

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 362**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/192** (2006.01)  
**A61K 36/185** (2006.01)  
**A61P 17/06** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05704605 .4**  
96 Fecha de presentación: **02.02.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1893191**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **CANNABINOIDES ÁCIDOS MEDICINALES.**

30 Prioridad:  
**02.02.2004 EP 04075300**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.02.2012**

73 Titular/es:  
**NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR  
TOEGEPAST-NATUURWETENSCHAPPELIJK  
ONDERZOEK TNO  
SCHOEMAKERSTRAAT 97  
2628 VK DELFT, NL**

72 Inventor/es:  
**KORTHOUT, Henricus, Adriaan, Anne, Jacobus;  
VERHOECKX, Kitty, Catharina, Maria;  
WITKAMP, Rentje, Frederik;  
DOORBOS, Robert, Paul y  
WANG, Mei**

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 375 362 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Cannabinoides ácidos medicinales

5 La presente invención se refiere a un cannabinoide ácido para la utilización médica y a un extracto de cannabis que comprende un cannabinoide ácido.

10 El  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) se encuentra de forma natural en el cannabis. Se ha dado a conocer que el THC se utiliza como analgésico, por ejemplo, para pacientes que padecen de artritis reumatoide. Un efecto secundario del THC es su actividad psicoactiva. Además, el THC normalmente se administra fumando, lo cual puede ser perjudicial para la salud general, en particular para los pulmones y el sistema coronario.

15 El documento WO 89/01332 describe un metabolito ácido de THC, en el que el grupo metilo en la posición 9, un metabolito principal formado en humanos y otros mamíferos está sustituido por un grupo carboxilo. Se da a conocer que este metabolito no es psicoactivo. Se sugiere su utilización como agente terapéutico para objetivos, tales como el tratamiento del dolor crónico y la inflamación de tejido, asociados a menudo con enfermedades, tales como la artritis reumatoide. Los ejemplos muestran una prueba de platos calientes con ratón para la analgesia, lo que indica que, en ratones, el metabolito muestra aproximadamente la misma actividad analgésica que el THC y una actividad algo inferior al Naproxen. Los ejemplos indican además que el metabolito no induce la formación de lesiones gástricas en una prueba con animales bajo las condiciones en las que la aspirina sí lo hace.

25 En una revisión por Bhargava (Gen. Pharmac. Vol 9 (1978), No 4, páginas 195-213), se mencionan las utilidades potenciales de los cannabinoides en términos bastante generales. Bhargava menciona que se han probado farmacológicamente varios cannabinoides, sin dar a conocer ningún detalle una actividad médica específica para THC carboxilados (ácidos de THC), tales como el ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico o similares. Además, se hace referencia a la actividad analgésica de THC y varios otros cannabinoides en comparación con la morfina. Se da a conocer que el THC realiza una acción analgésica igual que la morfina, pero se da a conocer que otros cannabinoides probados son mucho menos potentes o incluso inactivos.

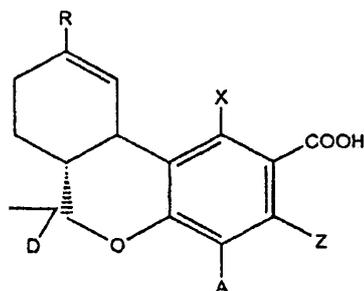
30 Williamson y Evans (Drugs ("Fármacos") 2000, Diciembre 60(6): 1303-1314) da a conocer en términos generales una utilización clínica potencial del cannabis. No se da a conocer la utilización específica de los ácidos de THC, tales como el ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico o similares, como principio farmacéutico activo.

35 El documento GB-A 2 384 707 se refiere a la utilización de un cannabinoide ácido, en particular cannabidiol (CBD) y ácido cannabidiol (CBDA) para la utilización como una sustancia farmacéuticamente activa en el tratamiento de náuseas, vómitos, emesis y mareo por movimiento. Los compuestos se pueden obtener mediante la extracción del cannabis. Como resultado de la extracción, cantidades relativamente pequeñas de los ácidos de THC pueden estar presentes en el extracto, pero no se menciona la utilización de un ácido de THC como sustancia farmacéuticamente activa.

40 Aún existe un deseo continuo por agentes terapéuticos alternativos. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es dar a conocer un agente terapéutico de este tipo.

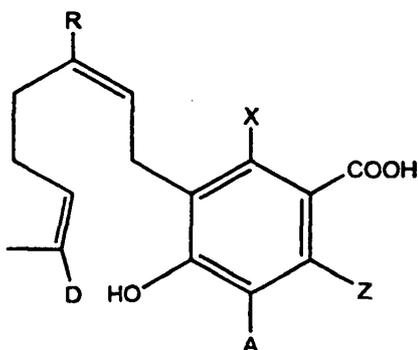
45 Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que un precursor específico de THC presenta propiedades que son de interés para la utilización médica, tales como propiedades analgésicas y/o antiinflamatorias. Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, según la reivindicación 12. Además, la presente invención se refiere a un extracto de planta, según la reivindicación 1.

50 Más en particular, la presente invención se refiere a un cannabinoide ácido representado por las fórmulas Ia o Ib para la utilización como medicamento, según cualquiera de las reivindicaciones 15-19.



Fórmula Ia

Una composición farmacéutica según la reivindicación 12. Además, la presente invención se refiere a un extracto de planta, según la reivindicación 1.



Fórmula Ib

En estas formulas, X, Z y A representan cada una un grupo diferente seleccionado de los grupos -OH, hidrógeno y un primer alquilo; por consiguiente, cada uno de estos cuatro grupos están presentes en el compuesto. El primer alquilo es preferentemente un alquilo lineal o ramificado C1-C10, más preferentemente un alquilo lineal o ramificado C4-C7, incluso más preferentemente n-pentilo. El primer alquilo es preferentemente Z.

D representa -OH o alquilo, preferentemente un alquilo lineal o ramificado C1-C3, en particular un metilo.

R representa un hidrógeno, un  $C_nH_{2n}-OH$ , un  $C_nH_{2n}-COOH$  o un segundo alquilo. La n en estos grupos es un número entero, preferentemente 0, 1 ó 2. R es preferentemente un alquilo lineal o ramificado C1-C3, más preferentemente  $-CH_3$ .

La figura 1 muestra una ruta biosintética de cannabinoides.

Las figuras 2A y 2B muestran el efecto del tratamiento con un extracto de cannabis que comprende THC-A en la liberación de  $TNF-\alpha$  en un ensayo ELISA.

Las figuras 3A y 3B muestran respectivamente el efecto inhibitor en la liberación de  $TNF-\alpha$  y el efecto estimulador en la liberación de interleuquina-10 de un extracto de cannabis no calentado que comprende THC-A.

La figura 4 muestra el efecto del tratamiento con (un extracto que comprende) THC-A en ratones que padecen encefalomiélitis autoinmune.

En el contexto de la presente invención, el término "ácido" se utiliza para describir un compuesto que tiene un grupo carboxilo, a menos que se especifique lo contrario. En general, un precursor ácido de THC es transformable en THC mediante descarboxilación, opcionalmente en combinación con una o más de otras reacciones, tales como una ciclación de un precursor que tiene dos de los anillos que forman el núcleo del THC para formar el tercer anillo, (des)alquilación, (des)hidroxilación, y similares. Además de los compuestos de fórmula Ia y Ib, algunos ejemplos de precursores de THC ácidos son el ácido cannabidiólico (CBDA), ácido cannabicroménico (CBCA), ácido cannabinorólico (CBNRA), ácido cannabigerólico (CBGA), ácido cannabinólico (CBNA) y análogos funcionales y estructurales de los mismos. En la ruta mostrada en la figura 1 se muestran un conjunto de estos compuestos.

Se ha encontrado que un compuesto de fórmula Ia o Ib presenta actividad analgésica y/o antiinflamatoria. Esto es sorprendente, ya que este hallazgo va en contra de lo que se puede concluir a partir de la prueba estándar de unión al receptor, en la que se determinaron las constantes de disociación ( $K_d$ ) para la unión de los compuestos a los receptores de cannabinoide CB1 y CB2 y se compararon con la unión del THC (véanse los ejemplos).

En particular, se puede utilizar un compuesto ácido según las fórmulas Ia o Ib para aliviar el dolor y/o para suprimir una respuesta inflamatoria, preferentemente para modular la liberación de uno o más mediadores inflamatorios, en particular una citoquina o citoquinas, en un animal, preferentemente en un ser humano.

En una realización altamente preferente, el compuesto ácido se utiliza para suprimir la liberación de una o más citoquinas proinflamatorias, en particular  $TNF-\alpha$  (factor  $\alpha$  de necrosis tumoral) y/o para estimular la liberación de citoquinas antiinflamatorias, en particular interleuquinas, más en particular, la interleuquina-10 (IL-10). Un compuesto

o composición que puede suprimir tanto la liberación de una citoquina proinflamatoria como estimular la liberación de una citoquina antiinflamatoria, tal como se da a conocer por la presente invención, es de considerable interés para la industria farmacéutica y la ciencia médica.

5 Un compuesto ácido según la fórmula la o lb se puede utilizar, por ejemplo, para el tratamiento (profiláctico o terapéutico) de un animal, preferentemente un ser humano, contra una inflamación, una enfermedad autoinmune o una infección. También se puede utilizar para aliviar síntomas, tales como el dolor o náuseas, que acompañan a una enfermedad.

10 En particular, el compuesto según la fórmula la o lb se puede utilizar, según la presente invención, para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que comprende esclerosis múltiple, artritis, artrosis y otras enfermedades inflamatorias de los huesos y/o las articulaciones, encefalomielitis (en particular, encefalomielitis autoinmune), SIDA, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias de la piel (dermatitis, Psoriasis) y síntomas aliviados asociados con cáncer, anorexia, SIDA, espasticidad, glaucoma y dolor crónico.

15 Además, se ha encontrado que un compuesto según la fórmula la o lb es sólo modestamente psicoactivo o incluso no psicoactivo. Además, se espera que el riesgo de daño gastrointestinal como resultado de la utilización de un compuesto, según la presente invención, sea bajo, y en particular, inferior, como mínimo, al de algunos fármacos comercialmente muy exitosos, por ejemplo, la aspirina.

20 Se han conseguido resultados particularmente buenos con un cannabinoide ácido según la fórmula la o lb, más en particular un compuesto según la fórmula la, en la que Z representa alquilo y X representa OH y con un cannabinoide ácido según la fórmula la o lb, más en particular un compuesto según la fórmula la, en la que A es hidrógeno. En presencia de dicho compuesto, se ha encontrado que la supresión de una respuesta inflamatoria, tal como se indica por su capacidad para suprimir la liberación de TNF- $\alpha$ , es elevada en comparación con el THC, a la vez que no presenta un efecto secundario psicoactivo perjudicial destacable. De estos compuestos, el ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico (THC-A), es particularmente preferente. Este compuesto se representa mediante la fórmula la, en la que Z representa n-pentilo, X es -OH, A es hidrógeno, D es metilo y R es metilo. De este compuesto en particular, se ha encontrado, sorprendentemente, que es capaz tanto de suprimir una citoquina proinflamatoria, tal como TNF- $\alpha$ , como de estimular una citoquina antiinflamatoria, tal como interleuquina 10.

25 En principio, es posible sintetizar (bio)químicamente un compuesto según la fórmula la o lb. El experto en la materia sabrá cómo realizar dicha síntesis en base al conocimiento general común y a la presente descripción.

30 Sin embargo, una ventaja de la presente invención es que el cannabinoide ácido, en particular un compuesto en el que el primer alquilo en el anillo aromático es n-pentilo (tal como Z en la fórmula la o lb, o en general, en la posición equivalente en un precursor ácido de THC), puede derivar de una fuente natural, tal como cannabis. Se puede utilizar directamente un cannabinoide ácido (para tratar una indicación médica) sin modificaciones químicas adicionales, tales como la descarboxilación del compuesto en THC y la posterior metabolización a THC.

35 Se puede utilizar un compuesto según la fórmula la o lb en forma aislada o en un extracto de una fuente natural, en particular, de puntas de flores de cannabis. Es particularmente adecuado una planta o una parte de la misma, que comprende, como mínimo, el 5% en peso de cannabinoides ácidos, por ejemplo, el 5-15% en peso. Se han conseguido resultados muy buenos con *Cannabis sativa*, *Cannabis indica*. En la técnica se conocen métodos adecuados para extraer un compuesto ácido, según la presente invención, e incluyen extracción líquida, por ejemplo con una fase apolar, tal como cloroformo y una fase polar, en particular un alcohol alifático, tal como metanol o etanol. En dicha extracción, el cannabinoide ácido se encuentra normalmente en la fase apolar, especialmente si el procedimiento de extracción se lleva a cabo a un pH inferior a 7. El experto en la materia sabrá cómo llevar a cabo una extracción adecuada y procesar posteriormente el cannabinoide ácido, en base al conocimiento general común y a la información descrita en el presente documento. Se ha encontrado que un extracto, según la presente invención, que comprende un cannabinoide ácido, es eficaz en la reducción de la excreción de TNF- $\alpha$  en macrófagos humanos, demostrando un efecto inhibitor del cannabinoide ácido. En una realización, se ha encontrado además, sorprendentemente, que es eficaz también en el incremento de la liberación de interleuquinas (véanse los ejemplos).

40 La preparación del extracto, según la presente invención, se lleva a cabo, en general, bajo condiciones esencialmente no descarboxilantes para evitar la formación excesiva de THC, que puede ser no deseada por sus efectos secundarios psicoactivos y/o razones legales, siendo actualmente el THC ilegal en muchos estados. En la práctica, por lo tanto, es preferente realizar la extracción a una temperatura que no supere 95°C, más preferentemente a una temperatura inferior a, aproximadamente 50°C, incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 25°C. Se han conseguido resultados muy buenos con la extracción a una temperatura que no supera aproximadamente 4°C. El límite inferior no es particularmente crítico, siempre que el medio de extracción

permanezca fluido.

A continuación, el extracto se puede procesar adicionalmente de cualquier modo, sin exponerse excesivamente al calor para mantener condiciones esencialmente no descarboxilantes y, de este modo, evitar la formación excesiva de THC. En particular, dichas condiciones se cumplen si el extracto no está excesivamente expuesto a temperaturas de aproximadamente 200°C o más. Preferentemente, el extracto se procesa a una temperatura no superior a aproximadamente 50°C. Más preferentemente, cualquier procesado adicional del extracto tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 25°C o menos. Por consiguiente, el disolvente del extracto se elimina, preferentemente, mediante liofilización.

En la práctica, las condiciones se consideran esencialmente no descarboxilantes, el tratamiento térmico se considera no excesivo cuando la cantidad de THC como el porcentaje del peso total en seco del extracto es inferior al 5% en peso, preferentemente inferior al 2% en peso, incluso más preferentemente inferior al 0,5% en peso. Por razones prácticas, la cantidad de THC es preferentemente inferior a la cantidad máxima permisible para permitir la utilización como medicamento sin prescripción determinado por ley. En este aspecto, es interesante indicar que la presente invención permite la preparación de extractos con menos de, aproximadamente, el 0,15% en peso como el porcentaje del peso seco sin necesidad de eliminación selectiva de THC del extracto.

El THC puede estar totalmente ausente (es decir, no determinable por una técnica analítica convencional) en un extracto u otra composición, según la presente invención. Por razones prácticas, algo del THC puede estar presente, tal como, aproximadamente, el 0,01% en peso como el porcentaje del peso seco o más.

Se han conseguido buenos resultados con respecto a sus propiedades farmacéuticas y pocos efectos secundarios con un extracto u otra composición, según la presente invención, en los que la cantidad de THC como el porcentaje en peso de la cantidad de, como mínimo, un cannabinoide ácido, es de 0-2% en peso, preferentemente menos de aproximadamente un 1% en peso. Tal como se indica anteriormente, el THC puede estar ausente, aunque algo de THC puede estar presente; por tanto, por razones prácticas, un límite inferior preferente para la cantidad de THC como el porcentaje en peso de la cantidad de, como mínimo, un cannabinoide ácido, es aproximadamente un 0,01% en peso, más en particular, aproximadamente un 0,1% en peso.

Se han conseguido buenos resultados, entre otros, con un extracto, en particular un extracto de cannabis, que comprende, como mínimo, aproximadamente 10 mg/g en base al peso en seco, preferentemente, como mínimo, aproximadamente 15 mg/g en base al peso en seco, del cannabinoide ácido. Se han conseguido muy buenos resultados con un extracto que comprende, como mínimo, aproximadamente 20 mg/g en base al peso en seco del cannabinoide ácido. El límite superior no es particularmente crítico. Por razones prácticas, el límite superior es, preferentemente, aproximadamente 500 mg/g, más preferentemente 250 mg/g de peso en seco.

Preferentemente, una composición, según la presente invención, tal como un extracto (de cannabis), comprende, como mínimo, un compuesto seleccionado del grupo que comprende ácido cannabidiólico (CBD-A), cannabidiol (CBD), ácido cannabigerólico (CBGA), cannabigerol (CBG), ácido cannabinólico (CBN-A) y cannabinal (CBN), ácido cannabicroménico (CBC-A) y cannabicromeno (CBC). En particular, se ha encontrado que dicha composición que también comprende un cannabinoide, según la fórmula Ia o Ib, preferentemente la fórmula Ia, es muy eficaz como preparado antiinflamatorio. La cantidad de los compuestos de este grupo se puede elegir dentro de unos límites amplios. Se han conseguido buenos resultados, entre otros, con una composición, en particular un extracto, en la que la cantidad total de CBD y CBD-A se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,01-200%, más en particular aproximadamente 1-100% en peso en base a la cantidad de, como mínimo, un cannabinoide ácido. En particular, en este intervalo, existen indicios de que se produce sinergia.

El extracto, según la presente invención, se puede utilizar en cualquier forma. Por ejemplo, puede estar de manera muy adecuada en forma seca o en forma líquida, en particular solubilizado en etanol, agua, un aceite vegetal o un líquido que comprende cualquiera de estos compuestos solos o combinados.

El extracto puede estar presente de manera muy adecuada en forma de una pasta, crema o pomada. Dicha forma es particularmente atractiva para aplicaciones tópicas, por ejemplo, para tratar una inflamación dérmica.

Un compuesto ácido o extracto, según la fórmula Ia o Ib, puede estar presente de manera muy adecuada en un preparado farmacéutico que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un preparado puede tener la forma de una tintura, una pomada, un pulverizado, un inhalado, un polvo, un granulado, un supositorio, un comprimido o una cápsula.

De particular interés es la administración como un preparado líquido para uso oral o aplicación dérmica como una crema o pomada. Las aplicaciones a través de la vía nasal o inhalatoria son, en particular, atractivas para ácidos purificados.

El experto en la material sabrá cómo determinar un régimen de dosificación particular, dependiendo de la indicación médica, el estado de los pacientes y el tipo de administración.

- 5 El compuesto, según la fórmula la o Ib, el preparado farmacéutico o el extracto se pueden utilizar en un método de tratamiento de un animal, preferentemente un ser humano, con un cannabinoide ácido, cuyo tratamiento comprende administrar el cannabinoide ácido en forma ácida. En particular, esto significa que el cannabinoide se administra bajo condiciones esencialmente no descarboxilantes, a diferencia de los modos convencionales de administración de cannabinoides, es decir fumando (calentando e inhalando) puntas de flores secas de plantas de cannabis. Además de evitar los efectos secundarios psicoactivos (como resultado de la formación de THC durante el calentamiento), la presente forma de administración no impone ningún riesgo para la salud normalmente asociado con el fumar. Las formas adecuadas de administración incluyen la administración oral (tal como la ingestión o la inhalación) y cualquier otro modo médico convencional de administración de un medicamento.
- 10
- 15 Por consiguiente, la presente invención se refiere además a la utilización de un cannabinoide ácido, de manera opcional en forma de un extracto o un preparado farmacéutico tal como se describe en la presente, en la fabricación de un medicamento para la administración del cannabinoide en forma ácida.

La presente invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes ejemplos.

20

### **Ejemplos**

#### Ejemplo 1: Preparado de los extractos

- 25 Para fabricar los extractos se utilizaron puntas de flores de tres variedades de cannabis que pertenecen a *C. sativa* o *C. indica* e híbridos. Las puntas de flores se ultracongelaron inmediatamente después de recogerse y, a continuación, se liofilizaron poco antes de la extracción.

- 30 Se extrajeron dos veces 700 mg de las puntas de flores secas con 20 mL de cloroformo/metanol (1:9), según el siguiente procedimiento:

- 35 - se mezclaron 700 mg de puntas de flores con 18 ml de metanol y se sonicaron durante 5 minutos. Se añadieron 2 mL de cloroformo, después de lo cual se sonicó la mezcla de nuevo durante 5 minutos. A continuación, se realizó la extracción (60 minutos a 4°C, agitando a 250 rpm). Se extrajo el sobrenadante y se repitió la extracción con el residuo vegetal restante. Ambos sobrenadantes se agruparon y se almacenaron a -20°C hasta que se iniciaron las mediciones.

#### Composición de los extractos no calentados

- 40 La concentración de THC-A, CBD (el total de ácido cannabidiólico y cannabidiol), CBN y THC se determinó con LC/MS-MS.

Los resultados se muestran en la tabla 1.

45

Tabla 1

Extracto	THC-A	THC	CBD	CBN
Todas las concentraciones en mg por gramo de peso seco				
cultivo 1	202	1,43	0,21	<0,00005
cultivo 2	184	1,14	0,16	<0,00005
cultivo 3	16,0	0,11	14,86	<0,00005

#### Ejemplo 2: Estudios de unión a receptores

- 50 Se determinó la afinidad de los extractos por la unión a los receptores de cannabinoide CB1 y CB2 en un ensayo de unión a receptor. En el mismo, se utilizó un ensayo competitivo entre los componentes de los extractos y ligando CP55.940 marcado con tritio. Los receptores fueron CB1 y CB2 humanos recombinantes coexpresados con proteínas Gαβ1γ en células Sf9.

- 55 En los estudios de unión, se compararon los extractos no calentados con extractos calentados a 200°C para descarboxilar el THCA. Las constantes de afinidad ( $K_d$ ) se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Extracto	K <sub>d</sub> CB1 [μM]	K <sub>d</sub> CB2 [μM]
Cultivo 1 no calentado	>1	>1
Cultivo 2 no calentado	>1	>1
Cultivo 3 no calentado	>1	>1
Cultivo 1 calentado	0,0062	0,019
Cultivo 2 calentado	0,0079	0,021
Cultivo 3 calentado	0,017	0,023

Un compuesto con una K<sub>d</sub> baja se considera, en general, como un potencial agente antiinflamatorio o como un potencial analgésico. A partir de los valores de K<sub>d</sub> mucho más elevados del extracto no calentado (no descarboxilado), se esperaba que los cannabinoides ácidos no fueran agentes prometedores para aliviar el dolor o para actividad antiinflamatoria.

Para confirmar que la diferencia en la afinidad se puede asignar a los cannabinoides, se repitieron los experimentos con los componentes purificados (obtenidos mediante fraccionamiento en una columna Hypersil 10 C18, 250 x 10 mm, 10 micras con una precolumna de 50x10 mm, Phenomenex)

Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Extracto	K <sub>d</sub> CB1 [μM]	K <sub>d</sub> CB2 [μM]
THVC-A	>1	>1
THC	0,0038	0,0032
CDB	0,66	0,28
CBN*	(0,036)	(0,017)

\* se halló que el CBN estaba contaminado con THC.

De este modo, en base a los estudios de unión, parecía que los precursores de THC, en particular los cannabinoides ácidos, tales como THC-A, no eran compuestos prometedores para el uso médico.

### Ejemplo 3: Ensayo basado en el sistema inmune biológico

Se diferenciaron monocitos U937 (descritos, por ejemplo, en Izeboud y otros, J. Rec. Sign. Tr. Research (1999), 19 (1-4): 191-202) en macrófagos mediante el tratamiento de los monocitos durante 16 horas con acetato de forbol miristato (PMA).

Después de un almacenamiento de 48 horas de los macrófagos en medio de cultivo RPMI-1640, en el que el medio se sustituyó cada 24 horas, se dejó que los macrófagos se recuperaran del tratamiento con PMA durante 48 horas, durante el cual el medio de cultivo se sustituyó cada 24 horas. En el día tres después del tratamiento con PMA, los macrófagos se expusieron a lipopolisacárido (LPS) (Sigma-Aldrich, L-2630). Los macrófagos se expusieron a LPS en presencia o ausencia de los extractos de cannabis descritos anteriormente (en metanol). Los extractos se analizaron de forma no diluida y con una dilución de 2,5 veces, 5 veces, 7,5 veces y 10 veces. En el medio de cultivo, se determinó el nivel de TNF-α mediante una prueba ELISA específica (TNFa Cytoset, Biosource CHC1754). Además, se determinó la toxicidad de los extractos de cannabis con una prueba MTT (Sigma-Aldrich, M-2128) (también descrita en Mosmann, J. Immunol. Meth 1983, 55-63).

Los resultados del ELISA de TNF-α indicaron que la liberación de TNF-α después del tratamiento con un extracto no calentado se reducía de manera considerable, en comparación con el tratamiento de control (con una inhibición casi completa de la liberación para el extracto no calentado y no diluido). Con el extracto calentado (en el que el THC-A está descarboxilado), no se observó un efecto claro en la liberación de TNF-α. Esto demuestra que los extractos no calentados son, en general, más potentes o, como mínimo, tan potentes en la supresión del TNF-α como los extractos calentados. Esto es una indicación de que el precursor ácido, tal como THC-A, es una alternativa adecuada a THC como agente antiinflamatorio y potencialmente más potente que THF y/o metabolitos de THF carboxilados, dados a conocer previamente.

Las pruebas de MTT demostraron además que ninguno de los extractos analizados era tóxico (datos no mostrados).

El experimento se repitió con extractos de dos cultivos de cannabis obtenidos mediante el método descrito en el ejemplo 1. Parte de los extractos se calentó (habitualmente 7 minutos a 200°C), el resto no se expuso a una temperatura superior a 25°C (se mantuvo normalmente refrigerado). Se administraron los extractos calentados y no

calentados en forma diluida (dilución de 100 veces a 1000 veces) a cultivos de células U937 después de la inducción con LPS (tal como se describe anteriormente).

Las concentraciones de THC y THC-A fueron tal como se muestran en la tabla 4:

5

Tabla 4

	THC (mg/mL)	THC-ácido (mg/mL)
Cultivo 1 calentado	4,81	0,12
Cultivo 1 no calentado	0,04	5,05
Cultivo 2 calentado	4,37	0,09
Cultivo 2 no calentado	0,03	4,60

Las figuras 2A y 2B muestran que se consiguió una reducción considerable en TNF- $\alpha$  con todos los extractos no calentados (ricos en THC-A), con una inhibición (casi) completa a una dilución de 100 veces. En cambio, el tratamiento con los extractos calentados (ricos en THC) no dieron lugar a una reducción de la liberación de TNF- $\alpha$ . Esto demuestra la potencia de un extracto, según la presente invención, para el tratamiento de una inflamación, en particular un extracto obtenible mediante la extracción bajo condiciones en las que se evita la descarboxilación, tal como mediante la extracción a una temperatura por debajo de 25°C, más en particular a una temperatura de aproximadamente 4°C o menos.

15

#### Ejemplo 4: Efecto del cannabinoide ácido en citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias

El THC ácido era capaz de disminuir los niveles de ARNm que codifican TNF-alfa en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) aisladas y cultivadas que fueron estimuladas mediante PHA (fitohemaglutinina). Mediante la estimulación con PHA, se induce una respuesta que se parece a una reacción inflamatoria. El TNF-alfa es conocido como una citoquina proinflamatorias que se libera durante las etapas iniciales de la inflamación.

20

En el mismo estudio, se incrementaron los niveles de ARNm que codificaba la interleuquina-10 (IL-10). La IL-10 es conocida como una citoquina antiinflamatoria. El diseño experimental del estudio fue el siguiente:

25

Se prepararon PBMC tal como se describe por Visser y otros (J. Investigative Medicine, 49 (2), 2001). En placas de 6 pocillos, se rellenó cada pocillo con 2,5 mL de PBMC ( $2 \times 10^6$  células en IMDM (medio de Dulbecco modificado por Isocove + glutamax, que contiene 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 U/mL y suero fetal bovino al 10%)) junto con 500  $\mu$ L de THC-ácido (o medio como control) y 500  $\mu$ L de PHA (o medio como control). Después de una incubación durante 4 días (a 37°C), se aisló el ARN total utilizando Trizol™ según el protocolo del fabricante. A partir del ARN aislado, se sintetizó ADNc mediante el *Sistema de Transcripción Inversa Promega* según el protocolo del fabricante.

30

Se determinaron los niveles de ADNc mediante PCR a tiempo real (RT) utilizando el ensayo de Expresión Génica Taqman® (Applied Biosystems) según el protocolo del fabricante. A partir de los niveles de ADNc, se calculó la cantidad de copias de ARNm que presenta el original en las PBMC en comparación con la  $\beta$ -actina de genes constitutivos. La presencia de THC ácido durante la incubación dio lugar a un descenso en el nivel de la citoquina TNF $\alpha$  proinflamatoria y a un incremento en el nivel de citoquina IL-10 antiinflamatoria (véanse las figuras 3A y 3B). Estos resultados apoyan adicionalmente el potencial del THC ácido para inhibir la inflamación.

40

#### Ejemplo 5: Estudio *in vivo* de la utilización de cannabinoide ácido en el tratamiento de la encefalomiелitis.

El efecto del THC ácido purificado y los extractos de cannabis no calentados se analizó *in vivo* en un modelo de ratón para Encefalomiелitis Autoinmune Experimental.

45

En un estudio aleatorio (10 ratones para cada tratamiento), se indujo la enfermedad en ratones SJL hembras (Harlan) de 9 semanas de vida después de la inmunización con el proteolípido-proteína descritos por Nagelkerken y otros (Interactions Do Not Play a Major Role in Inhibition of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Anti-CD154 Monoclonal Antibodies ("Las interacciones no juegan un papel principal en la inhibición de la encefalomiелitis autoinmune experimental por anticuerpos monoclonales anti-CD154"), J Immunol, 173, 993-999, 2004). Entre el día 0 y el día 20 después de la aparición de la enfermedad, se trataron diariamente los ratones con una dosis oral específica de THA ácido o extracto no calentado según el siguiente esquema:

50

Grupo 1: vehículo (0,2 mL de aceite de oliva/día);

55

Grupo 2: 1 mg de THC ácido purificado en 0,2 mL de aceite de oliva/día;

Grupo 3: extracto de cannabis no calentado en 0,2 mL de aceite de oliva que contiene 1 mg THC ácido/día.

5 Se siguió la gravedad de la enfermedad durante 42 días después de la aparición de la enfermedad mediante el comportamiento clínico y el peso corporal (descrito por Nagelkerken y otros (Interactions Do Not Play a Major Role in Inhibition of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Anti-CD154 Monoclonal Antibodies ("Las interacciones no juegan un papel principal en la inhibición de la encefalomiélitis autoinmune experimental por anticuerpos monoclonales anti-CD154"), J Immunol, 173, 993-999, 2004). Después de 42 días, los ratones se sacrificaron y se estudió el efecto en el bulbo raquídeo. El tratamiento con 1 mg de THC ácido purificado o el extracto de cannabis no calentado que contenía 1 mg de THC ácido redujo de manera significativa el número de células inflamatorias en el bulbo raquídeo en comparación con el vehículo.

10 Además, tal como se muestra en la figura 4, el tratamiento con 1 mg de THC ácido o extracto de cannabis no calentado mejoró de manera significativa la valoración clínica. Las valoraciones se muestran en la figura 4 tal como se define a continuación:

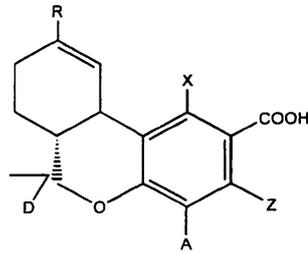
- 15 0: sin infiltrados  
1: acumulación perivascular leve  
2: acumulación perivascular leve, multifocal  
3: acumulación perivascular, múltiples capas celulares, multifocal.

20 Los resultados en este experimento indican además que el extracto no calentado tiende a ser más eficaz que el THC-A purificado (siendo cero la valoración promedio de los experimentos con el extracto). En base a esta indicación, se realizó un análisis multivariante para verificar si es probable que otros componentes en el extracto contribuyan positivamente al tratamiento. A partir de los resultados del análisis multivariante, era claro que efectivamente éste era el caso (resultados no mostrados).

REIVINDICACIONES

1. Extracto de planta que comprende, como mínimo, un cannabinoide ácido representado por la fórmula la o lb

5

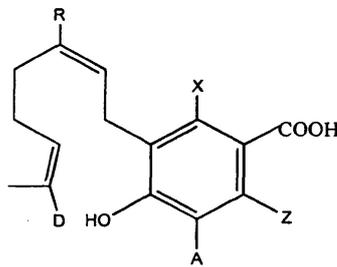


10

15

Fórmula la

20



25

30

Fórmula lb

en la que X, Z y A representan cada uno un grupo diferente seleccionado de los grupos -OH, hidrógeno y un primer alquilo; en la que R representa un hidrógeno, un  $C_nH_{2n}-OH$ , un  $C_nH_{2n}-COOH$  o un segundo alquilo; y en la que D representa hidroxilo o un tercer alquilo,

35 - en cuyo extracto, la cantidad de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol como el porcentaje en peso del peso total en seco del extracto es de 0-5% en peso y en el que el extracto comprende, como mínimo, 20 mg/g, en base al peso en seco del extracto, del cannabinoide ácido, o

40 - en cuyo extracto, la cantidad de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol como el porcentaje en peso del peso total en seco del extracto es de 0-1% en peso y en el que el extracto comprende, como mínimo, 15 mg/g, en base al peso en seco del extracto, del cannabinoide ácido.

2. Extracto, según la reivindicación 1, en el que el extracto comprende, como mínimo, 20 mg/g, en base al peso de extracto en seco, del cannabinoide ácido, y en el que la cantidad de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol es inferior al 2% en peso.

45

3. Extracto, según la reivindicación 2, en el que el extracto comprende, como mínimo, 20 mg/g, en base al peso de extracto en seco, del cannabinoide ácido, y en el que la cantidad de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol es inferior al 1% en peso.

50 4. Extracto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z representa el primer alquilo, X representa el OH y A representa el hidrógeno.

55 5. Extracto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer alquilo es un alquilo lineal o ramificado C4-C7.

6. Extracto, según la reivindicación 5, en el que el primer alquilo es n-pentilo.

7. Extracto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R es un alquilo lineal o ramificado C1-C3.

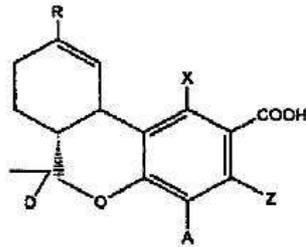
60 8. Extracto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, como mínimo, un compuesto seleccionado del grupo que comprende ácido cannabidiólico, cannabidiol, ácido cannabigerólico, cannabigerol, ácido cannabinólico y cannabinol.

9. Extracto, según la reivindicación 8, en el que la cantidad total de cannabidiol y ácido cannabidiólico se encuentra en el intervalo de 0,01-200% en peso en base a la cantidad de, como mínimo, un cannabinoide ácido representado por la fórmula la o lb.

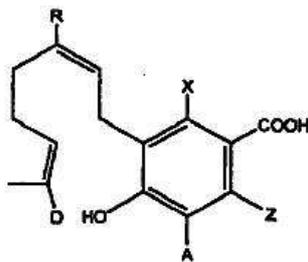
5 10. Extracto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el extracto es un extracto líquido que comprende etanol y/o metanol.

11. Extracto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para utilizar como medicamento.

10 12. Preparado farmacéutico que comprende, como mínimo, un cannabinoide ácido representado por la fórmula la o lb



Fórmula la



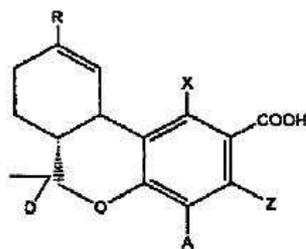
Fórmula lb

30 - en la que X, Z, D, R y A son tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5, 6, 7, como principio activo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, cuyo preparado comprende el 0-2% en peso de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol como el porcentaje en peso de la cantidad del cannabinoide ácido.

35 13. Preparado farmacéutico, según la reivindicación 12, en el que el preparado comprende menos del 1% en peso de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol como el porcentaje en peso de la cantidad del cannabinoide ácido.

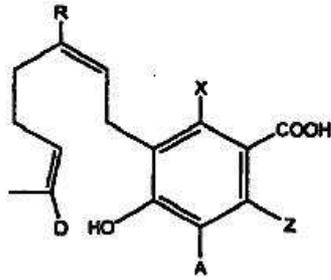
40 14. Preparado farmacéutico, según la reivindicación 12 ó 13, en el que el preparado se selecciona del grupo que comprende tinturas, pomadas, pulverizados, inhalados, polvos, gránulos, supositorios, cremas, comprimidos y cápsulas.

45 15. Cannabinoide ácido representado por la fórmula la o lb



Fórmula la

5



10

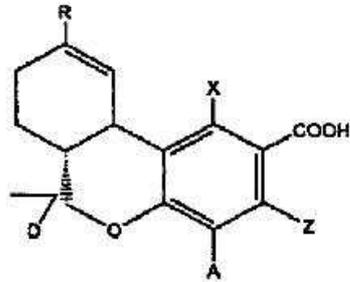
Fórmula Ib

15

en la que X, Z, D, R y A son tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5, 6, 7, un extracto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o un preparado, según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, para utilizar como medicamento, en el que el medicamento es para aliviar el dolor.

16. Cannabinoide ácido representado por la fórmula Ia o Ib

20

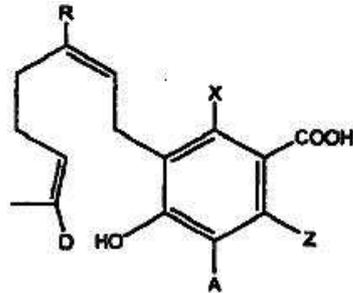


25

30

Fórmula Ia

35



40

45

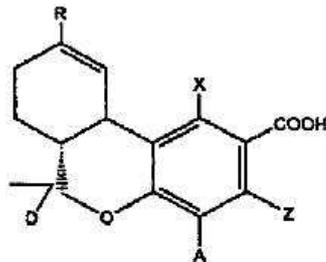
Fórmula Ib

en la que X, Z, D, R y A son tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5, 6, 7, un extracto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o un preparado, según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, para utilizar como medicamento, en el que el medicamento es para la supresión de una respuesta inflamatoria.

50

17. Cannabinoide ácido representado por la fórmula Ia o Ib

55

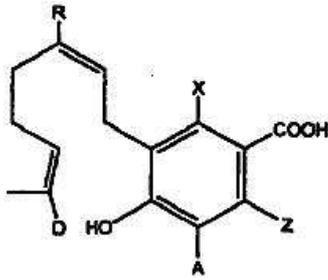


60

Fórmula Ia

5

10



Fórmula Ib

15

en la que X, Z, D, R y A son tal como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5, 6, 7, un extracto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o un preparado, según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, para utilizar como medicamento, en el que el medicamento es para el tratamiento de una indicación médica seleccionada del grupo que comprende infecciones, inflamaciones y enfermedades autoinmunes.

20

18. Cannabinoide ácido para utilizar, según la reivindicación 17, en el que la indicación médica se selecciona del grupo que comprende esclerosis múltiple, artritis, SIDA, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias de la piel y encefalomiелitis.

25

19. Cannabinoide ácido para utilizar, según la reivindicación 17, en el que la indicación médica es una enfermedad inflamatoria de la piel seleccionada del grupo de dermatitis y psoriasis.

Figura 1

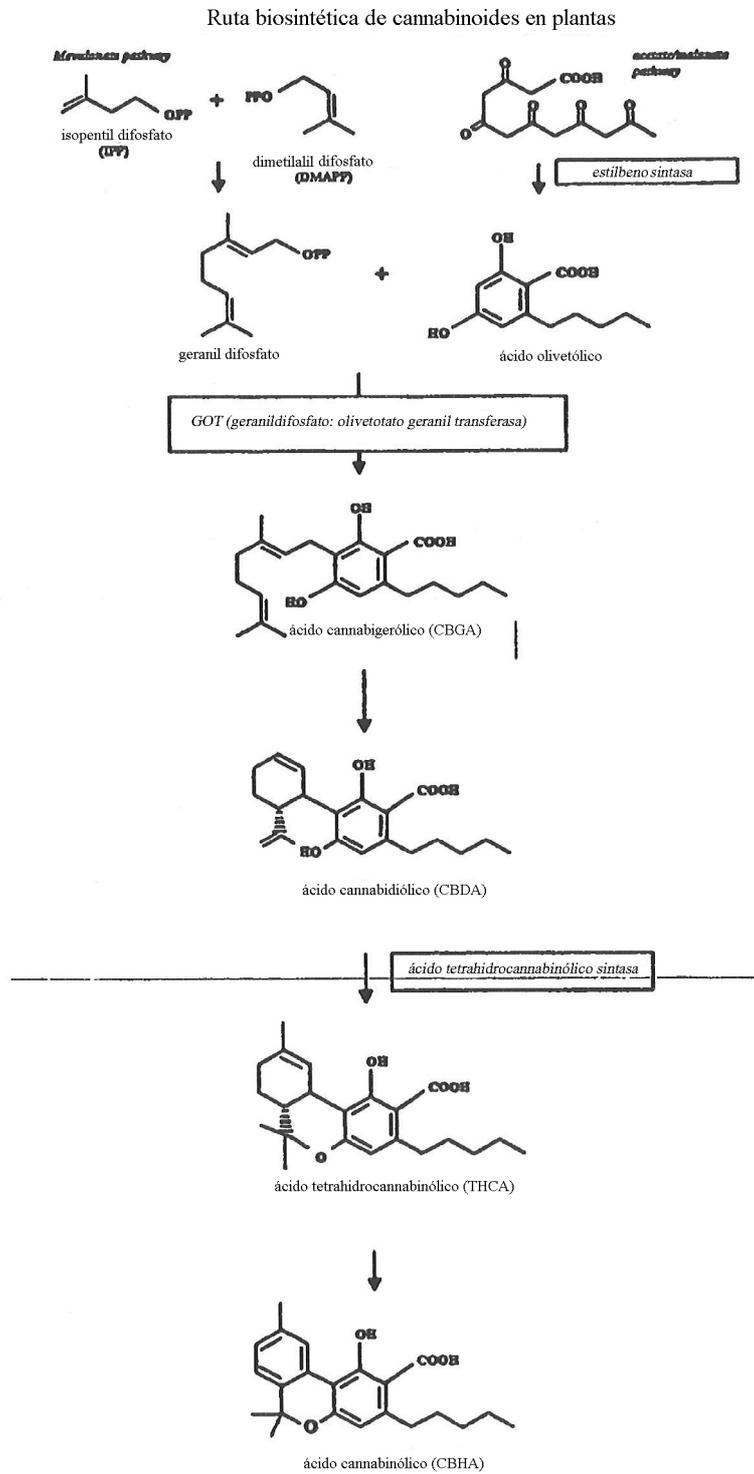


Figura 2A

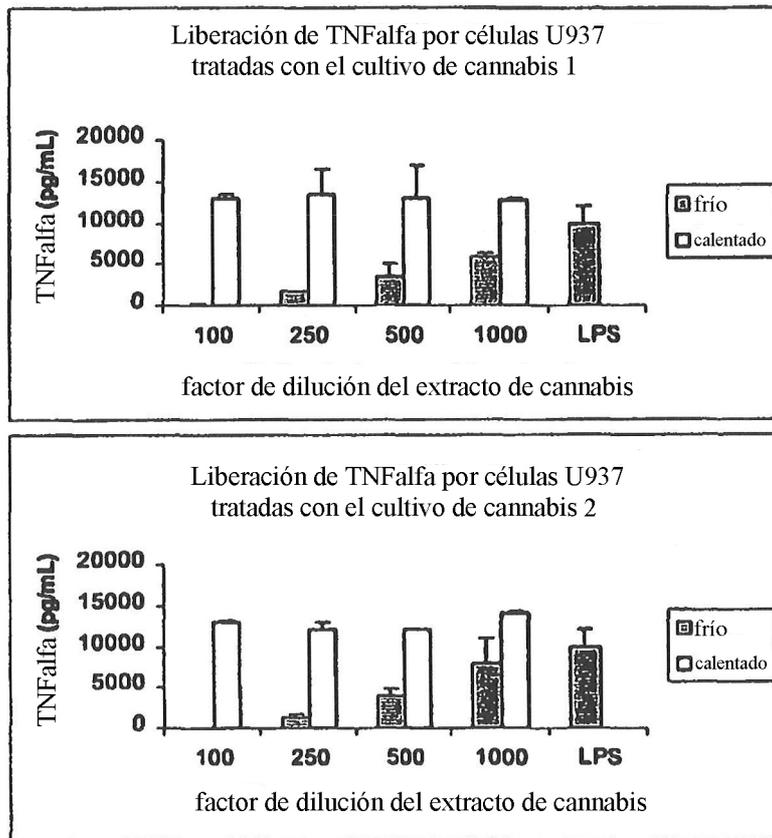


Figura 2B

Figura 3A

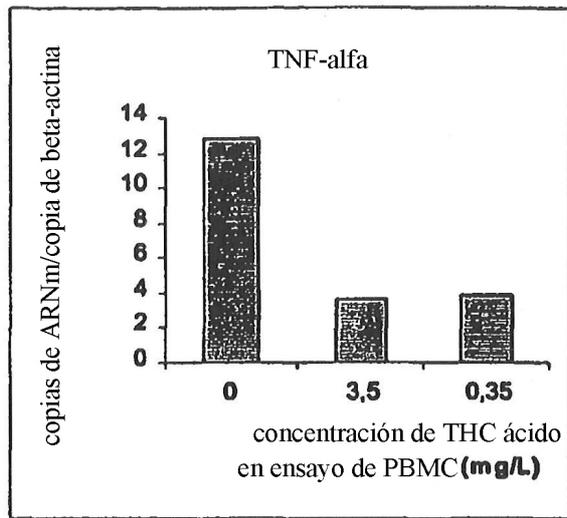


Figura 3B

