en los geles].

Estudio de la actividad antiviral.

Se estudiará la actividad antiviral frente a los siguientes virus: hepatitis B, herpes simplex-1 (HSV-1), sincicial respiratorio (RSV) y adenovirus-7 (ADV-7).

Para HBV se emplearán las células HepG2 2.15 (transfectadas de manera estable con HBV, productoras de viriones infectivos), las cuales se cultivarán en medio base D-MEM suplementado como se describe anteriormente y se incubarán a 37 °C y 5 % de CO₂. Para los otros virus se usarán células Vero y HEP-2, que se cultivarán en medio MEM suplementado y en las mismas condiciones de incubación.

a.- Determinación de la máxima concentración no citotóxica (MCNC) de los extractos en las diferentes líneas celulares. Se analizará el efecto tóxico de los extractos mediante MTS (descrito anteriormente) y se determinará la MCNC de cada extracto para cada línea celular.

b.- Estudio de la inhibición en la replicación viral (actividad antiviral). Para HBV (virus no cultivable) se determinará la inhibición de la secreción de antígenos virales. Las células se tratarán con distintas concentraciones a partir de la MCNC y se cuantificará la producción de HBsAg (antígeno de superficie) y HBeAg (antígeno e) en los sobrenadantes de cultivos tratados, mediante ensayos de ELISA. Además, se cuantificará del ADN viral por PCR en tiempo real, tanto en los sobrenadantes como en las células tratadas.

Para los otros virus (que son cultivables) se realizarán ensayos de cuantificación viral. Primero se hará un screening de actividad antiviral en los extractos. Para ello, diluciones seriadas en base 10 se sembrarán sobre las monocapas celulares crecidas en placas de

96 pocillos con diferentes concentraciones de los extractos, utilizando la MCNC como la concentración más alta. Un control de la infección se realizará en ausencia de los extractos. Las placas se incubarán a 37 °C y 5 % de CO2 durante 72 horas. Luego, se fijarán, teñirán con cristal violeta y se observará el efecto citopático. Los extractos se considerarán positivos cuando el título viral se reduzca un 99 % en su presencia con respecto al control de la infección.

En segundo lugar, se determinará la DE 50% (dosis efectiva 50 %) por el método de placas, determinando la reducción en el título viral o en las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL) en presencia de los extractos. Para ello, monocapas crecidas en placas de 24 pocillos se infectarán con diluciones de los stocks virales en presencia de concentraciones crecientes de los extractos. Luego de una incubación de una hora, se agregará medio de placa (medio de infección con metilcelulosa) y la incubación continuará en presencia de los extractos. Luego de 72 horas, las monocapas se fijarán, teñirán y se contarán las placas de lisis generadas. La DE50 se calculará como la concentración del extracto que reduce a un 50 % el número de placas formadas (UFP) en comparación a las placas generadas en el control de la infección (en ausencia del extracto).

ETAPA 3

ACTIVIDAD N° 6: Desarrollo de prototipos como productos medicinales derivados de Cannabis

Protocolo de preparación de aceites: Se elaborará un protocolo para la preparación de aceites de Cannabis con concentraciones controladas de los principios activos mayoritarios y se contrastará su bioequivalencia con productos certificados internacionales. (DQBQ-IFIMAR)

Evaluación de otros productos con Cannabis: Se desarrollarán micropartículas a partir de la encapsulación de extractos utilizando polímeros biocompatibles como policaprolactona o quitosano comerciales mediante técnicas convencionales. Se estudiará la liberación de los principios activos encapsulados mediante ensayos in vitro. Los ensayos se llevarán a cabo empleando 100 mg de muestra (para cada material), los cuales serán suspendidos en fluido corporal simulado (SBF) a $37 \pm 1^\circ$ C bajo agitación constante del sistema (90 rpm). Para cada ensayo, las micropartículas serán colocadas dentro de membranas inertes de acetato de celulosa de 0.22 μ m de tamaño de poro (Gamafil®). A tiempos preestablecidos se tomarán alícuotas de la solución (3 mL), reponiendo el volumen extraído con SBF fresco. Las alícuotas extraídas serán finalmente analizadas empleando la solución SBF como blanco, a fin de determinar la cantidad máxima de principio activo liberado. Se determinará la cantidad total de principio activo incorporado evaluando la cantidad de sustancia liberada a tiempo "infinito" (esto es, hasta obtener un valor constante liberado), y la cantidad retenida en cada sistema luego del ensayo a tiempo infinito. El contenido de sustancia activa liberada a partir de una masa conocida de micropartículas se determinará por espectrofotometría UV-visible y por HPLC. La evaluación del contenido de sustancia activa retenida se llevará a cabo a partir de la disolución de las micropartículas en solvente orgánico y la medición de las sustancias activas como en el caso del contenido liberado. De acuerdo con la masa total obtenida (liberada + retenida), se determinará el porcentaje en peso de sustancia activa en cada sistema de micropartículas. (INTEMA)

D. RESULTADOS ESPERADOS Y CAMPO DE APLICACION DE LOS RESULTADOS

a) **Resultados esperados:** Con la ejecución de este proyecto se espera lograr una eficiente sinergia entre el sector productivo y el sector académico en un área de relevancia socio-económica como lo es el Cannabis medicinal.

Se plantea obtener:

- 1- Informe de resultados de caracterización inicial.
- 2- Informe de resultados sobre obtención de extractos de Cannabis.
- 3- Informe de caracterización química de extractos.
- 4- Informe de caracterización biológica de los extractos.
- 5- Informe interno entre las UE que contenga los protocolos desarrollados considerados como know-how.

b) **Campo de aplicación de los resultados:** Se espera que los resultados puedan ser aplicados a la industria farmacéutica.

E. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tarea	MESES																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓											
2						✓	✓	✓	✓									
3								✓	✓	✓	✓	✓						
4									✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			
5											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7															✓	✓	✓	✓
8																✓	✓	✓

Martín Racca
 ABOGADO
 TºXVI Fº 347 C.A.M.d.P.

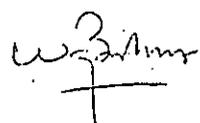
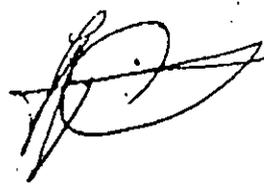
F. GRUPO DE TRABAJO

APELLIDO Y NOMBRE	INSTITUCION	CUIL	CATEGORIA	FUNCION
BARBINI Luciana Fernanda	CONICET	27-21802692-9	Investigadora	Responsable técnica I
CHURIO María Sandra	CONICET	27-16226888-6	Investigadora	Investigadora
GRANONE Luis Ignacio	CONICET	20-34344654-4	CPA	Técnico
FANOVICH María Alejandra	CONICET	27-20062416-0	Investigadora	Responsable técnica II
LERE Martín	CONICET	20-25265226-5	CPA	Técnico

G. PERSONAL DE LA CONTRAPARTE

APELLIDO Y NOMBRE	INSTITUCION	CUIL
RACCA Martin	CANNTEK	20-34134268-7
BELTRAN DEPONTI Matias Nicolas	CANNTEK	20-34768496-2
PARODI Tomas	CANNTEK	20-35621343-3
GARRIGA LACAZE Justo	CANNTEK	20-36617008-2
ALVAREZ Ignacio Luis	CANNTEK	20-37379830-5

Martín Rocco
 ABOGADO
 Tº XVI Fº 347 C.A.M.D.P.

 Dr. Guillermo Elicabe Director de INTEMA y Director de CCT Mar del Plata, Mail: gelicabe@gmail.com	 Luciana Barbini Responsable Técnico I (por DQBQ) Mail: lbarbini@mdp.edu.ar Teléfono: +54 9 223 579 8037
 M.A. Fanovich Responsable Técnico II (por INTEMA) Mail: malanovi@li.mdp.edu.ar Teléfono: +54 9 223 578 7169	 José Luis Iguain Director del IFIMAR
Maria Sandra Churio	

	 M.Sandra Churio E-mail: schurio@mdp.edu.ar Teléfono: +54 9 223 522 2390
Luis.I. Granone	 Luis.I. Granone Teléfono: +54 9 223 456 8206
Martin Enrique Lere	 Martin .E. Lere E-mail: mlere@fi.mdp.edu.ar Teléfono: +54 9 223 681 6449

Martín Racca
ABOGADO
T.XVI Fº 347 C.A.M.B.P.





República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

**Hoja Adicional de Firmas
Documentación Técnica**

Número: IF-2023-37939418-APN-GVT#CONICET

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Jueves 6 de Abril de 2023

Referencia: Convenio

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 16 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2023.04.06 11:00:22 -03:00

MARTIN RACCA
20341342687

CONVE-2023-46099717-APN-GVT#CONICET

Página 17 de 17
Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2023.04.06.11:00:23 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

**Hoja Adicional de Firmas
Convenio**

Número: CONVE-2023-46099717-APN-GVT#CONICET

CIUDAD DE BUENOS AIRES

Martes 25 de Abril de 2023

Referencia: Convenio pre-aprobado de I+D entre CONICET y CANNTEK S.A ADENDA

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 17 pagina/s.

Digitally signed by Gestion Documental Electronica
Date: 2023.04.25 09:41:08 -03:00

Sergio Gaston Romano
Gerente
Gerencia de Vinculación Tecnológica
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2023.04.25 09:41:12 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número:

Referencia: Creacion de documento, peticion desde Expediente Electrónico EX-2023-54264329- -APN-DD#MS

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 61 pagina/s.