

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 190**

51 Int. Cl.:

C07D 311/20 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2004** **E 04743065 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014** **EP 1644349**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de tipo cannabícromeno**

30 Prioridad:

24.06.2003 US 482110 P

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

25.06.2014

73 Titular/es:

**GW PHARMA LIMITED (100.0%)
PORTON DOWN SCIENCE PARK
SALISBURY, WILTSHIRE SP4 OJR, GB**

72 Inventor/es:

**MUSTY, RICHARD, E. y
DEYO, RICHARD**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 471 190 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).

DESCRIPCION

Composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de tipo cannabicromeno.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de compuestos de tipo cannabicromeno y derivados de ellos en el tratamiento de trastornos del estado de ánimo.

10 Antecedentes de la invención

Los trastornos del estado de ánimo generalmente se clasifican por el tipo e incluyen, pero sin limitarse a:

15 Una depresión mórbida o clínica, que se diagnostica usualmente cuando la tristeza o la euforia es demasiado intensa y continúa más allá del impacto que se espera de un evento estresante. Los síntomas se repiten frecuentemente sobre una base episódica o siguen una cronicidad intermitente de bajo grado, lo que perjudica el funcionamiento del que los sufre.

20 El trastorno del estado de ánimo bipolar, que comúnmente comienza con depresión y se caracteriza por períodos de euforia durante el curso de la enfermedad.

El trastorno del estado de ánimo unipolar, que se caracteriza como depresión sindrómica de episodios que duran típicamente de 6 a 9 meses.

25 Los productos farmacéuticos usados en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo unipolares y bipolares pueden agruparse en tres clases; los antidepresivos heterocíclicos (HCA), los inhibidores de la monoamino oxidasa (MAOI) y las sales de litio.

30 Los HCA son la clase más grande de antidepresivos e incluyen antidepresivos tricíclicos tales como la imipramina. Los HCA no tienen efecto inmediato sobre la euforia y por lo tanto tienen un bajo potencial de abuso. Este grupo de antidepresivos actúan mediante el aumento de la disponibilidad de las aminas biogénicas noradrenalina y/o serotonina (5-HT) mediante el bloqueo de la recaptación en la hendidura sináptica. Los efectos secundarios de los HCA incluyen taquicardia, hipotensión postural y cardiotoxicidad. Los HCA además se asocian comúnmente con visión borrosa, xerostomía, estreñimiento, dificultad urinaria, sedación y aumento de peso. Los efectos secundarios hipotensores de los HCA frecuentemente los hacen inadecuados para pacientes con trastornos mentales y los ancianos.

35 Los MAOI tales como la fenelzina se prescriben frecuentemente para el trastorno de pánico. Ellos actúan mediante inhibición de la desaminación oxidativa de las 3 clases de aminas biogénicas; noradrenérgicas, dopaminérgicas y 5-HT. Los MAOI se subutilizan por los temores de los clínicos de hipotensión paradójica que puede resultar de las interacciones de la dieta o el fármaco, conocida popularmente como la "reacción de queso" debido al alto contenido de tiramina en el queso curado. Otros efectos secundarios comunes son hipotensión postural, dificultades eréctiles, ansiedad, náusea, mareos, insomnio, edema, aumento de peso y menos comúnmente hepatotoxicidad.

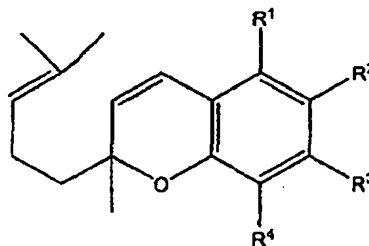
40 El litio se usa para estabilizar los cambios de ánimo frecuentemente impredecibles en el trastorno del estado de ánimo bipolar. El mecanismo preciso para sus acciones se desconoce, pero podría deberse a la hiperpolarización de la membrana neuronal. Los efectos secundarios benignos agudos más comunes del litio son temblor, fasciculación, náusea, diarrea, poliuria, polidipsia y aumento de peso. La toxicidad del litio es más probable en pacientes ancianos.

50 Resumen de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado que el cannabicromeno (CBC) y los compuestos de tipo cannabicromeno (que incluyen el análogo propilo de cannabicromeno (CBC-V)) y derivados de ellos, parecen ser una nueva clase de compuestos que pueden ser útiles en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo, particularmente la depresión.

55 Los compuestos de tipo cannabicromeno tienen la Fórmula general 1.

Fórmula 1:

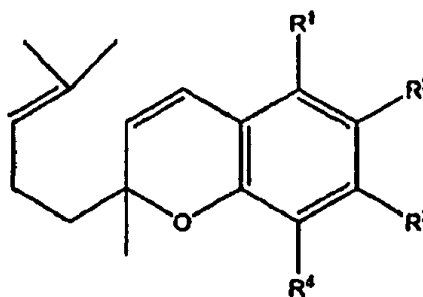


donde;

- 5 R¹ es OOH;
 R² es H o COOH;
 R³ es un grupo C1 a C8 alquilo, y
 R⁴ es H

10 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de la Fórmula general 1.

Fórmula 1:



donde;

- 15 R¹ es OH;
 R² es H o COOH;
 R³ es un grupo C1 a C8 alquilo, y
 R⁴ es H

20 o una sal farmacéuticamente aceptable de este cuando R² es COOH, para el uso en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo.

25 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que incluyen bases o ácidos inorgánicos y bases o ácidos orgánicos, como será bien conocido por las personas con experiencia en la técnica.

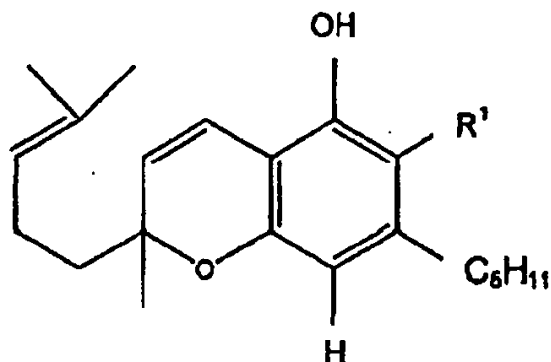
R³ es preferentemente un grupo alquilo C1-C5, con mayor preferencia el grupo alquilo C3-C5, y el grupo alquilo es preferentemente de cadena lineal, con grupos n-pentilo y n-propilo como los más preferidos.

30 R² puede ser H o COOH. Como se discute más abajo, las formas farmacológicamente activas de los cannabinocromenos son los cannabinoides neutros, pero la invención además abarca formulaciones que incluyen los ácidos cannabinoides correspondientes. La decisión de usar o no la forma de cannabinoides ácida o neutra puede depender de la naturaleza de la formulación y su vía de administración prevista. Por ejemplo, las composiciones que se preveen administrar en la forma de un vapor inhalado pueden contener la forma de ácido canabinoide, ya que la composición puede calentarse durante la vaporización, facilitando así la descarboxilación de los ácidos cannabinoides libres a la forma neutra del canabinoide correspondiente.

40 El "cannabinocromeno o los compuestos de tipo cannabinocromeno" de Fórmula 1 que se incluyen en la invención pueden ser compuestos de origen natural o compuestos sintéticos. Los cannabinocromenos "de origen natural" incluyen cannabinocromenos que pueden conseguirse a partir de material de la planta de cannabis.

Los cannabinocromenos naturales incluyen cannabinocromeno (CBC) (Fórmula 2) y análogo propilo de cannabinocromeno (CBC-V) (Fórmula 3)

Fórmula 2:



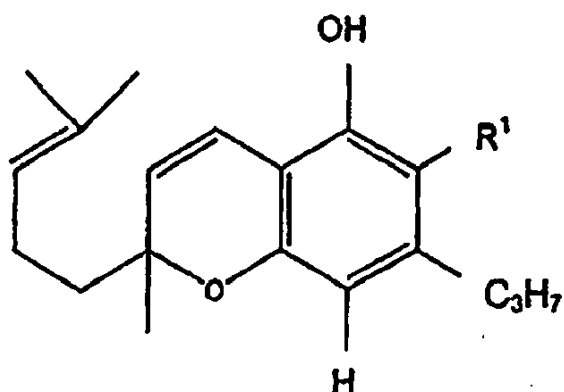
donde R¹ es H o COOH

5 C₅H₁₁ es un grupo n-pentilo.

El cannabichromeno está presente naturalmente (por ejemplo en plantas de cannabis) en su forma ácida (ácido cannabichroménico) pero puede descarboxilarse para formar el canabinoide neutro, cannabichromeno.

10

Fórmula 3:



donde R¹ es H o COOH

15 C₃H₇ es un grupo n-propilo.

El análogo propilo de cannabichromeno, como cannabichromeno, está presente naturalmente en forma de ácido pero puede descarboxilarse a la forma neutra.

20 Preferentemente el(los) compuesto(s) de Fórmula 1 está(n) presente(s) en la composición de la invención como un extracto de al menos una planta de cannabis.

25 El término "planta(s) de cannabis" abarca la *Cannabis sativa* silvestre y además variantes de ellas, que incluyen quimiovariantes de cannabis (variedades que se caracterizan en virtud de la composición química) que contienen naturalmente cantidades diferentes de los canabinoides individuales, además *Cannabis sativa* subespecie *indica* que incluye las variantes *var. indica* y *var. kafiristanica*, *Cannabis indica* y además las plantas que resultan de los cruzamientos genéticos, auto cruzamientos o híbridos de ellos. El término "material de planta de cannabis" debe interpretarse en consecuencia como que abarca el material de planta derivado de una o más plantas de cannabis. Para evitar dudas de este modo se afirma que "el material de planta de cannabis" incluye la hierba de cannabis y la biomasa de cannabis seca.

30 Los procesos para la preparación de extractos de planta de cannabis adecuados para su incorporación en formas de dosificación farmacéutica se describen en la patente WO 02/064109, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia.

35 En una modalidad este extracto puede comprender prácticamente todos los canabinoides de origen natural en dicha(s) planta(s). En modalidades adicionales el extracto puede enriquecerse en cannabichromeno, es decir contiene

una mayor proporción del contenido total de canabinoide como CBC, en comparación con la composición de canabinoide del material de la planta a partir del que se preparó el "extracto". Este enriquecimiento puede conseguirse mediante la selección de una fracción de un extracto de planta inicial, cuya fracción se enriquece.

5 El "extracto de planta de cannabis" que se incluye en la composición de la invención contendrá preferentemente al menos 5%, preferentemente al menos 10%, con mayor preferencia al menos 20%, con mayor preferencia 30%, y aún con mayor preferencia al menos 40% del contenido de canabinoide total como CBC.

10 Los ejemplos adecuados de tales extractos enriquecidos en CBC se describen en GB0222077.0. Estos son productos derivados a partir del material de planta de cannabis, enriquecidos en cannabicromeno (CBC), con una pureza cromatográfica para CBC mayor que 85% mediante la normalización del área de un perfil de HPLC. Los métodos para el análisis de extractos que contienen canabinoide por HPLC y TLC se describen además en GB0222077.0.

15 Los extractos enriquecidos en CBC pueden prepararse a partir de material de planta de cannabis con el uso del proceso descrito más abajo:

- i) descarboxilar el material de planta de cannabis,
- 20 ii) preparar un extracto del material de planta de cannabis descarboxilado con hexano,
- iii) filtrar el extracto resultante y eliminar el disolvente del filtrado por evaporación rotatoria para formar un extracto enriquecido en CBC,
- iv) pasar una solución del extracto enriquecido en CBC resultante a través de una columna empaquetada con Sephadex LH20™, eluir con cloroformo/diclorometano 2:1,
- 25 v) recoger las fracciones ricas en CBC que eluyeron de la columna y eliminar el disolvente por evaporación rotatoria,
- vi) redissolver el CBC crudo obtenido en la etapa v) en metanol, eliminar el residuo insoluble por filtración y eliminar el disolvente del filtrado por evaporación rotatoria,
- vii) redissolver el producto de la etapa vi) en pentano, eliminar el residuo insoluble por filtración y eliminar el disolvente del filtrado por evaporación rotatoria para producir un extracto altamente enriquecido en CBC.

30 Los extractos de planta de cannabis para el uso en las composiciones de la invención pueden tener eliminados otros componentes no cannabinoides de la planta, tales como por ejemplo, terpenos.

35 En aun una modalidad adicional puede(n) aislarse el(los) compuesto(s) de la Fórmula 1 y compuestos prácticamente puros, tales como CBC o CBCV (como ácidos o en sus formas neutras). Los cannabicromenos aislados y prácticamente puros serán prácticamente libres de otros cannabinoides y otros componentes de la planta tales como, por ejemplo, terpenos. Los "cannabicromenos aislados y prácticamente puros" pueden ser de producción natural, es decir aislados y purificados a partir del material de planta de cannabis, o pueden ser compuestos sintéticos.

40 Las preparaciones "prácticamente puras" de cannabinoides o ácidos cannabinoides se definen como preparaciones que tienen una pureza cromatográfica (del canabinoide deseado o del ácido canabinoide) mayor que 95%, con mayor preferencia mayor que 96%, con mayor preferencia mayor que 97%, con mayor preferencia mayor que 98%, con mayor preferencia mayor que 99% y con la máxima preferencia mayor que 99.5%, como se determina por la normalización del área de un perfil de HPLC.

45 Los compuestos de la invención pueden formularse para la administración nasal, sublingual, bucal, en forma tópica, oral, rectal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intravaginal, intrauretral, por nebulizador, como un vapor inhalado o por instilación directamente en la vejiga. Pueden estar en forma de dosificación líquida o sólida y pueden incluir, adicionalmente a los componentes activos, otros farmacéuticamente aceptables tales como excipientes, disolventes, diluentes, rellenos, sales, amortiguadores, estabilizantes, solubilizantes, etc. La forma de dosificación puede contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables para modificar las condiciones tales como pH, osmolaridad, sabor, viscosidad, esterilidad, lipofilicidad, solubilidad etc. La elección de los diluentes, portadores o excipientes dependerá de la forma de dosificación deseada, que puede a su vez depender de la vía de administración prevista a un paciente.

55 Las formas de dosificación sólidas incluyen, por ejemplo, tabletas, cápsulas, polvos, gránulos dispersables, sellos y supositorios, que incluyen formulaciones de liberación sostenida y de liberación retardada. Los polvos y tabletas comprenderán generalmente desde aproximadamente 5% a aproximadamente 70% de ingrediente activo. Los portadores y excipientes sólidos adecuados se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo carbonato magnésico, estearato magnésico, talco, azúcar, lactosa, etc. Las tabletas, polvos, sellos y cápsulas son todas las formas de dosificación adecuadas para la administración oral.

60 Las formas de dosificación líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Las preparaciones en forma líquida pueden administrarse por vía intravenosa, intracerebral, intraperitoneal, parenteral o inyección intramuscular o infusión. Las formulaciones inyectables estériles pueden comprender una solución o suspensión estéril del agente activo en un diluyente o disolvente farmacéuticamente aceptable, no tóxico. Las formas de dosificación líquidas

incluyen además soluciones o atomizadores para administración intranasal, bucal o sublingual.

Las preparaciones de aerosol adecuadas para la inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como un gas comprimido inerte.

5 Además se abarcan formas de dosificación para la administración transdérmica, que incluyen cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones. Estas formas de dosificación pueden incluirse en parches transdérmicos del tipo matriz o reservorio, que generalmente se conocen en la técnica.

10 Las preparaciones farmacéuticas pueden prepararse convenientemente en forma de dosificación unitaria, de acuerdo con procedimientos estándares de formulación farmacéutica. La cantidad de compuesto activo por dosis unitaria puede variar de acuerdo con la naturaleza del compuesto activo y el régimen de dosificación previsto. Generalmente, este estará dentro del intervalo de 0.1 mg a 1000 mg.

15 Preferentemente el compuesto de la invención puede usarse en el tratamiento de condiciones de trastornos del estado de ánimo tales como depresión mórbida o clínica, trastorno del estado de ánimo unipolar, trastorno del estado de ánimo bipolar, depresión sindrómica, trastorno de pánico o ansiedad.

20 Los términos "tratar" o "tratamiento" como se usa en la presente con referencia a los usos terapéuticos de los compuestos de Fórmula general 1 describen el manejo o el cuidado de un paciente para los propósitos de combatir la enfermedad, e incluye la administración del agente activo a individuos asintomáticos, por ejemplo para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones, es decir la profilaxis.

25 Los agentes activos se administran a sujetos humanos en "cantidades terapéuticamente eficaces", las que se consideran que significan una dosificación suficiente para proporcionar un resultado médicamente deseable en el paciente. La dosis y frecuencia exactas de administración de una "cantidad terapéuticamente eficaz" de agente activo variarán, dependiendo de la condición que se desea tratar, la etapa y gravedad de la enfermedad, y factores tales como la naturaleza de la sustancia activa, la forma de dosificación y la vía de administración. Un intervalo de dosificación típico para los compuestos de Fórmula general 1 está en el intervalo de 10-80 mg de compuesto por kg de peso de mamífero, mostrándose que 20 mg/kg en ratones es una dosis particularmente eficaz. Sin embargo, no se prevee limitar la invención a las dosis en este intervalo. El régimen de dosificación adecuado para un paciente dado generalmente se determinará por un médico teniendo en cuenta factores tales como la gravedad de la enfermedad, y la edad, peso y condición física general del paciente, y la duración prevista del tratamiento, como se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica.

35 El cannabícromeno (CBC) es uno de más de 60 cannabinoides que se conoce que se producen en cannabis (Turner y otros, 1980). El CBC es el cuarto cannabinoide principal en cannabis y se encuentra que se produce predominantemente en las cepas tropicales de *Cannabis* sp. En las variedades de cáñamo, el CBC y el cannabidiol (CBD) son los cannabinoides más predominantes que se acumulan.

40 La ruta biosintética de CBC comienza con la condensación de fosfato de geranilo con un precursor de ácido olivetólico, que posiblemente es un policétido C₁₂ derivado de acetato o malonato (Turner y Mahlberg, 1985). Esto produce un intermediario a partir del que se forma el ácido cannabícroménico (CBCA).

45 La Figura 1 muestra la ruta biosintética para CBCA.

50 La formación de ácido cannabidiólico (CBDA) se produce a través de una vía diferente de la ruta, de manera que el pirofosfato de geranilo se condensa con ácido olivetólico para producir ácido cannabigerólico (CBGA). Se cree que el CBGA forma después una molécula de estado de transición, que puede después formar ya sea CBCA o CBDA. El CBDA es el precursor de los ácidos tetrahidrocannabinólicos (THC), pero en sí es sólo ligeramente psicoactivo. El CBC además es sólo ligeramente psicoactivo y puede interactuar sinérgicamente con THC para alterar los efectos psicoactivos (Turner y otros, 1975). Se cree que el CDB puede suprimir el efecto del THC y que el CBC puede potenciar el efecto del THC. La psicoactividad total de cannabis se atribuye a las proporciones de los cannabinoides primarios THC, CBD, CBN y CBC.

55 Hay varias acciones conocidas del CBC como se discute más abajo en comparación con aquellas acciones conocidas para otros cannabinoides;

60 Al igual que el CBD, el CBC disminuye la inflamación (Wirth y otros, 1980). El CBC se probó in vivo con el uso de la prueba del edema de pata de rata e *in vitro* con el uso del ensayo de estabilización de la membrana de los eritrocitos. Se mostró que el CBC fue tan eficaz como la fenilbutazona (PBZ) a dosis equivalentes. Los autores conjeturaron que como el CBC es menos tóxico que la PBZ y que dosis más grandes podrían producir un efecto terapéutico mayor.

65 El CBC mostró que inhibe la síntesis de prostaglandinas in vitro pero con menos potencia que el THC o el CDB (Burststein y otros, 1973). El orden de actividad que inicia con el más potente fue cannabinol, ácido cannabidiólico,

- 5 delta-6-tetrahidrocannabinol (Δ^6 -THC), cannabidiol, cannabicromeno y Δ^1 -THC. El cannabicitrol casi no mostró actividad inhibitoria. Los autores sugieren que algunas de las acciones farmacológicas de estos cannabinoides inhibidores de prostaglandina pueden explicarse por un efecto similar in vivo. El olivetol, que representa una estructura parcial para todos los compuestos probados, mostró una alta actividad, lo que sugiere que el poder inhibitorio de los cannabinoides reside en la porción aromática de la molécula.
- 10 Una revisión de los constituyentes naturales de cannabis informó que el CBC provoca sedación en perros y disminuye la coordinación muscular en ratas pero no muestra que provoca cualquier actividad cannabimimética en monos o seres humanos (Turner y otros, 1980).
- 15 La coadministración de CBC con THC en ratas potencia los cambios de THC en la frecuencia cardíaca pero no potencia los efectos hipotensores de THC, en ratones la coadministración de THC y CBC disminuye el LD_{50} de THC (Hatoum y otros, 1981). El LD_{50} en ratones luego de una dosis única intraperitoneal (i.p.) de cannabicromeno (CBC) y Δ^9 -THC fue 113.4 y 276.3 mg/kg, respectivamente. Una dosis pequeña (25 mg/kg) de CBC dada conjuntamente con Δ^9 -THC disminuye el LD_{50} de Δ^9 -THC a 152.0 mg/kg.
- A diferencia de los derivados psicoactivos de cannabis tales como el THC, el CBC no está previsto según la Ley del Mal Uso de Fármacos de 1971.
- 20 Hay muchos informes sobre los efectos secundarios psicológicos negativos del cannabis y como resultado se presta poca atención al potencial terapéutico en el tratamiento de los trastornos psicológicos.
- 25 Algunos pacientes encontraron al cannabis útil en el tratamiento de ansiedad, depresión y trastorno bipolar (Zimmerman, 1998). Sin embargo los informes del potencial terapéutico del cannabis son frecuentemente contradictorios ya que describen los efectos de todo el cannabis, usualmente fumado, en lugar de las acciones de los propios cannabinoides específicos.
- 30 En un estudio de caso publicado en 1996 las observaciones proporcionaron algunas pruebas de que todo el cannabis fumado es el responsable de los efectos antidepresivos en individuos con trastorno del estado de ánimo (Gruber y otros, 1996). El artículo presenta cinco estudios de caso en los que el cannabis ejerce un efecto antidepresivo, los cinco pacientes informaron que el cannabis alivió sus síntomas y que lo usaron para ese propósito.
- 35 La presente invención se describe más aún, solamente en forma de ejemplo, con referencia al ejemplo siguiente y las figuras 2-10 en las que:
- 40 La Figura 2 es una tabla de medias para toda la actividad registrada en la prueba de suspensión de cola para CBC a los 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal e imipramina a 30 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal.
- 45 La Figura 3 es una gráfica de barras de interacción para toda la actividad para CBC a 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal y la imipramina a 30 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal.
- La Figura 4 es una tabla PLSD de Fishers para toda la actividad para CBC a 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal e imipramina a 30 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal.
- 50 La Figura 5 es una tabla de medias para el porcentaje de animales que muestran movimientos vigorosos muy grandes para CBC a 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal e imipramina a 30 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal.
- 55 La Figura 6 es una gráfica de barras de interacción para el porcentaje de animales que presentan movimientos vigorosos muy grandes de CBC a 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal y la imipramina en 30 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal.
- 60 La Figura 7 es una tabla PLSD de Fishers para el porcentaje de animales que muestran movimientos vigorosos muy grandes para CBC a 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal y la imipramina a 30 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal.
- La Figura 8 muestra los perfiles de TLC de un extracto enriquecido en CBC y la materia prima (extracto de un quimiovar descarboxilado de cannabis G80) en comparación con el CDB y los estándares de Δ^9 THC.
- 65 La Figura 9 muestra los perfiles de HPLC del extracto enriquecido en CBC y la materia prima (extracto de un quimiovar descarboxilado de cannabis G80).
- La Figura 10 muestra los perfiles de GC del extracto enriquecido en CBC y la materia prima (extracto de un quimiovar descarboxilado de cannabis G80).

Ejemplo

5 Un extracto prácticamente puro de cannabicromeno (Fórmula 2) se estudió por su capacidad para modificar el comportamiento de los ratones durante una prueba de suspensión de cola en comparación con aquellos cambios provocados por la imipramina un antidepresivo conocido.

Materiales y métodos:

10 El experimento usó 112 ratones C57BL6BYJ (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) que se alojaron en grupos del mismo sexo (n=3-5) y se mantuvieron en un ciclo revertido de luz-oscuridad de 12h, con todas las pruebas completadas durante las primeras 4h del ciclo de fase oscura. Los alimentos y el agua se proporcionaron *libremente* excepto durante las pruebas de comportamiento. Los sujetos tenían seis semanas de edad en el momento de la prueba y consistían de grupos con igual número de machos (18-26 g) y hembras (15-21 g).

15 El CBC prácticamente puro (la Figura 8 muestra cromatogramas que ilustran la pureza de este material) se aisló a partir de un extracto botánico de un quimiovar de cannabis con alto contenido de CBC que se obtuvo con el uso de técnicas de cría selectivas convencionales. Con el uso de estas técnicas de cría selectivas tradicionales el solicitante fue capaz de seleccionar las variedades de cannabis (quimiovars) que tienen un contenido relativamente alto de CBC. Los protocolos generales para el cultivo de cannabis medicinal y para probar el contenido de cannabinoides de las plantas de cannabis se describen en la solicitud de patente internacional publicada del solicitante WO 02/064109. La materia prima botánica (BRM) se sometió a extracción de CO₂ supercrítico y ultrafiltrado en frío para eliminar ceras, como se describe en la solicitud de patente del solicitante GB02181901.7. El extracto resultante se purificó más aun mediante una serie de etapas cromatográficas como se describe más abajo y en la solicitud de patente del solicitante número GB0222077.0. Esto implica:

- 25 i) disolver el extracto en hexano,
- ii) filtrar el extracto resultante y eliminar el disolvente del filtrado por evaporación rotatoria para formar un extracto enriquecido en CBC;
- 30 iii) pasar una solución del extracto enriquecido en CBC resultante a través de una columna empaquetada con Sephadex LH20[™], eluir con cloroformo/diclorometano 2:1;
- iv) recoger las fracciones ricas en CBC eluidas de la columna y eliminar el disolvente por evaporación rotatoria;
- 35 v) redissolver el CBC crudo obtenido en la etapa v) en metanol, eliminar el residuo insoluble por filtración y eliminar el disolvente del filtrado por evaporación rotatoria;
- vi) redissolver el producto de la etapa vi) en pentano, eliminar el residuo insoluble por filtración y eliminar el disolvente del filtrado por evaporación rotatoria para producir un extracto de CBC altamente enriquecido;
- 40 vii) someter el extracto altamente enriquecido en CBC a cromatografía rápida para producir un extracto de CBC prácticamente puro de >98% p/p.

Los cromatogramas de las TLC, HPLC y GC se muestran como Figuras 8-10.

45 El extracto de CBC prácticamente puro (54.0 mg/ml en etanol) se diluyó en Tween 80 y subsecuentemente se diluyó más aun a la dosis correcta con PBS (pH 7.4). La concentración final de Tween 80 fue 5% para todas las preparaciones.

50 La imipramina (30 mg/kg) se usó como un control antidepresivo y se diluyó como el extracto de CBC. El artículo de prueba a dosis de 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal se administró i.p. bajo luz de sodio para minimizar la exposición a la luz.

55 Para la prueba de suspensión de cola, se usó una cámara de sonido atenuado (Lafayette Instruments, Lafayette, IN) con una barra de titanio (1cm de diámetro X 24cm de largo) montada 15 cm desde el suelo de la cámara de prueba. Un sensor optoelectrónico se montó en una columna plástica blanca de 4 cm X 4 cm y se colocó a 5 cm desde la barra de montaje. Una luz infrarroja transmitió desde el diodo emisor de luz sobre el animal. Si el animal se mueve, la cantidad de luz recogida por el fototransistor puede aumentar o disminuir dependiendo del tamaño y la duración del movimiento. El sensor optoelectrónico se conectó a una interfase diseñada para acondicionar y amplificar la señal (intervalo 0-10 voltios) y después enviar la señal amplificada a una tarjeta de interfase A/D (Powerlab 4/s: AD Instruments, Mountain View, CA) conectada a un microordenador Macintosh G4. La duración del experimento y el registro de las respuestas de comportamiento en bruto se controlaron y guardaron en un archivo de datos con el uso del programa informático de recogida de datos Chart 3.6 (AD Instruments, Mountain View, CA).

60 El aparato de campo abierto consiste de una cámara de 44.5 x 44.5 x 30 cm con paredes plásticas claras y un suelo plástico blanco (Med Associates mode #ENV515, St. Albans, VT). Los comportamientos se registraron usando un registrador de vídeo Quasar suspendido encima de la cámara. La cámara se dividió en cuatro cuadrantes de igual tamaño durante la anotación colocando una plantilla plástica clara en la pantalla de vídeo durante la anotación. Los comportamientos se anotaron con el uso del programa informático de recogida de datos. Las señales de las

habitaciones se mantuvieron constantes en toda la prueba, la temperatura ambiente fue 22°C.

En el día de la prueba, los ratones se pesaron y se asignaron aleatoriamente a grupos con la restricción de que un número igual de machos y hembras estuvieran representados en cada grupo. El artículo de prueba o el fármaco control se inyectó por vía intraperitoneal. Treinta minutos más tarde cada ratón se probó en la prueba de suspensión de la cola por seis minutos.

El ratón se suspendió de una barra por la cola con cinta adhesiva de forma tal que la punta de su nariz estuvo a 2 cm del suelo de la cámara de suspensión de la cola. Después el fotodiodo se colocó a 5 cm de distancia del sujeto y se apuntó al centro de la superficie ventral del sujeto. Cada sujeto se probó durante seis minutos. Se registró el número total de movimientos y la cantidad total de tiempo que quedó inmóvil. Se anotó un movimiento si la cantidad de luz desviada resultó en un cambio de 350 mV o más a partir del valor inicial durante al menos 5 ms. Encontramos que los cambios de menos de 350 mV usualmente indicaron artefactos (por ejemplo respiración) y movimientos no voluntarios. Se contó un período de inmovilidad sólo si no se registraron movimientos por encima de 350 mV por al menos 1000ms. La cantidad total de tiempo que quedó inmóvil se calculó mediante la suma de la duración de los períodos de inmovilidad individuales. Estos criterios fueron seleccionados para ser similares a aquellos usados en los estudios anteriores de suspensión de cola (por ejemplo, Steru y otros, 1985).

Inmediatamente después de la prueba de suspensión de cola (36-38 minutos luego del tratamiento con el artículo de prueba o control), cada ratón se colocó individualmente en la cámara de campo abierto para una sesión de prueba de grabado en vídeo por cinco minutos. Las cintas de vídeo se anotaron posteriormente por observadores que ignoraban la asignación de grupos de los sujetos. La frecuencia de cruzamientos, alzamientos, acicalamiento y defecación se registraron para cada sujeto. Una respuesta de cruzamiento se anotó cuando un animal movió las cuatro patas en cualquier cuadrante en la cámara de ensayo. Una respuesta de alzamiento se anotó cuando un animal se irguió erecto en las dos patas traseras con las dos patas delanteras levantadas del suelo. El acicalamiento se anotó de acuerdo con los criterios usados en estudios anteriores con roedores (Walsh y Cummins, 1976).

Los ratones estereotípicamente comienzan por lamer las patas delanteras, después usan las patas delanteras para limpiar la cara y las orejas y después el tronco y los cuartos traseros. Una respuesta única de acicalamiento se anotó al comienzo de este patrón estereotipado. Se requirió que el animal entablara otro comportamiento (por ejemplo, alzamiento) entre rondas de acicalamiento para el comportamiento subsiguiente que se anotó como una respuesta separada. Este método es controlado para cualquier posible interferencia que pueda hacer que el animal haga una pausa antes de completar el patrón de acicalamiento y de esta manera minimizar la posibilidad de aumentar artificialmente la frecuencia de respuestas de acicalamiento.

Resultados:

Los efectos antidepresivos se indican por un aumento en la frecuencia de la actividad de lucha durante la prueba. Adicionalmente se piensa que el grado o la amplitud de lucha es un predictor de la actividad antidepresiva.

Los resultados mostrados en las Figuras 2 a 7 son solo de los ratones machos puesto que los datos obtenidos de los ratones hembra se confunden por el ciclo estral.

Las Figuras 2 y 3 detallan toda la actividad registrada en la prueba de suspensión de cola para CBC a 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal y la imipramina a 30 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal. Esta tabla muestra que en comparación con el control donde no se le dió todas las dosis de CBC ni imipramina se incrementó el nivel de actividad media de los ratones en la prueba. Las actividades más grandes se observaron en los ratones dosificados con 40 mg CBC/kg/0.01 ml/g de peso corporal. Los niveles de actividad comparables a aquellos observados en los ratones con imipramina administrada se observaron en los ratones que se dosificaron con 10 mg CBC/kg/0.01 ml/g de peso corporal. A partir de estas figuras se puede inferir que el CBC a una dosis 40 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal es un antidepresivo más potente que la imipramina.

La Figura 4 es una tabla que detalla la PLSD de Fisher para toda la actividad observada durante la prueba de suspensión de cola de ratón. El valor significativo observado a partir del análisis estadístico es el del CBC a 40 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal contra el control a 0 mg CBC/kg/0.01 ml/g de peso corporal. Como se sugiere por los datos anteriores, el CBC a una dosis de 40 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal es un antidepresivo más potente que la imipramina.

Las Figuras 5 y 6 detallan el porcentaje de animales que muestran movimientos vigorosos muy grandes o "lucha" para CBC a los 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal y la imipramina en 30 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal. Estos datos muestran que el CBC administrado a una dosis ya sea de 20 o 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal produjo un mayor número de movimientos vigorosos grandes en los animales que la imipramina a una dosis de 30 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal. Las dosis de 10 y 40 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal produjeron un número comparable de movimientos vigorosos grandes en los ratones que fueron registrados para imipramina. Estos datos sugieren que la administración de CBC resulta en un aumento del porcentaje de comportamiento de lucha, que es un indicador de la actividad antidepresiva.

La Figura 7 es una tabla que detalla la PLSD de Fisher para el porcentaje de animales que muestran movimientos vigorosos muy grandes o "lucha", como se observó durante la prueba de suspensión de cola de ratón. El análisis estadístico identificó varios datos significativos. Lo más significativo fue el del CBC a 20 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal contra el control a 0 mg CBC/kg/0.01 ml/g de peso corporal. Otro dato estadísticamente significativo fue el del CBC a 20 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal contra el CBC a 5 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal y el CBC a 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal contra el CBC a 5 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal. Los datos analizados aquí indican que una dosis de CBC entre 10 y 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal produce acción antidepresiva en la prueba de suspensión de cola del ratón y que la dosis más eficiente es 20 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal.

Interpretación:

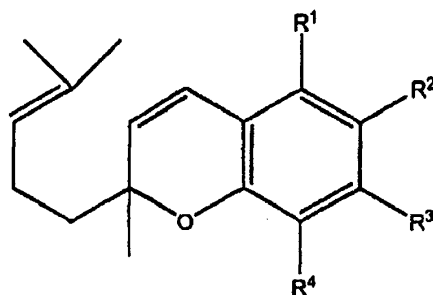
Los datos presentados sugieren que el CBC puede inducir efectos antidepresivos. A partir de los datos mostrados en las figuras puede verse que las dosis moderadas de CBC producen comportamientos que son consistentes con la imipramina en la prueba de suspensión de cola. Una dosis de 40 mg de CBC/kg/0.01 ml/g de peso corporal resultó en una media elevada de la actividad de 916.1 en comparación a la media de la actividad para la imipramina (30 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal) que es 733.5 y la media del control que es 462.5. Además se notó que aquellos ratones a los que se les administró CBC mostraron un aumento en la amplitud de comportamiento de lucha. Se encontraron aumentos significativos en el grado de lucha entre el control vehículo (media=13.3%), la dosis de CBC 20 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal (media=31.4%) y la dosis de CBC 80 mg/kg/0.01 ml/g de peso corporal (media=30.2%).

Referencias:

- Burstein S, Varanelli C y Slade L T (1973) Prostaglandins and Cannabis-II. Inhibition of biosynthesis by the naturally occurring cannabinoids. *Biochem Pharmacol.* 22, 290 5-2910
- Gruber A J, Pope H G, Brown M E (1996) Do patients use marijuana as an antidepressant? *Depression*, 4, 77-80
- Hatoum N S, Davis W M, ElSohly M A, Turner C E (1981) Cannabichromene and delta-9-tetrahydrocannabinol: interactions relative to lethality, hypothermia and hexobarbital hypnosis. *Gen. Pharmacol.* 12, 357-362
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 85(3), 367-360
- Turner J C and Mahlberg P G (1985) cannabinoid synthesis in *Cannabis sativa* L. *Am. J. Bot.*, 72(6), 911
- Turner C E, Fetterman P S, Hadley K W, Urbanek J E (1975) Constituents of *Cannabis sativa* L. X: cannabinoid profile of a Mexican variant and its possible correlation to pharmacological activity. *Acta Pharm. Jugoslav.*, 25, 7-16
- Turner C E, ElSohly M A y Boeren E G (1980) Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *J. Nat. Prod.*, 43(2), 169-234
- Walsh R N y Cummins R A (1976) Mechanisms mediating the production of environmentally induced brain changes. *Psychol. Bull.* 82(6), 986-1000
- Wirth P W, Watson E S, ElSohly M A, Turner C E, Murphy J C (1980) Anti-inflammatory properties of cannabichromene. *Life Sci.* 26, 1991-1995
- Zimmerman B, Bayer R, Crumpacker N (1998) Is Marijuana the right medicine for you? A factual guide to the medical uses of marijuana. Keats Publishing. Estados Unidos 166-167

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula general 1



Fórmula 1

5

en donde

- 10
 R^1 es OH;
 R^2 es H o COOH;
 R^3 es un grupo C₁-C₈ alquilo; y
 R^4 es H;

15

o una sal farmacéuticamente aceptable de este cuando R^2 es COOH; para el uso en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo.

20

2. Un compuesto para usar en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo como se reivindica en la reivindicación 1, donde R^3 es un grupo C₁-C₅ alquilo.
3. Un compuesto para usar en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde R^3 es un grupo C₃-C₅ alquilo.
4. Un compuesto para usar en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R^3 es un grupo alquilo de cadena recta.

25

5. Un compuesto para usar en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde R^3 es C₅H₁₁.

30

6. Un compuesto para usar en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo como se reivindica en la reivindicación 1, en donde R^3 es C₃H₇.

35

7. Un compuesto para usar en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno del estado de ánimo a tratar es depresión mórbida o clínica, trastorno del estado de ánimo unipolar, trastorno del estado de ánimo bipolar, depresión sindrómica, trastorno de pánico o ansiedad.

40

8. Un compuesto para usar en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto se formula para administración nasal, sublingual, bucal, en forma tópica, oral, rectal, intravenosa, intraperitoneal, Intramuscular, subcutánea, transdérmica, intravaginal, intrauretral, por nebulizador como un vapor inhalado, o por instilación directamente en la vejiga.

45

9. Un compuesto para usar en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el compuesto de la Fórmula 1 está presente en un extracto de una o más plantas de cannabis.

50

10. Un compuesto para usar en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo de conformidad con la reivindicación 9, en donde el extracto comprende además prácticamente todos los cannabinoides de origen natural en dicha(s) planta(s).

11. Un compuesto para usar en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo como se reivindica en la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el extracto se enriquece con cannabicromeno.

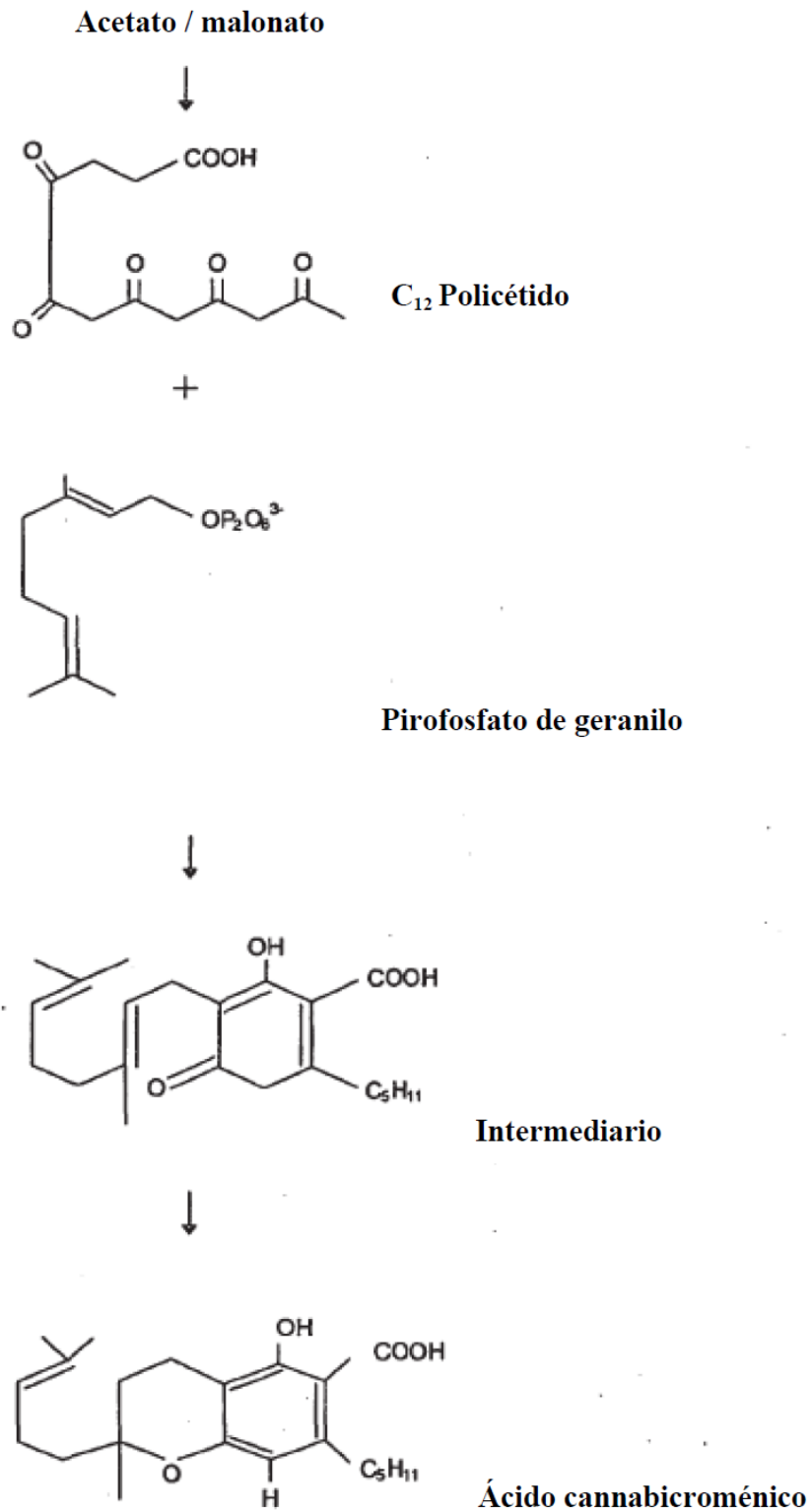


FIG. 1

Artículo de prueba	Conteo	Media	Desviación Estándar	Error Estándar
CBC 0mg (Control)	8	462.500	234.557	82.928
CBC 5mg	8	644.625	280.245	99.117
CBC 10mg	8	770.750	380.570	134.552
CBC 20mg	8	606.750	269.183	95.170
CBC 40mg	8	916.125	536.324	189.619
CBC 80mg	8	670.625	608.221	215.039
Imipramina 30mg	8	733.500	205.358	72.605

FIG. 2

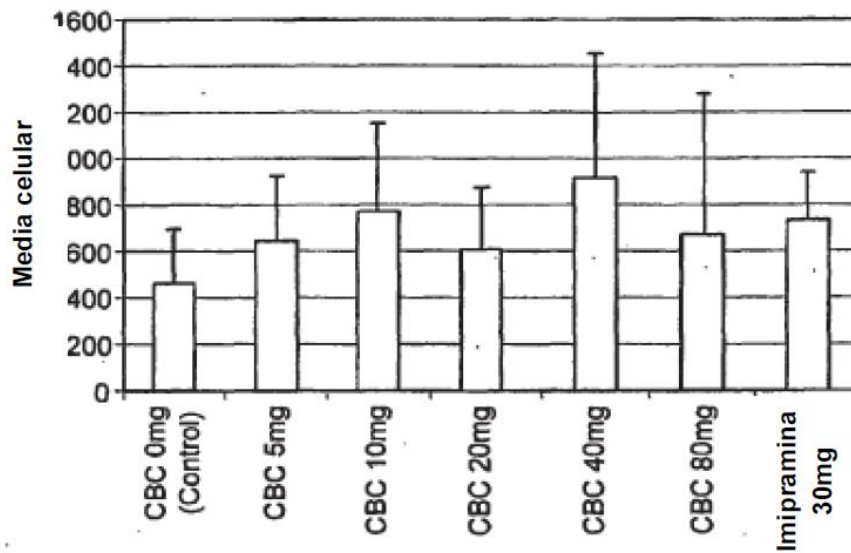


FIG. 3

	Diferencia de Medias	Diferencia Crítica	Valor P
CBC 0mg; CBC 5mg	- 182.125	389.273	0.3517
CBC 0mg; CBC 10mg	- 308.250	389.273	0.1180
CBC 0mg; CBC 20mg	- 144.250	389.273	0.4600
CBC 0mg; CBC 40mg	- 453.625	389.273	0.0233*
CBC 0mg; CBC 80mg	- 208.125	389.273	0.2879
CBC 0mg; Imipramina 30mg	- 271.000	389.273	0.1681
CBC 5mg; CBC 10mg	- 126.125	389.273	0.5180
CBC 5mg; CBC 20mg	37.875	389.273	0.8458
CBC 5mg; CBC 40mg	- 271.500	389.273	0.1673
CBC 5mg; CBC 80mg	- 26.000	389.273	0.8938
CBC 5mg; Imipramina 30mg	- 88.875	389.273	0.6484
CBC 10mg; CBC 20mg	164.000	389.273	0.4013
CBC 10mg; CBC 40mg	- 145.375	389.273	0.4566
CBC 10mg; CBC 80mg	100.125	389.273	0.6076
CBC 10mg; Imipramina 30mg	37.250	389.273	0.8483
CBC 20mg; CBC 40mg	- 309.375	389.273	0.1167
CBC 20mg; CBC 80mg	- 63.875	389.273	0.7430
CBC 20mg; Imipramina 30mg	- 126.750	389.273	0.5160
CBC 40mg; CBC 80mg	245.500	389.273	0.2110
CBC 40mg; Imipramina 30mg	182.625	389.273	0.3504
CBC 80mg; Imipramina 30mg	- 62.875	389.273	0.7469

* Estadísticamente significativo

FIG. 4

Artículo de prueba	Conteo	Media	Desviación Estándar	Error Estándar
CBC 0mg (Control)	8	13.334	5.755	2.035
CBC 5mg	8	18.364	9.193	3.250
CBC 10mg	8	23.962	11.374	4.021
CBC 20mg	8	31.350	6.951	2.458
CBC 40mg	8	23.853	12.195	4.312
CBC 80mg	8	30.250	16.628	5.879
Imipramina 30mg	8	23.874	12.557	4.440

FIG. 5

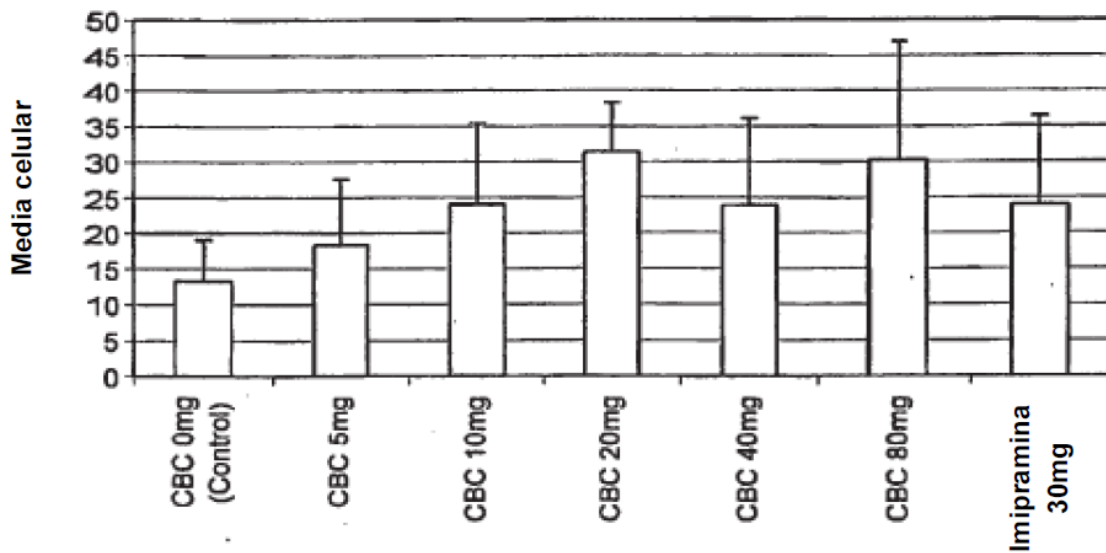
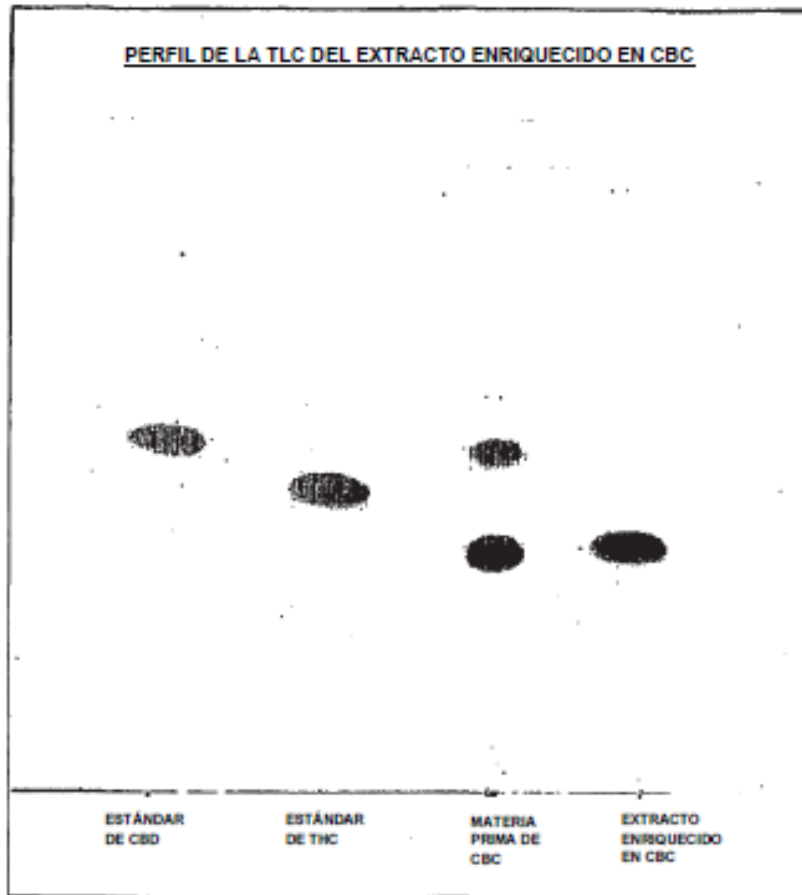


FIG. 6

	Diferencia de Medias	Diferencia Crítica	Valor P
CBC 0mg; CBC 5mg	-5.030	11.255	0.3735
CBC 0mg; CBC 10mg	-10.628	11.255	0.0636
CBC 0mg; CBC 20mg	-18.016	11.255	0.0023*
CBC 0mg; CBC 40mg	-10.519	11.255	0.0663
CBC 0mg; CBC 80mg	-16.917	11.255	0.0040*
CBC 0mg; Imipramina 30mg	-10.540	11.255	0.0658
CBC 5mg; CBC 10mg	-5.598	11.255	0.3224
CBC 5mg; CBC 20mg	-12.987	11.255	0.0246*
CBC 5mg; CBC 40mg	-5.489	11.255	0.3318
CBC 5mg; CBC 80mg	-11.887	11.255	0.0389*
CBC 5mg; Imipramina 30mg	-5.510	11.255	0.3300
CBC 10mg; CBC 20mg	-7.389	11.255	0.1932
CBC 10mg; CBC 40mg	0.109	11.255	0.9846
CBC 10mg; CBC 80mg	-6.289	11.255	0.2670
CBC 10mg; Imipramina 30mg	0.088	11.255	0.9875
CBC 20mg; CBC 40mg	7.497	11.255	0.1868
CBC 20mg; CBC 80mg	1.100	11.255	0.8451
CBC 20mg; Imipramina 30mg	7.476	11.255	0.1881
CBC 40mg; CBC 80mg	-6.397	11.255	0.2589
CBC 40mg; Imipramina 30mg	-0.021	11.255	0.9970
CBC 80mg; Imipramina 30mg	6.377	11.255	0.2604

* Estadísticamente significativo

FIG. 7



CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Fase estacionaria: SIL G/UV₂₅₄

Fase móvil: Hexano: éter dietílico 80:20

Distancia de avance: avance doble

Visualización: 0.1% p/v de sal Fast Blue B en agua

Estándares 1mg/ml de CBD (BN 10601/C) en MeOH

5 µl aplicados a placa de TLC

1 mg/ml d9 de THC (BN 10601/B) en MeOH

5 µl aplicados a placa de TLC

Muestras 1mg/ml de MATERIA PRIMA DE CBC en MeOH

5 µl aplicados a placa de TLC

1 mg/ml de EXTRACTO ENRIQUECIDO EN CBC en MeOH

5 µl aplicados a placa de TLC

FIG. 8

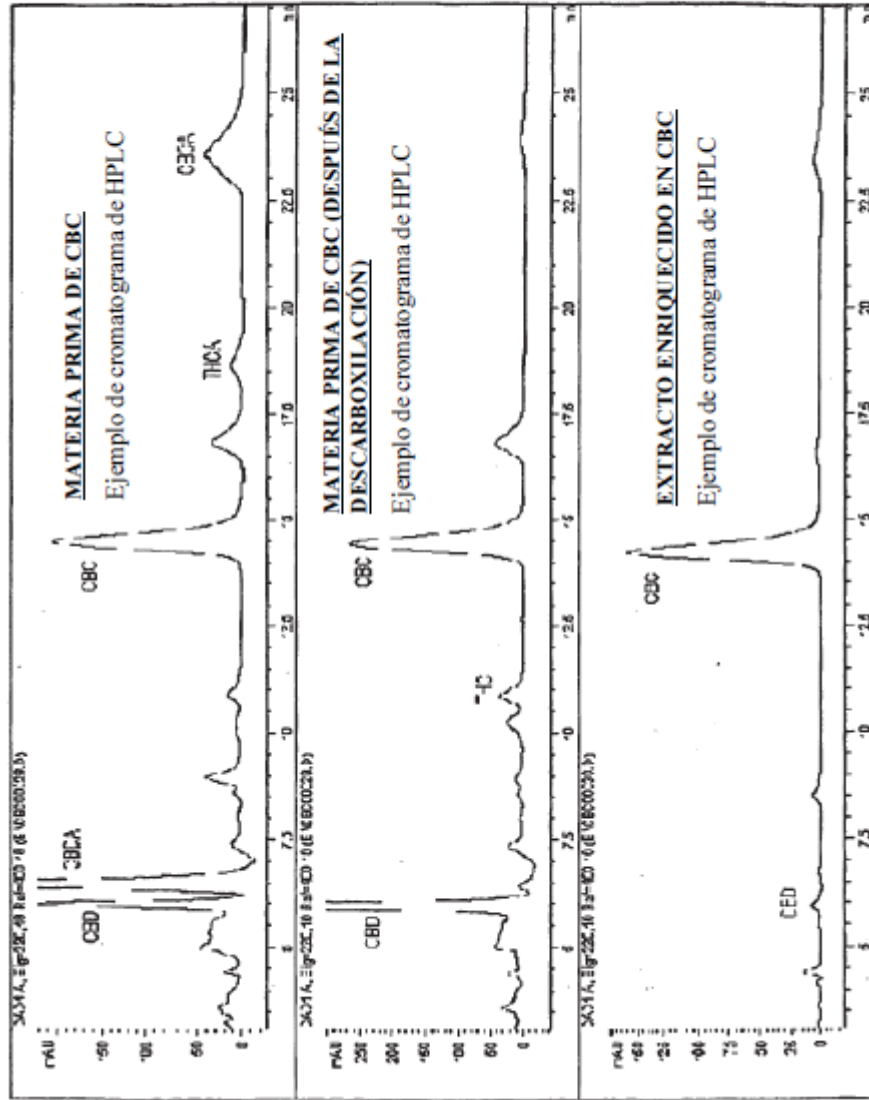


FIG. 9

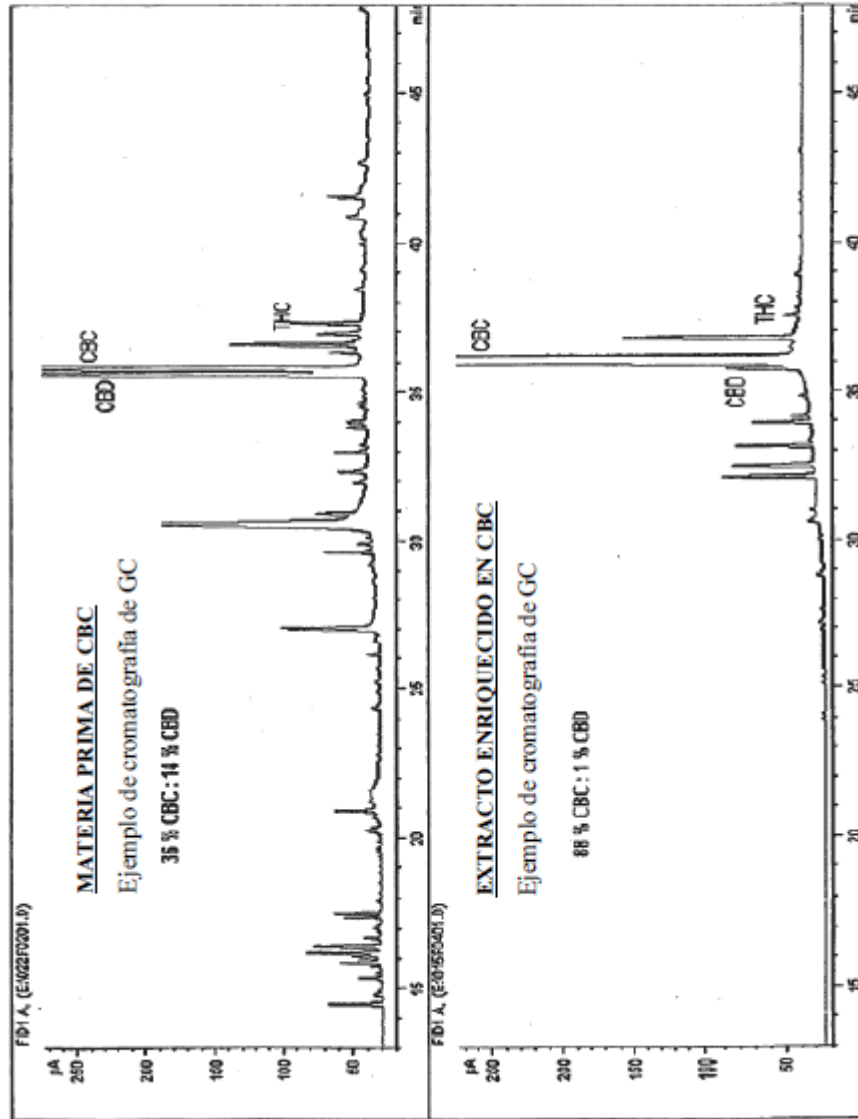


FIG. 10