

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 531**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

B01D 11/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2003 E 10180464 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2311475**

54 Título: **Extracción de cannabinoides farmacéuticamente activos de materiales vegetales**

30 Prioridad:

14.08.2002 GB 0218901

14.08.2002 US 218972

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

30.11.2016

73 Titular/es:

GW PHARMA LIMITED (100.0%)

Sovereign House, Histon

Cambridge CB24 9BZ, GB

72 Inventor/es:

WHITTLE, BRIAN ANTHONY;

HILL, COLIN A.;

FLOCKHART, IAN R.;

DOWNES, DAVID VICTOR;

GIBSON, PETER y

WHEATLEY, GARY WILLIAM

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 592 531 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

Extracción de cannabinoides farmacéuticamente activos de materiales vegetales

5 La presente invención se refiere a una sustancia botánica fármaco en forma de un extracto de CO₂ obtenido en condiciones subcríticas, que ha sido tratado para reducir la proporción de materiales no cannabinoides, obtenidos a partir de una planta de marihuana que contiene un alto contenido de THC, en la que dicho extracto tratado comprende al menos un 60% de constituyentes cannabinoides, y al menos un 40% de constituyentes no cannabinoides, y en la que los constituyentes cannabinoides comprenden al menos un 90% de THC, y los constituyentes no cannabinoides incluyen terpenos, hidrocarburos y ceras de triglicéridos y pigmentos de plantas en los que las ceras se han reducido por tratamiento.

10 En el documento WO 02/064109, el solicitante describe un método para preparar un extracto de hierbas fármaco (sustancia botánica fármaco) a partir de marihuana medicinal. El procedimiento comprende:

1. Una etapa de calentamiento para descarboxilar las formas ácidas de los cannabinoides a sus formas neutras;
2. Una primera extracción con un volumen especificado de dióxido de carbono líquido durante 6-8 horas; y
- 15 3. Una etapa para reducir la proporción de materiales no diana, denominada acondicionamiento, etapa en la que se separan las ceras por precipitación.

Más específicamente, el documento WO 02/064109 describe un procedimiento en el que:

La etapa 1 comprende calentar marihuana troceada (2-3 mm) a 100-150°C durante el tiempo suficiente para permitir la descarboxilación;

La etapa 2 comprende una extracción con CO₂ usando:

- 20 a) Un polvo grueso (las partículas se pasan a través de una malla de 3 mm);
- b) Una densidad de empaquetamiento de 0,3; y
- c) Condiciones supercríticas de 600 bar a 35°C durante 4 horas, aunque se reconoce que podrían usarse otras combinaciones de temperatura y presión de 10-35°C y 60-600 bar (condiciones tanto súper como subcríticas); y

25 La etapa 3 comprende llevar a cabo una precipitación en etanol a -20°C durante 24 horas y separar el material céreo por filtración.

El método supercrítico descrito en el documento WO 2064109 produjo:

- a) Un extracto rico en THC que contenía:
 - 60% de tetrahidrocannabinol (THC)
 - 1-2% de canabidiol (CBD)
 - 30 4-5% de otros cannabinoides menores que incluían CBN
- (Los rendimientos cuantitativos fueron 9% en peso basados en el peso seco de marihuana medicinal); y
- b) Un extracto rico en CBD que contenía:
 - 60% de CBD
 - 4% de THC
 - 35 2% de otros cannabinoides
- (Los rendimientos cuantitativos fueron 9% en peso basados en el peso seco de marihuana medicinal).

Claramente, como la BDS resultante es para usar en un producto farmacéutico, es esencial que el procedimiento sea seguro, escalable a GMP y que dé altos grados de consistencia del producto y, preferiblemente también buenos rendimientos.

40 Los principios de la extracción con fluidos supercríticos (SFE) se conocen desde el trabajo del Barón Cagniard de la Tour en 1822 cuando se advirtió que la frontera gas-líquido desaparecía cuando se aumentaba la temperatura de ciertos materiales calentándolos en un recipiente de vidrio cerrado. A partir de este trabajo inicial, en primer lugar se descubrió el punto crítico de una sustancia. El punto crítico es la temperatura por encima de la cual una sustancia puede coexistir en las fases de gas, líquido y sólido. Más tarde se encontró que llevando las sustancias a o por

encima de su temperatura y presión críticas, podrían usarse como disolventes sofisticados para la extracción y el fraccionamiento de mezclas complejas.

La técnica se usa ampliamente en el negocio del procesado del fuel-oil y se ha aplicado a, por ejemplo, la purificación y separación de aceites vegetales y de pescado.

- 5 Una característica atractiva de la SFE con respecto al uso de disolventes convencionales es que el poder disolvente (E°) puede variarse por manipulación de la temperatura y la presión por encima del punto crítico.

En un diagrama típico de presión-temperatura de una sustancia hay tres líneas que definen el equilibrio entre dos de las fases. Estas líneas se juntan en el punto triple. Las líneas definen la interfase entre los estados gas, líquido y sólido, y los puntos a lo largo de la línea definen el equilibrio entre pares de fases. Por ejemplo, la curva de presión de vapor (punto de ebullición) comienza en el punto triple y termina en el punto crítico. La región crítica comienza en este punto y un fluido supercrítico es cualquier sustancia que está por encima de su temperatura crítica (T_c) y presión crítica (P_c). Por tanto, la temperatura crítica es la temperatura más alta a la cual un gas puede convertirse en un líquido mediante un aumento de la presión y la presión crítica es la presión más alta a la cual un líquido puede convertirse en un gas tradicional aumentando la temperatura. En la llamada región crítica sólo hay una fase y posee algunas de las propiedades tanto de un gas como de un líquido.

Hay un gran número de disolventes que pueden usarse para la extracción de sustancias activas de materiales vegetales, y la Tabla 1 muestra la temperatura y presión críticas de algunos de estos disolventes.

Tabla 1: Condiciones críticas para disolventes

Disolventes	Temperatura crítica (°C)	Presión crítica (bar)
Dióxido de carbono	31,1	73,8
Etano	32,2	48,8
Etileno	9,3	50,4
Propano	96,7	42,5
Propileno	91,9	46,2
Ciclohexano	280,3	40,7
Isopropanol	235,2	47,6
Benceno	289,0	48,9
Tolueno	318,6	41,1
p-Xileno	343,1	35,2
Clorotrifluorometano	28,9	39,2
Triclorofluorometano	198,1	44,1
Amoníaco	132,5	112,8
Agua	374,2	220,5

- 20 El solicitante ha seleccionado como disolvente preferido el dióxido de carbono, el cual tiene una temperatura crítica de 31,1°C y una presión crítica de 73,8 bar.

El dióxido de carbono es particularmente ventajoso porque está disponible de manera abundante, es de bajo coste y si es necesario puede reciclarse. Las pérdidas de CO₂ son también ecológicamente neutras. Además, la extracción con CO₂ es un método conservador de preparación y pueden extraerse con precisión moléculas bastante frágiles.

- 25 Una consideración clave en la selección inicial de CO₂ líquido como disolvente para la producción de un extracto normalizado de hierba marihuana de alta potencia fue el alto grado de selectividad que puede conseguirse. En el sistema CO₂ se ha determinado que el poder solvatante puede principalmente considerarse como una función de la densidad y de la temperatura, siendo la densidad del disolvente el factor más importante.

En contra de las expectativas, el solicitante ha determinado que los cannabinoides se obtienen mejor en condiciones subcríticas más que en supercríticas.

- 30 Controlando cuidadosamente la temperatura y la presión por debajo de la temperatura y presión supercríticas el solicitante ha sido capaz de separar fracciones lipófilas o hidrófilas específicas ricas en cannabinoides con otros componentes que pueden separarse con relativa facilidad para obtener una sustancia botánica fármaco (BDS) la cual contiene los componentes deseables en una forma que es farmacéuticamente aceptable. Así, los compuestos

que se sabe son sustancias activas pueden separarse de mezclas complejas que se encuentran en una materia prima botánica.

Además, puede obtenerse una muy buena reproducibilidad lote a lote entre lotes y los constituyentes no deseados, tales como los metales pesados, que pueden estar presentes en cantidades variables pueden dejarse en el material agotado.

Las condiciones de extracción también pueden modificarse para rechazar los residuos de plaguicidas que pueden estar presentes en el material original.

Los beneficios de usar condiciones subcríticas incluyen la naturaleza selectiva de la extracción. En contraste, el solicitante encontró que, con una SFE, el disolvente, además de solubilizar los cannabinoides deseados, solubilizaba desventajosamente otros materiales no diana, los cuales fueron difíciles de separar en una etapa subsiguiente de depuración.

Para explicar, la densidad del CO₂ subcrítico es baja y permanece baja incluso cuando se aumenta la presión hasta que se alcanza el punto crítico del sistema. Así, mientras que el poder solvatante del CO₂ subcrítico se reduce, puede conseguirse un alto grado de selectividad ya que solo los componentes más solubles son eficientemente disueltos por el CO₂; en este caso la fracción de cannabinoides. El resultado es la producción de un extracto relativamente simple que contiene, además de los cannabinoides, sólo un número limitado de compuestos no diana, muchos de los cuales pueden separarse fácilmente en una etapa sencilla. Además, los ahorros de costes conseguidos trabajando a presiones y temperaturas relativamente bajas son un beneficio adicional.

En contraste, por encima de la temperatura crítica de 31°C, hay un aumento significativo de la densidad del CO₂ ya que ahora existe en un estado de fluido supercrítico. Esto tiene el efecto de aumentar mucho el poder solvatante del disolvente, lo cual, aunque en general es ventajoso porque más cannabinoides son solubilizados de este modo dando alto rendimientos, de hecho es desventajoso porque la menor selectividad del disolvente más poderoso da lugar a una mayor solubilidad de una gama de compuestos no diana, lo cual hace que el extracto resultante sea más difícil de purificar. En otras palabras, da lugar a la producción de extractos más complejos en los que la concentración del compuesto diana puede ser significativamente diluida (es decir, disminuye la potencia del extracto).

En un primer aspecto, la invención proporciona a una sustancia botánica fármaco en forma de un extracto de CO₂ obtenido en condiciones subcríticas, que ha sido tratado para reducir la proporción de materiales no cannabinoides, obtenidos a partir de una planta de marihuana que contiene un alto contenido de THC, en la que dicho extracto tratado comprende al menos un 60% de constituyentes cannabinoides, y al menos un 40% de constituyentes no cannabinoides, y en la que los constituyentes cannabinoides comprenden al menos un 90% de THC, y los constituyentes no cannabinoides incluyen terpenos, hidrocarburos y ceras de triglicéridos y pigmentos de plantas en los que las ceras se han reducido por tratamiento.

Una sustancia botánica fármaco en forma de un extracto de CO₂ se puede obtener a partir de material de plantas mediante el siguiente método: una etapa de descarboxilación; una extracción con dióxido de carbono líquido (CO₂); y una etapa para reducir la proporción de materiales no diana en el extracto, en la que la extracción con CO₂ líquido se lleva a cabo en condiciones subcríticas a una temperatura de entre 5-15°C y una presión de entre 50-70 bar.

En el contexto de esta solicitud una "sustancia botánica fármaco" es un extracto derivado de material de plantas de marihuana, extracto que cumple la definición de "sustancia botánica fármaco" dada en la Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, Agosto 2000, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Centre for Drug Evaluation and Research, de: "Una sustancia fármaco derivada de una o más plantas, algas u hongos macroscópicos. Se prepara a partir de materias primas botánicas mediante uno o más de los siguientes procedimientos: pulverización, decocción, expresión, extracción acuosa, extracción en etanol, u otros procedimientos similares."

La expresión "planta(s) Cannabis" engloba *Cannabis sativa* tipo silvestre y también sus variantes, que incluyen quimiovariantes de marihuana que contienen de manera natural diferentes cantidades de cannabinoides individuales, *Cannabis sativa* subespecie *indica* que incluye las variantes var. *indica* y var. *kafiristanica*, *Cannabis indica* y también plantas que son el resultado de cruces genéticos, auto-cruces o sus híbridos. Por consiguiente, la expresión "material de planta(s) de marihuana" se tiene que interpretar como que engloba material de plantas derivado de una o más plantas de marihuana. Para evitar la duda en la presente memoria se especifica que "material de plantas de marihuana" incluye biomasa seca de marihuana.

La extracción con CO₂ líquido se lleva preferiblemente a cabo a una temperatura entre 8-12°C, mucho más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 10°C.

La extracción con CO₂ líquido se lleva preferiblemente a cabo a una presión entre 55-65 bar, mucho más preferiblemente a una presión de sustancialmente 60 bar.

Mucho más preferiblemente, el CO₂ tiene un flujo másico de 1000-1500 Kg/h, más preferiblemente un flujo másico de sustancialmente 1250 Kg/h.

Preferiblemente, la extracción con CO₂ líquido se realiza durante hasta 10 horas, mucho más preferiblemente aproximadamente 8 horas.

- 5 En una realización preferida, el CO₂ líquido se separa por despresurización y el extracto recuperado se mantiene a una temperatura en el intervalo de -15°C a -20°C.

10 La etapa para reducir la proporción de materiales no diana en la sustancia botánica fármaco puede ser esencialmente cualquier tratamiento que dé lugar a la separación selectiva de componentes no deseados (en oposición a los cannabinoides), tal que se reduzca la cantidad de los componentes no deseados presente en el producto sustancia botánica fármaco final. Los materiales "no diana" son cualquiera de los materiales derivados del material de plantas de partida que no se desea estén presentes en la sustancia botánica fármaco final. En una realización preferida, esta etapa puede comprender una precipitación con un alcohol de C1-C5, en el que el material a tratar en la etapa de precipitación en alcohol se calienta por encima de la temperatura ambiente antes de añadir el alcohol de C1-C5. Típicamente, la etapa para reducir la proporción de materiales no diana en la sustancia botánica fármaco se lleva a cabo después de la extracción con CO₂ líquido, en cuyo caso el "material a tratar" en la precipitación alcohólica es el producto de la extracción con CO₂ líquido. Este extracto es en sí mismo una "sustancia botánica fármaco" dentro de la definición dada anteriormente.

20 El alcohol de C1-C5 es preferiblemente etanol. Preferiblemente, el extracto se calienta a una temperatura en el intervalo de 36°C a 44°C, mucho más preferiblemente aproximadamente 40°C. El calentamiento del material a tratar antes de la adición del alcohol de C1-C5 tiene el efecto de mejorar el mezclado de este material con el alcohol de C1-C5, y, por lo tanto, mejora la eficacia de la etapa de precipitación con alcohol.

El alcohol de C1-C5 se añade preferiblemente en una cantidad de 3:1 a 1:1 volumen a peso de alcohol de C1-C5 a material a tratar, más preferiblemente una cantidad de aproximadamente 2:1 volumen a peso de alcohol de C1-C5 a material a tratar.

- 25 La disolución resultante de la adición de alcohol de C1-C5 al material a tratar se enfría y se deja que los materiales insolubles se separen por precipitación. Preferiblemente, la disolución se enfría a una temperatura en el intervalo de -15°C a -25°C, y preferiblemente la disolución se enfría durante hasta 52 horas.

El precipitado de materiales insolubles se separa a continuación, típicamente por filtración. Preferiblemente, la filtración se lleva a cabo por medio de una membrana de 20 µm.

- 30 En otra realización preferida, el método puede además comprender una evaporación de múltiples etapas a presión reducida. Esto puede hacerse por evaporación rotatoria o por otras técnicas conocidas.

Típicamente, la evaporación en múltiples etapas se lleva a cabo sobre el producto de la etapa de precipitación con el alcohol de C1-C5 con el fin de separar sustancialmente todo el alcohol de C1-C5 y el agua. Preferiblemente, en primer lugar se separa el alcohol de C1-C5 y luego el agua.

- 35 El alcohol de C1-C5 se separa preferiblemente calentando a una temperatura en el intervalo de 58-62°C para dar una temperatura del vapor en el intervalo de 38-42°C a un vacío en el intervalo de 168-172 mbar hasta que haya poco o ningún condensado visible.

A continuación, se separa adicionalmente el agua, preferiblemente mediante una reducción paso a paso en etapas de aproximadamente 50 mbar.

- 40 La etapa de descarboxilación puede llevarse a cabo antes de o después de la extracción con CO₂ líquido.

En una realización preferida, la etapa de descarboxilación se lleva a cabo antes de la extracción con CO₂ líquido y se lleva a cabo calentando el material de plantas a temperaturas y durante varias veces para asegurar una conversión de al menos 95% de los cannabinoides ácidos desde la forma ácida a su forma neutra mientras se asegura que la degradación térmica de THC a CBN es menor que 10%.

- 45 La descarboxilación de los ácidos cannabinoides es una función del tiempo y de la temperatura, así, a mayores temperaturas se tardará un período de tiempo más corto para la completa descarboxilación de una cantidad dada de ácido cannabinoide. Sin embargo, en la selección de condiciones apropiadas para la descarboxilación, tiene que considerarse minimizar la degradación térmica de los cannabinoides farmacológicos deseados en productos de degradación indeseables, particularmente la degradación térmica de THC a cannabinoide (CBN).

- 50 Preferiblemente, la descarboxilación se lleva a cabo en un procedimiento de calentamiento de múltiples etapas en el cual el material de plantas se:

i) calienta a una primera temperatura durante un primer período de tiempo (relativamente corto) para separar por evaporación el agua retenida y permitir el calentamiento uniforme del material de plantas; y

ii) se aumenta la temperatura a una segunda temperatura durante un segundo período de tiempo (típicamente más largo que el primer período de tiempo) hasta que se ha producido una conversión de al menos 95% de los cannabinoides ácidos en sus formas neutras.

5 Preferiblemente, la primera etapa se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 100°C a 110°C durante 10-20 min. Más preferiblemente, la primera temperatura es aproximadamente 105°C y el primer período de tiempo es aproximadamente 15 minutos. Si el material de plantas se deriva de plantas de marihuana que tienen un alto contenido de CBD (definido como > 90% de CBD en porcentaje del contenido total de cannabinoides), la segunda temperatura está preferiblemente en el intervalo de 115°C a 125°C, preferiblemente aproximadamente 120°C y el segundo período de tiempo está en el intervalo de 45 a 75 minutos, preferiblemente aproximadamente 60 minutos.
 10 Más preferiblemente, la segunda temperatura está en el intervalo de 135°C a 145°C, preferiblemente 140°C y el segundo período de tiempo está en el intervalo de 15 a 45 minutos, preferiblemente aproximadamente 30 minutos. En otra realización, mucho más preferida para una masa de material de plantas mayor que 4 kg, la segunda temperatura está en el intervalo de 140°C a 150°C, preferiblemente 145°C y el segundo período de tiempo está en el intervalo de 55-90 minutos. Las últimas condiciones son preferidas para cantidades de procesado de, por ejemplo, 4-
 15 6 kg de material de plantas de partida y las cifras exactas, particularmente el tiempo, pueden variar ligeramente con el aumento de la masa.

Si el material de plantas se deriva de plantas de marihuana que tienen un alto contenido de THC (definido como > 90% de THC en porcentaje del contenido total de cannabinoides), la segunda temperatura está preferiblemente en el intervalo de 115°C a 125°C, típicamente 120°C, y el segundo período de tiempo está preferiblemente en el intervalo de 45 minutos a 75 minutos, típicamente aproximadamente 60 minutos. Más preferiblemente, la segunda temperatura está en el intervalo de 100°C a 110°C, típicamente 105°C, y el segundo período de tiempo está en el intervalo de 60 a 120 minutos. En otra realización, mucho más preferida para una masa de material de plantas mayor que 4 kg, la segunda temperatura está en el intervalo de 140°C a 150°C, preferiblemente 145°C, y el segundo período de tiempo está en el intervalo de 45 a 55 minutos.

25 Mucho más preferiblemente, la etapa de descarboxilación se lleva a cabo a temperaturas y durante tiempos que aseguran al menos una conversión del 97% de los cannabinoides ácidos en sus formas neutras, mientras se asegura que la degradación térmica de THC a CBN es menor que 5%.

En los ejemplos adjuntos se dan las condiciones normales de los ensayos de cannabinoides y los métodos para calcular el contenido (en %) de cannabinoides.

30 El material de plantas usado como el material de partida para el procedimiento de extracción está preferiblemente molido o procesado de cualquier otra manera para dar un tamaño de partícula de menos que 2 mm, pero preferiblemente mayor que 1 mm. En general, tal tratamiento da lugar a una mejor extracción de cannabinoides del material de plantas, ya que se mejora la densidad de empaquetamiento.

35 En una realización preferida, el método de la invención puede además comprender una etapa de tratamiento con carbón activado de un extracto (o material sustancia botánica fármaco) derivado del material de plantas.

Típicamente, esta etapa se llevará a cabo sobre el producto de una precipitación con un alcohol de C1-C5, usualmente inmediatamente tras la filtración para separar el precipitado. El producto líquido de la precipitación alcohólica se clasifica como una "sustancia botánica fármaco" según la definición dada anteriormente. Convenientemente, el tratamiento con carbón activado puede llevarse a cabo pasando el material líquido hacia abajo por una columna de carbón.
 40

Como se ilustra en los ejemplos adjuntos, el tratamiento con carbón activado mejora significativamente la estabilidad de sustancias botánicas fármacos derivadas de material de planta de marihuana, mejorando significativamente la resistencia a la degradación térmica de los cannabinoides activos.

45 En una realización preferida, el método comprenderá las siguientes etapas, preferiblemente realizadas en el orden especificado partiendo de material de planta de marihuana:

- i) Descarboxilación,
- ii) Extracción con CO₂ líquido, para producir una sustancia botánica fármaco bruta,
- iii) Precipitación con un alcohol de C1-C5 para reducir la proporción de materiales no diana,
- iv) Filtración para separar el precipitado,
- 50 v) Evaporación para separar el alcohol de C1-C5 y el agua, para producir final sustancia botánica fármaco (BDS) final.

Entre la etapa iv) y la etapa v) puede incluirse una etapa de tratamiento con carbón activado, que da lugar a una mejor estabilidad de la BDS final.

El solicitante ha determinado además que la adición de una proporción de agente modificador o un disolvente polar, por ejemplo un alcohol de C1 a C5, como por ejemplo etanol, al disolvente dióxido de carbono líquido puede aumentar adicionalmente la selectividad del procedimiento de extracción.

5 Las sustancias botánicas fármacos pueden obtenerse partiendo de material de planta de marihuana (materia prima botánica) usando el método de extracción según la invención.

En una realización preferida, la sustancia botánica fármaco comprende no más que 4 ppb de aflatoxina.

En otra realización preferida, la sustancia botánica fármaco comprende no más que 20 ppm de metales pesados totales.

10 En otra realización preferida, la sustancia botánica fármaco comprende no más que 15% p/p de disolventes residuales, más específicamente no más que 15% p/p de etanol.

En otra realización preferida, la sustancia botánica fármaco comprende no más que 10^5 cfu/g de TVC (Cuentas Viables Totales), no más que 10^4 cfu/g de hongos, no más que 10^3 cfu/g de enterobacterias y otros organismos no gram negativos, y ningún valor detectable de *E. coli*, *Salmonella* o *S. aureus*.

15 Los parámetros anteriormente listados se refieren a la pureza de la sustancia botánica fármaco y definen un grado de pureza que es preferido si la sustancia botánica fármaco tiene que incorporarse en un producto farmacéutico. Las sustancias botánicas fármacos que tienen el grado requerido de pureza pueden obtenerse usando el procedimiento de extracción según la invención, particularmente usando las condiciones de operación y los procedimientos de control de calidad descritos en los ejemplos adjuntos. Las técnicas de ensayo estándar para uso en la determinación de las concentraciones de aflatoxina, metales pesados, disolventes residuales y contaminantes bacterianos en una
20 sustancia botánica fármaco son conocidas en la técnica (por ejemplo, procedimientos estándar de la Farmacopea Europea) y detalles adicionales se dan en los ejemplos adjuntos.

25 Las sustancias botánicas fármacos preparadas de material de planta de marihuana según la invención pueden formularse con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables o depositarse sobre una superficie farmacéuticamente aceptable para su vaporización con el fin de producir formulaciones farmacéuticas que contengan cannabinoides como los agentes farmacéuticamente activos.

30 Pueden prepararse sustancias botánicas fármacos a partir de variedades únicas de plantas de marihuana que tienen un contenido diferente de cannabinoides (por ejemplo, plantas ricas en THC y CBD) y luego mezclarse conjuntamente antes de preparar la formulación para producir la composición farmacéutica final. Este enfoque es preferido si, por ejemplo, se desea conseguir una relación en peso definida de cannabinoides individuales en la formulación final. Alternativamente, las materias primas botánicas procedentes de una o más variedades de plantas de marihuana de un contenido definido de cannabinoides pueden mezclarse conjuntamente antes de la extracción de una única sustancia botánica fármaco que tenga el contenido deseado de cannabinoides, la cual puede entonces formularse en una composición farmacéutica final.

35 En otra realización, la sustancia botánica fármaco de la invención se mezcla conjuntamente con una sustancia botánica fármaco en forma de un extracto de CO₂ obtenido en condiciones subcríticas, que ha sido tratado para reducir la proporción de materiales no cannabinoides, obtenidos a partir de una planta de marihuana que contiene un alto contenido de CBD, en la que dicho extracto tratado comprende al menos un 60% de constituyentes cannabinoides, y al menos un 40% de constituyentes no cannabinoides, y en la que los constituyentes cannabinoides comprenden al menos un 85% de CBD, y los constituyentes no cannabinoides incluyen terpenos, hidrocarburos y ceras de triglicéridos y pigmentos de plantas en los que las ceras se han reducido por tratamiento.
40

45 La sustancia botánica fármaco puede formularse con cualquier diluyente, vehículo o excipiente conveniente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. La selección de diluyentes, vehículos o excipientes dependerá de la forma de dosificación deseada, la cual puede a su vez depender de la ruta de administración pretendida a un paciente. Las formas de dosificación incluyen, entre otras, formas de dosificación líquidas para administrar vía accionadas por una bomba o como pulverizadores de aerosoles, comprimidos, pastillas, geles, cápsulas, supositorios, polvos, etc., y vaporizadores. Tales formas de dosificación pueden prepararse según los principios estándar de formulación farmacéutica conocidos por los expertos en la técnica. Formas de dosificación preferidas, y métodos para preparar tales formas de dosificación, se describen el documento WO 02/064109.

50 Las formulaciones líquidas son particularmente preferidas. Una formulación particularmente preferida para la administración de cannabinoides, aunque no se pretende que limite la invención, es una formulación líquida que comprende la sustancia botánica fármaco, etanol y propilenglicol, y opcionalmente un agente saborizante, tal como aceite de menta. Esta formulación puede administrarse convenientemente a la mucosa bucal o sublingual vía un pulverizador accionado con una bomba, y proporciona una absorción eficiente de los cannabinoides activos.

55 Los diversos aspectos de la invención se ilustran más, sólo a modo de ejemplo, mediante los siguientes ejemplos, junto con las figuras adjuntas, en las cuales:

La figura 1 ilustra la pérdida de THC en el tiempo a 40°C para una sustancia botánica fármaco (BDS) estándar de THC y una BDS de THC tratada con carbón activado (BDS purificada). Eje y: cantidad de THC (expresada como porcentaje del valor t0), eje x: tiempo en meses.

5 La figura 2 ilustra la pérdida de CBD en el tiempo a 40°C para una sustancia botánica fármaco (BDS) estándar de CBD y una BDS de CBD tratada con carbón activado (BDS purificada). Eje y: cantidad de CBD (expresada como porcentaje del valor t0), eje x: tiempo en meses.

La figura 3 ilustra la formación de canabinol (CBN) en el tiempo a 40°C para una sustancia botánica fármaco (BDS) estándar de THC y una BDS de THC tratada con carbón activado (BDS purificada). Eje y: cantidad de CBN (expresada como porcentaje del valor t0), eje x: tiempo en meses.

10 Abreviaturas

En general, las abreviaturas de los principales cannabinoides son como sigue:

Tetrahidrocanabinol (THC), Δ^9 -tetrahidrocanabinol (THC o Δ^9 -THC), Δ^8 -tetrahidrocanabinol (Δ^8 -THC), análogo de Δ^9 -tetrahidrocanabinol-propilo (THCV), canabidiol (CBD), análogo de canabidiol-propilo (CBDV), canabinol (CBN), canabicromeno (CBC), análogo de canabicromeno-propilo (CBCV) y canabigerol (CBG).

15 Los siguientes ejemplos se incluyen para proporcionar una visión general de las técnicas utilizadas para producir el sustancia botánica fármaco de la invención.

Ejemplo 1- Desarrollo de un procedimiento para la extracción de cannabinoides de plantas de marihuana

Selección de quimiovariantes de marihuana

20 GW Pharma Ltd ha desarrollado distintas variedades de híbridos de plantas de Cannabis para maximizar la producción de los constituyentes químicos específicos, los cannabinoides. Se usan dos tipos de plantas; una quimiovariante produce principalmente THC y otra quimiovariante produce predominantemente CBD. Sin embargo, pueden obtenerse variantes alternativas - véase por ejemplo, Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of marihuana, Small and Beckstead, LLOYDIA, vol 36b, 1973, p 144-156 – y criarse usando técnicas bien conocidas por los expertos para maximizar el contenido de cannabinoides.

25 Existen similitudes químicas y estructurales entre THC y CBD. Debido a estas similitudes, junto con el origen botánico de los materiales de partida, puede considerarse que cada uno es intercambiable con respecto al desarrollo de procedimientos para la extracción de cannabinoides.

Preferiblemente, cada quimiovariante de Cannabis se procesa y controla separadamente para dar dos BDS distintas. Sin embargo, es posible mezclar materiales de plantas de dos o más quimiovariantes o usar una variedad que producirá la relación deseada de cannabinoides dados antes de la extracción y, así, preparar una única BDS.

30 Producción of materia prima botánica

La BDS se prepara a partir de extractos de *Cannabis sativa* L. (familia *Cannabidaceae*). La *Cannabis sativa* fue descrita en la Farmacopea Británica de 1934. La marihuana se cultiva en el Reino Unido bajo licencia de la United Kingdom Home Office bajo el control de GW Pharma Ltd. Las instalaciones de cultivo están equipadas con pantallas y un control climático completo (temperatura, humedad e iluminación de alta intensidad) para que puedan producirse varias cosechas por año en condiciones de crecimiento casi idénticas asegurando así la continuidad del suministro.

Cultivo:

40 Las plantas de marihuana se propagan a partir de esquejes tomados de las planta madre, que proceden de una única fuente de semillas. Por lo tanto, se produce una cosecha por medio de propagación asexual cuando las plantas son todas hembra. La propagación usando esquejes controla la consistencia del genotipo.

Los esquejes son enraizados en compost suministrado exento de plaguicidas. Las plantas se riegan y durante el ciclo de crecimiento se aplica un fertilizante de liberación sostenida. Por medio de las condiciones controladas de crecimiento, las plantas tardan aproximadamente 12 semanas en alcanzar la madurez.

Las plantas son irrigadas a lo largo de todo su ciclo de crecimiento con agua de calidad potable.

45 En el cultivo de plantas de marihuana no se usa ningún herbicida o plaguicida sintético.

Compost:

El cultivo eficiente de Cannabis necesita el suministro de un medio de crecimiento fiablemente uniforme.

El compost proporciona una textura blanda, alta porosidad al aire, humectación fácil, baja conductividad y un suministro equilibrado de nutrientes. El compost consiste en turba y minerales naturales añadidos que incluyen cal

(carbonatos de calcio y de magnesio) para proporcionar control del pH del compost durante el ciclo de crecimiento de las plantas de Cannabis.

- 5 El compost contiene un suministro adecuado de minerales esenciales y un mínimo de minerales con conocidos efectos adversos sobre las plantas. Algunos minerales que incluyen manganeso pueden estar presentes en el compost en una forma insoluble y pueden ser liberados a lo largo del tiempo en una forma libremente soluble. El control del pH del compost y la monitorización de la irrigación para evitar el anegamiento controlarán la concentración de manganeso soluble. El pH del compost se mantiene por encima de 5,5.

Se declara que el compost está exento de plaguicidas ya que no se añade ningún plaguicida o herbicida.

Fertilizante:

- 10 El compost contiene fertilizante identificable en dos formas discretas, un fertilizante base y un fertilizante de liberación lenta. Durante el crecimiento, se aplica a las plantas más fertilizante de liberación lenta.

Control de enfermedades y plagas:

Durante el cultivo no se usa ningún herbicida o plaguicida artificial. Unas condiciones de higiene rigurosas reducen la aparición de plagas y enfermedades.

- 15 El control de las condiciones de crecimiento, de tensiones medioambientales tales como la sequía, luz insuficiente y temperaturas desfavorables, reduce el riesgo de enfermedades.

- 20 La inspección regular de las plantas durante el ciclo de crecimiento permite la detección de cualquier planta y plaga dañina. Pueden surgir plantas dañinas macho, aunque las malas hierbas deberían estar ausentes debido a las condiciones y medios de crecimiento controlados. Para gestionar cualquier plaga y enfermedad que puedan producirse se usan inspecciones frecuentes y métodos de control biológicos.

Recolección de las plantas:

- 25 Por medio de un control estricto de las condiciones de crecimiento, las plantas de Cannabis alcanzan la madurez en aproximadamente 12 semanas. En las últimas semanas de crecimiento se desarrollan densas flores resinosas. Al final de aproximadamente la semana 11, la biosíntesis de cannabinoides se ha ralentizado notablemente y las plantas están listas para su recolección.

La planta se corta y se seca en un ambiente de temperatura y humedad controladas.

- Aproximadamente 21°C.
- Aproximadamente 38 - 45% HR.

La planta secada se evalúa físicamente para el punto final.

- 30 THC y CBD son los constituyentes bioactivos principales en la BDS. Sin embargo, estos constituyentes están presentes como ácidos carboxílicos biológicamente inactivos en la BRM.

- THCA
- CBDA

- 35 Las formas ácidas descarboxilan lentamente en el tiempo durante el secado. Las hojas y las flores son despojadas de los tallos más largos para proporcionar la materia prima botánica (BRM).

Almacenamiento de la BRM:

En condiciones de almacenamiento, la pérdida por el secado alcanza el equilibrio de aproximadamente 10%. Las condiciones de almacenamiento de la BRM secada dependerán del estado físico de la BRM.

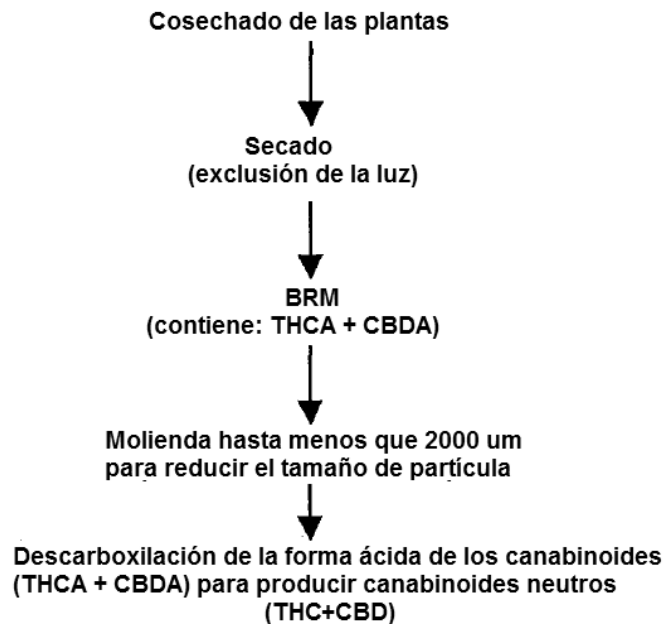
Condiciones generales de almacenamiento de la BRM:

- 40
- Protegida de la luz
 - Aproximadamente 15 - 25°C o -20 °C
 - Aproximadamente 38 - 42% HR.

Sumario de la producción de una BRM:

Ensayo	Método	Especificación
Identificación: -A -B -C	Visual TLC HPLC/UV	Cumple Corresponde al patrón (para CBD & CBDA) Positivo para CBDA
Ensayo: CBDA + CBD	Interno (HPLC/UV)	NLT 90% de cannabinoides analizados por el área de los picos
Pérdida por secado:	Ph.Eur.	NMT 15%
Aflatoxina:*	Método UKAS	NMT 4 ppb
Microbios:** -TVC - Hongos - E. Coli	Ph.Eur.	NMT 10 ⁷ cfu/g NMT 10 ⁵ cfu/g NMT 10 ² cfu/g
Materia extraña:	Ph.Eur.	NMT 2 %
Herbicidas y plaguicidas residuales:***	Ph.Eur.	Cumple

La especificación típica para una BRM derivada de una variedad rica en CBD se ilustra en la Tabla 2:



5

Métodos analíticos:

Identificación visual:

Las características macroscópicas permiten que se distingan los rasgos de la planta Cannabis de posibles plantas adulterantes y sustitutas. Es una identificación visual frente a un patrón fotográfico.

Identificación por TLC:

La cromatografía TLC usa tanto el tiempo de retención como el color característico de las manchas para identificar efectivamente la variedad de Cannabis. Para el análisis por TLC se preparan muestras de laboratorio extrayendo la hierba seca. Se picha una parte alícuota sobre una placa de TLC, junto a muestras de referencia de THC y CBD.

- 5 Tras la exposición al reactivo Fast Blue B, THC y THCA se presentan como manchas rosas, mientras que CBD y CBDA son de color naranja. Los compuestos neutros pueden distinguirse de los ácidos por comparación del valor R_f con el obtenido para los patrones. La identidad se confirmó por comparación del R_f y del color de la mancha simple, con los obtenidos para el patrón apropiado.

Identificación por HPLC:

- 10 La cromatografía HPLC usa la comparación del tiempo de retención de cannabinoides para identificar efectivamente la variedad de Cannabis. El método de HPLC en fase inversa es específico para CBD y CBDA, y por lo tanto puede usarse como un ensayo de identidad. Se extraen muestras de biomasa y se centrifugan. La detección de todos los analitos se consigue a 220 nm con confirmación adicional de los analitos ácidos a 310 nm.

Análisis (CBD + CBDA):

- 15 Este análisis se usa para monitorizar el contenido de CBD y CBDA en la planta. Los contenidos de CBD y CBDA se determinan usando un método de HPLC.

La eficiencia del procedimiento de descarboxilación se determina dividiendo el contenido en % en términos de p/p de CBD entre el contenido total de CBD + CBDA.

Pérdida por secado:

- 20 La pérdida por secado se evalúa usando el método de ensayo de Ph. Eur. (Farmacopea Europea).

Aflatoxina:

La aflatoxina se analiza usando un método acreditado por el United Kingdom Accreditation Service (UKAS).

Microbios:

La calidad microbiológica se determina usando la metodología de la Ph. Eur.

- 25 Materia extraña:

La materia extraña se evalúa usando el método de ensayo de la Ph. Eur. Se extienden flores, hojas y tallos laterales en una capa fina sobre una superficie limpia de laboratorio. La materia extraña se separa a mano tan completamente como sea posible, y se pesa. Los resultados se expresan en % p/p de materia extraña en la muestra de biomasa herbácea. La materia extraña puede comprender no más que 2% de la biomasa.

- 30 Herbicidas y plaguicidas residuales:

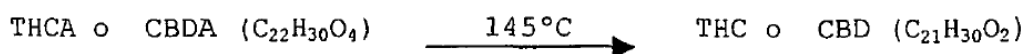
Las plantas de Cannabis se hacen crecer en un entorno bien controlado. Durante el cultivo no se usa o necesita ningún herbicida o plaguicida.

Se deriva una especificación equivalente de BRM (comparar en Tabla 2) para una variedad rica en THC y se siguen métodos analíticos idénticos, excepto que THC/THCA reemplaza a CBD/CBDA.

- 35 Descarboxilación

THC y CBD son los principales constituyentes bioactivos de Cannabis. Sin embargo, estos constituyentes están presentes como ácidos carboxílicos biológicamente inactivos en las plantas de Cannabis. Con el fin de extraer THC o CBD del material de planta de marihuana, es necesario convertir los compuestos precursores de almacenamiento THCA y CBDA en sus formas más fácilmente extraíbles y farmacológicamente activas. Los ácidos de THC y CBD

40 descarboxilan lentamente con el tiempo de forma natural. La forma tradicional de aumentar la velocidad de descarboxilación es mediante la aplicación de calor. Sin embargo, THCA se convierte no sólo en THC, sino también en otro canabinoide, el canabinol (CBN).



- 45 El procedimiento de descarboxilación se lleva en general a cabo dentro de la preparación del material de partida o materia prima botánica (BRM), antes de la iniciación del procedimiento de extracción.

Estudios de laboratorio de descarboxilación

5 Se calentaron porciones de material de plantas secado y molido (aproximadamente 0,25 g con un tamaño de partícula de 1-2 mm). Se dispuso un sistema experimental de planta piloto con el objetivo de determinar los parámetros para la conversión óptima de THCA o CBDA en THC y CBD respectivamente, con una pérdida concomitante mínima de estos compuestos en sus productos de degradación térmica, en el caso de THC la formación de CBN.

Breve descripción de los materiales y métodos:

10 Se colocaron en viales de vidrio de 20 mL con espacio de cabeza pociones (0,25 g) tanto de materiales herbáceos molidos (aproximadamente hasta un tamaño de partícula de 1-2 mm) que contenían THCA y CBDA, y los viales se sellaron a estanqueidad con sellos de caucho butilo con fondo de Teflón cerrados por engarce a presión. Los viales sellados se calentaron a una de tres temperaturas, durante períodos de hasta 4 h, como sigue: 105°C, 120°C, 140°C durante 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 horas.

El calentamiento se realizó en un horno con circulación forzada de aire. Las condiciones del horno fueron exactas dentro de 0,5 – 1,0 grados a las tres temperaturas usadas.

15 Después de que terminara el procedimiento de calentamiento, se analizaron muestras representativas de la hierba descarboxilada usando técnicas de HPLC, GC y TLC. En las secuencias de HPLC y GC se incluyeron patrones de THC, CBD y CBN.

Resultados y discusión:

20 El análisis por HPLC de los extractos de disolvente fue capaz de demostrar la desaparición de CBDA o THCA en función del tiempo a las dos temperaturas menores. A 140°C, las muestras tomadas más pronto a 0,5 horas contenían sólo señales muy modestas de un pico que eluía a los tiempos de retención de CBDA o THCA.

25 Las Tablas 3 y 4 presentan datos de HPLC que cuantifican la conversión de CBDA o THCA en los compuestos libres; también se presentan datos que muestran el contenido de CBD o THC y la relación de CBD/(CBDA + CBD) o THC/(THCA + THC). La conversión de las formas ácido carboxílico en las correspondientes formas descarboxiladas puede monitorizarse comparando la relación descarboxilado/(descarboxilado + sin descarboxilar) con el contenido absoluto de compuestos descarboxilados. Así, cuando la reacción alcanza un valor máximo (> 0,95), durante el procedimiento de conversión debe optimizarse el punto más temprano tiempo/temperatura al cual el contenido de THC o CBD es también máximo.

Así, para la hierba que contenía CBD, fue apropiado 1 hora a 120°C ó 0,5 horas a 140°C.

30 Esto se confirma examinando el cromatograma de TLC de los extractos con disolvente, CBDA está ausente después de 1 hora a 120°C o en cualquier momento a 140°C.

35 Para THC hay un tercer criterio, la formación de CBN, cuando es deseable minimizar la formación de este compuesto durante el procedimiento térmico de descarboxilación. La Tabla 5 proporciona datos de cromatografía de gases (GC) de los que puede derivarse la relación CBN/THC. Tomados en consideración, junto con la relación THC/(THCA + THC) y el contenido máximo de THC, la formación mínima de CBN se produce después de 0,5 ó 1,0 horas a 120°C. A 140°C, incluso 0,5 horas da un mayor contenido de CBN que cualquier de los dos puntos menores tiempo/temperatura.

Por lo tanto, los estudios de laboratorio demuestran las condiciones óptimas para la descarboxilación de:

- Quimiovariante que principalmente produce CBD son 1 hora a 120°C ó 0,5 horas a 140°C.
- Quimiovariante que principalmente produce THC con la mínima formación de CBN, son 1 a 2 horas a 105°C ó 1 hora a 120°C.

45 La cromatografía de capa fina revela que virtualmente todo el THCA ha desaparecido después de 4 horas a 105°C y después de 1 hora a 120°C. Nada de THCA es visible en ningún momento cuando la hierba se calienta a 140°C. Una pequeña cantidad de mancha residual a este valor de retención en TLC y la presencia a bajas concentraciones de un pico coincidente con THCA en el análisis por HPLC pueden indicar la presencia de un canabinoide minoritario más que de THCA residual.

ES 2 592 531 T3

Tabla 3:

Datos de HPLC de la descarboxilación de material herbáceo con CBDA			
Temperatura	Tiempo (horas)	CBD/(CBD + CBDA)	Área del pico de CBD/0,1g de hierba
105°C	Cero	0,15	4769
	0,5	0,22	5262
	1,0	0,86	5598
	2,0	0,93	5251
	4,0	0,98	5242
120°C	0,5	0,91	5129
	1,0	0,97	5217
	2,0	0,99	5037
	4,0	1,00	5200
140°C	0,5	0,96	5440
	1,0	1,00	5105
	2,0	1,00	5157
	4,0	1,00	5005

Tabla 4:

Datos de HPLC de la descarboxilación de material herbáceo con THCA			
Temperatura	Tiempo (horas)	THC/(THC + THCA)	Área del pico de THC/0,1g de hierba
105°C	Cero	0,17	992,9
	0,5	0,87	5749
	1,0	0,93	5273
	2,0	0,98	7734
	4,0	0,99	7068
120°C	0,5	0,97	7189
	1,0	0,99	6391
	2,0	0,99	6500
	4,0	1,00	5870
140°C	0,5	1,00	6724
	1,0	1,00	5981
	2,0	1,00	5361
	4,0	1,00	4787

Tabla 5:

Datos de GC de la descarboxilación de material herbáceo con THC		
Temperatura	Tiempo (horas)	CBN/THC (%)
105°C	Cero	2,4
	0,5	3,5
	1,0	4,2
	2,0	3,7
	4,0	5,6
120°C	0,5	3,2
	1,0	4,1
	2,0	6,7
	4,0	11,3
140°C	0,5	5,7
	1,0	13,0
	2,0	17,5
	4,0	23,8

Las condiciones de descarboxilación a una escala de lote de aproximadamente 4 kg de materia prima botánica (BRM) son como sigue:

5 Inicialmente, se calentaron a 105°C aproximadamente 4 kg de BRM (THCA o CBDA) molida a descarboxilar y se mantuvieron a esta temperatura durante aproximadamente 15 minutos para separar por evaporación cualquier cantidad de agua retenida y permitir el calentamiento uniforme de la BRM. A continuación, el lote se calentó adicionalmente a 145°C y se mantuvo a esta temperatura durante 45 minutos para permitir que finalizara la descarboxilación con una eficiencia mayor que 95%.

10 El tiempo de calentamiento para la BRM de CBDA se extendió a 55 minutos a 145°C ya que por los resultados fue evidente que el CBDA fue ligeramente más resistente a la descarboxilación que el THCA. Esta diferencia entre CBD y THC sería incluso más pronunciada en lotes a escala comercial. El tiempo de calentamiento para BRM de THC se mantuvo en 45 minutos a 145°C.

15 Las condiciones usadas a escala de planta piloto reflejan estrechamente las determinadas como óptimas en los estudios de laboratorio. Las diferencias pueden explicarse por una transferencia de calor más lenta y menos eficiente por los recipientes y a través de la BRM cuando se aumenta el tamaño del lote a la escala de planta piloto.

Las Tablas 6 y 7 proporcionan datos para demostrar la eficiencia de la descarboxilación medida en términos del contenido del canabinoide biológicamente activo, THC o CBD.

Tabla 6:

Eficiencia de la descarboxilación para BRM de CBD	
Número de lote CBD	Eficiencia de descarboxilación (%). Especificación >95%
A	98,8
B	99,5
C	98,3
D	100,0
E	100,0

Eficiencia de la descarboxilación para BRM de CBD	
Número de lote CBD	Eficiencia de descarboxilación (%). Especificación >95%
F	100
G	96,9
H	100,0

El aumento del tamaño del lote de BRM de CBD de aproximadamente 4 kg a 6 kg dio lugar a la necesidad de aumentar el tiempo de descarboxilación. El tiempo de descarboxilación a 145°C se aumentó de 55 minutos a 90 minutos.

Tabla 7:

Número de lote THC	Eficiencia de descarboxilación (%). Especificación >95%
I	99,4
J	97,3
K	98,5
L	100,0
M	97,8
N	99,9
O	100,0

5 Visión de conjunto del procedimiento de extracción

La BDS se extrae de BRM descarboxilada usando una metodología con dióxido de carbono líquido. Ésta implica pasar continuamente dióxido de carbono licuado a través de biomasa troceada, la cual está contenida en un depósito a alta presión. El extracto bruto se disuelve en etanol, se enfría a una temperatura baja, luego se filtra para separar los constituyentes precipitados, tales como las ceras. La separación de etanol y agua a vacío produce BDS que contiene altas concentraciones de CBD o THC, dependiendo de la biomasa usada.

10

Diagrama de flujo de un procedimiento de extracción típico:

Se descarboxila BRM calentando a aproximadamente 105°C durante 15 minutos, seguido por aproximadamente 145°C durante un mínimo de 55 minutos para THCA y 90 minutos para CBDA



Extracción con dióxido de carbono líquido (CO₂) [grado alimentario] durante hasta 10 horas
Condiciones: aproximadamente una presión de 60 bar ± 10 bar y 10°C ± 5°C



Separación de CO₂ por despresurización para recuperar el extracto bruto



"Acondicionamiento" - Disolución del extracto bruto en etanol seguida por enfriamiento de la disolución (20°C ± 5°C/hasta 52 horas) para precipitar las ceras no deseadas



Separación del material céreo no deseado por filtración en frío (filtro de 20 µm)



Separación de etanol y agua del filtrado por evaporación en película fina a presión reducida (60°C ± 2°C, con vapor a 40°C ± 2°C/172 mbar y 72 mbar ± 4 mbar)



BDS
(Almacenada a 20°C ± 5°C)

Extracción No. 1

La primera etapa del procedimiento de fabricación es una extracción usando CO₂ líquido en condiciones subcríticas.

5 Los experimentos indicaron que podían extraerse tanto THC y CBD de material de planta de Cannabis con alta eficiencia usando CO₂ subcrítico a una baja temperatura, de aproximadamente 10°C ± 5°C usando una presión de aproximadamente 60 bar ± 10bar.

La Tabla 8 siguiente muestra datos comparativos generados para una BDS rica en THC.

Tabla 8

Carga No	Presión (bar)	Temp. (°C)	Cera separada % p/p	%p/p THC post-acondicionamiento
Ac1202	400	60	8,2	67,2
Ac1205	400	60	6,1	67,0
Ac1206	400	60	6,1	68,0
Tres ensayos	60	10	2,2 - 4,8	59,9-73,7
			Aprox., cerca de 3	Aprox. 65%

De los resultados puede verse que hay una pérdida de selectividad, como indica la alta carga de cera en condiciones supercríticas. Aunque el acondicionamiento puede separar mayores cantidades de cera, el procesado es difícil ya que, por ejemplo, se bloquean los filtros.

Resultados similares se obtuvieron con CBD.

5 Las condiciones preferidas para la extracción con CO₂ líquido son como sigue:

La materia prima botánica descarboxilada se empaca en una única columna y se expone a CO₂ líquido a presión.

- Tamaño del lote: Aproximadamente 60 kg
- Presión: 60 bar ± 10 bar
- Temperatura: 10°C ± 5°C

10 • Tiempo: Aproximadamente 8 horas

- Flujo másico de CO₂ 1250 kg/h ± 20%.

Los parámetros preferidos del procedimiento para la producción de BDS son: tiempo de extracción >10 horas, presión de CO₂ 50-70 bar, temperatura de extracción 5-15°C, masa de CO₂ 167 kg/kg de BRM.

15 Tras la despresurización y la eliminación del CO₂ por venteo, el extracto bruto de BDS se recoge en depósitos sellados. La BRM original se reduce a aproximadamente 10% p/p del extracto bruto de BDS. El extracto bruto de BDS se mantiene a -20°C ± 5°C.

20 El extracto bruto de BDS contiene ceras y moléculas de cadena larga. La separación es por un procedimiento de "acondicionamiento" (extracción 2), mediante el cual el extracto bruto de BDS se calienta a, por ejemplo, 40°C ± 4°C para licuar el material. Se añade etanol en la relación de 2:1 volúmenes de etanol a peso de extracto bruto de BDS. La disolución etanólica se enfría entonces a -20°C ± 5°C y se mantiene a esta temperatura durante aproximadamente 48 horas.

Tras la finalización del acondicionamiento, el precipitado se separa por filtración en frío a través de un filtro de 20 µm.

Extracción No. 2

25 La segunda etapa del procedimiento de fabricación es la extracción No. 2, denominada "acondicionamiento", usando etanol. El extracto bruto de BDS producido en la extracción No. 1 contiene constituyentes tales como ceras. El etanol extrae efectivamente las moléculas de cadena larga del extracto bruto.

Estudios:

30 Se encontró que calentando el extracto bruto de BDS a aproximadamente 40°C se mejoraba la capacidad de mezclado del extracto bruto con el disolvente.

Se prefirió enfriar la disolución de "acondicionamiento" a -20°C durante aproximadamente 48 horas.

Los parámetros preferidos del procedimiento para la producción de BDS son: temperatura de extracción 36-44°C, relación etanol:producto aprox. 2:1, temperatura del refrigerador -25 °C a -15 °C, tiempo 48-54 horas.

Filtración

35 La disolución etanólica producida en la segunda etapa de extracción requiere una filtración para separar los precipitados resultantes. El tamaño del filtro es preferiblemente 20 µm.

Los parámetros preferidos del procedimiento para la producción de BDS son: tiempo total de filtración > 6 horas.

Evaporación

40 La etapa final del procedimiento de fabricación es la separación del etanol y de cualquier cantidad de agua que pueda estar presente. Preferiblemente, esto se lleva a cabo calentando a 60°C ± 2°C para dar una temperatura del vapor de 40°C ± 2°C a un vacío de 172 mbar ± 4 mbar. Se continúa la destilación en estas condiciones hasta que hay poco o ningún condensado visible. La reducción adicional del vacío, en etapas, hasta aproximadamente 50 mbar, completa la separación del agua. Tras finalizar, la BDS se transfiere a recipientes sellados de acero inoxidable y se almacena a -20°C ± 5°C.

Los parámetros preferidos del procedimiento para la producción de BDS son: temperatura de evaporación del vapor 38-42°C, presión para la separación del etanol 167-177 mbar, para la separación del agua 70-75 mbar, 62-58 mbar, 52-48 mbar, tiempo < 8 horas.

Caracterización de la BDS

- 5 La BDS rica en THC es un extracto semi-sólido marrón y viscoso que consiste en al menos 60% de constituyentes cannabinoides. Los constituyentes cannabinoides incluyen al menos 90% de THC, aproximadamente 1,5% de CBD, estando lo restante constituida por otros cannabinoides minoritarios.

10 La composición química de Cannabis ha sido completamente estudiada identificándose más de 400 compuestos (Hendricks et al., 1975; Turner et al., 1980). Han sido identificados más de 60 cannabinoides, siendo CBDA y THCA (Los precursores de CBD y THC) los mucho más abundantes. En general, los constituyentes no cannabinoides comprenden hasta 50% del extracto, dependiendo del procedimiento de extracción. Las clases químicas identificadas incluyen alcanos (cadenas de 25-30 átomos de carbono), compuestos nitrogenados, aminoácidos, azúcares, aldehídos, alcoholes y cetonas, flavanoides, glicósidos, vitaminas, pigmentos y terpenos. Se han identificado aproximadamente 95 mono y sesquiterpenos en Cannabis y son responsables del olor característico.

- 15 Se ha llevado a cabo un trabajo considerable para elucidar completamente la estructura tanto de CBD como de THC (sumarizado en los artículos anteriores) y ambos se han preparado sintéticamente. Se ha aislado con éxito THC puro a partir de BDS en cantidad suficiente para ser usado como material de referencia para su identificación y cuantificación.

Impurezas:

- 20 La sustancia BDS es un extracto selectivo de hojas secas descarboxiladas y cabezas de flores de quimiovariantes específicas de *Cannabis sativa*. Se han encontrado una gama de más de 400 compuestos, incluyendo más de 60 cannabinoides, en plantas de Cannabis (Turner 1980). Puesto que éstos son naturales no se considera necesario estimar a ninguno de estos componentes como impurezas. Las principales impurezas se producen por lo tanto en cuatro áreas, plaguicidas introducidos durante el proceso de crecimiento, aflatoxinas, y nuevos productos formados por descarboxilación y materiales diferentes de los cannabinoides, los cuales constituyen la BDS.

30 El proceso de crecimiento se controla estrechamente usando las directrices GAP y se lleva a cabo en un entorno de crecimiento interior de clima controlado. Durante el crecimiento, no se aplica ningún plaguicida a los cultivos, gestionándose todo el control de las plagas por medios biológicos. No se incorpora ningún plaguicida al medio de crecimiento. Para asegurarse que no se introduce ningún residuo de plaguicidas en el producto, el medio de crecimiento se analiza periódicamente para detectar los plaguicidas que se sabe son usados por el suministrador del medio de crecimiento.

Una vez que se ha cosechado y secado el material de plantas, se analizan periódicamente más muestras usando una exploración general de plaguicidas para asegurarse que no ha ocurrido ninguna contaminación del cultivo. Las impurezas potenciales se controlan adecuadamente en la etapa de BRM.

- 35 Aunque las condiciones de crecimiento se controlan cuidadosamente para impedir esto, la materia prima tiene el potencial de experimentar contaminación biológica que da lugar a aflatoxinas en el producto. La BRM y la BDS son por lo tanto analizadas periódicamente para determinar el contenido de aflatoxinas.

40 La forma natural de THC en la planta recientemente hecha crecer es el ácido THCA, aunque se producen pequeñas cantidades del THC neutro. Antes de la extracción, el THCA es descarboxilado calentando para dar el THC neutro. El procedimiento es eficiente pero permanece una pequeña cantidad de THCA y éste se monitoriza durante el análisis final de la BDS. La degradación térmica del THCA y THC durante el procedimiento de descarboxilación es posible para dar CBNA y CBN. Éstos se monitorizan en la BDS.

- 45 Los componentes no cannabinoides que constituyen la porción lastre de la BDS incluyen hidrocarburos y ceras de triglicéridos, pigmentos de plantas y terpenos. Éstos son componentes comunes de muchos otros extractos de plantas medicinales y son considerados de poca importancia toxicológica y farmacológica. La gama de otros componentes presentes es amplia pero en general sólo están presentes en pequeñas cantidades.

La calidad del lastre es reducida por el procedimiento de acondicionamiento el cual precipita las ceras. Se considera que los materiales lastre son un diluyente de los constituyentes activos y no se analizan o controlan.

Tabla 9- Especificaciones para el control de BDS rica en CBD:

Ensayo	Método de ensayo	Límites
Aspecto	Interno	Semi-sólido viscoso marrón
Identificación: -A -B	TLC HPLC/UV	Las manchas tienen R _f y colores característicos, comparadas con el patrón de CBD. Positivo para CBD
Contenido de CBD	Interno (HPLC-UV)	NLT 55% p/p del extracto
Canabinoides relacionados: - Contenido de THC - Otros (total)	Interno (HPLC/UV)	NMT 7,5% del contenido de CBD NMT 5% del contenido de CBD
Aflatoxina: *	TBA	NMT 4 ppb
Metales pesados totales:**	Ph. Eur.	NMT 20 ppm
Disolventes residuales: - Etanol	Interno	NMT 5% p/p
Microbios: *** - TVC - Hongos - Otras enterobacterias & ciertos otros organismos gram negativos - E. Coli - Salmonella - S. aureus	Ph.Eur.	NMT 10 ⁵ cfu/g NMT 10 ⁵ cfu/g NMT 10 ³ cfu/g Ausente en 1 g Ausente en 10 g Ausente en 1 g

Procedimientos analíticos

Identificación, análisis y canabinoides relacionados:

- 5 El contenido de THC, CBD y canabinol (CBN) en la BRM y la BDS se determina cuantitativamente por extracción con metanol o metanol / cloroformo (9:1). El método de cuantificación es la cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (HPLC) con detección UV a 220 nm. Todos los análisis tienen que realizarse con luz amarilla porque se sabe que los compuestos de interés son sensibles a la luz.

Equipo y condiciones de cromatografía:

- Equipo Sistema HPLC Agilent (HP) 1100 con detector de longitud de onda UV variable o detector de haz de diodos
- 10 Columna de HPLC Discovery C8, 5 µm, 15 cm x 0,46 cm
- Precolumna Kingsorb C18, 5 µm, 3 cm x 0,46 cm
- Fase móvil Acetonitrilo: Metanol:ácido acético 0,25% p/v (16:7:6 en volumen)
- Temp. Columna 25°C
- Caudal 1,0 mL.min⁻¹
- 15 Detección 220 nm, 600 mA f.s.d., segunda longitud de onda 310 nm
- Volumen inyección 10 µL

ES 2 592 531 T3

Tiempo ejecución 20-25 minutos (puede extenderse para muestras que contengan una pequeña cantidad de picos que eluyen tarde)

Orden de elución CBD, CBDA, Δ^9 THCV, CBN, Δ^9 THC, CBC, Δ^9 THCA.

Preparación estándar:

- 5 Se almacenan a -20°C disoluciones madre patrón de CBD, CBN y Δ^9 THC en metanol de aproximadamente $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

- 10 A partir de las disoluciones madre patrón se preparan disoluciones diluidas patrón de trabajo ($0,1 \text{ mg/mL}$ para Δ^9 THC y CBD y $0,01 \text{ mg/mL}$ para CBN) se preparan en metanol y se almacenan a -20°C (período máximo de doce meses después de la preparación inicial). Después de la preparación, las disoluciones patrón tienen que dividirse en partes alícuotas en viales para reducir la cantidad de patrón expuesta a temperatura ambiente. Antes de usar en un análisis de muestras por HPLC, se separa el número requerido de viales de patrón y se dejan equilibrar a temperatura ambiente.

Preparación de las muestras:

En todas las preparaciones, pueden usarse pesos y volúmenes alternativos para dar las mismas diluciones finales.

- 15 Materia prima botánica:

- Pesar con precisión aproximadamente 100 mg de material homogéneo seco troceado en un matraz volumétrico de 10 mL .
- Dispersar el material en metanol:cloroformo (9:1 v/v) y enrasar con el mismo disolvente.
- Extraer la muestra en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos .

- 20 • Centrifugar una parte alícuota a 3000 rpm durante aproximadamente 2 minutos .

- Diluir $100 \mu\text{L}$ del sobrenadante hasta 1 mL con metanol en un vial adecuado para muestras de HPLC. (Puede requerirse una dilución adicional si la concentración del canabinoide principal está fuera del intervalo de trabajo lineal).

Materia prima botánica descarboxilada:

- 25 Como para la materia prima botánica.

Sustancia botánica fármaco:

- Pesar con precisión aproximadamente 80 mg de BDS en un matraz volumétrico de 50 mL .
- Disolver la BDS y enrasar con metanol.

- 30 • Diluir $100 \mu\text{L}$ del sobrenadante preparado hasta 1 mL con metanol en un vial de automuestreador adecuado para HPLC.

Procedimiento de cromatografía:

- 35 Se colocan las muestras en el estante del automuestreador en el orden introducido en la lista de secuencia en el paquete informático Agilent chemstation. Para proporcionar datos cuantitativos y del tiempo de retención se usan disoluciones patrón. Éstas pueden típicamente inyectarse por duplicado o triplicado antes de la inyección de cualquier disolución de muestra y luego de manera única a intervalos adecuados durante el ensayo, con un máximo de 10 muestras de ensayo entre patrones.

Criterios de aceptación de la cromatografía:

Tabla 10- Ventanas de tiempos de retención y tiempo de retención relativo (RRT) a Δ^9 THC para cada analito

Canabinoide	Tiempo de retención (minutos)	RRT (THC)
CBD	3,1-5,8	0,58
CBN	7,4-8,3	0,83
Δ^9 THC	9,0-10,0	1,00
CBDA	5,5-6,2	0,615

Canabinoide	Tiempo de retención (minutos)	RRT (THC)
Δ^9 THCV	5,9-6,6	0,645
CBC	11,6-12,8	1,30
Δ^9 THCA	14,6-16,0	1,605

Tabla 11- Forma de los picos (factor de simetría según el método de la farmacopea británica):

Canabinoide	Factor de simetría
CBD	< 1,30
CBN	< 1,25
Δ^9 THC	< 1,35

Cálculos:

Materia prima botánica:

- 5 La siguiente ecuación se usa para obtener un resultado de la pureza del canabinoide principal en % de los canabinoides realmente analizables (CBD, CBDA, CBN, Δ^9 THC & Δ^9 THCA) en el lote:

Para un material rico en Δ^9 THC:

$$\text{THC (\%)} = \frac{\text{Suma de las áreas de los picos de THC \& THCA}}{\text{Suma del área de los picos de los canabinoides analizables}} \times 100$$

Para un material rico en CBD, CBD & CBDA reemplazan a THC & THCA en el numerador de la ecuación.

Materia prima botánica descarboxilada:

- 10 La siguiente ecuación se usa para calcular la eficiencia del procedimiento de descarboxilación:

Para un material rico en Δ^9 THC:

$$\text{Eficiencia de descarboxilación (\%)} = \frac{\text{Área del pico de THC}}{\text{Suma de las áreas de los picos de THC \& THCA}} \times 100$$

Para un material rico en CBD, CBD & CBDA reemplazan a THC & THCA en la ecuación.

Sustancia botánica fármaco:

- 15 Las siguientes ecuaciones se usan para calcular la concentración de muestra de sustancia fármaco, la concentración individual de canabinoides simples, el contenido en % de los canabinoides analizables en la sustancia fármaco, la cantidad de canabinoide principal en % de canabinoides realmente analizables y la cantidad de canabinoide principal en el peso total de sustancia fármaco extraída.

Para un material rico en Δ^9 THC:

$$\text{Concentración de muestra de sustancia fármaco} = \frac{\text{Peso de muestra}}{\text{Factor de dilución}}$$

20

En la que el factor de dilución = 50 x 10 = 500

$$\text{Concentración de THC en la muestra} = \frac{\text{Conc del patrón de THC x área media de la muestra de THC}}{\text{Área media del patrón de THC}}$$

$$\text{Contenido de THC (\% p/p) de la sustancia fármaco} = \frac{\text{Concentración de THC en la muestra}}{\text{Concentración de sustancia fármaco en la muestra}} \times 100$$

CBD y CBN pueden sustituirse por Δ^9 THC en todas estas ecuaciones para obtener resultados cuantitativos para ambos. Δ^9 THCA y CBDA también se calculan usando las concentraciones estándar para Δ^9 THC o CBD en ausencia de patrones de referencia específicos para ellos.

- 5 Las sustancias relacionadas se definen como la suma de los valores medios en % p/p de CBN, Δ^9 THCA y CBDA.

$$\text{THC en \% de cannabinoides totales analizables} = \frac{\text{Contenido de THC (\% p/p)}}{\text{Suma en \% p/p de todos los cannabinoides analizables}} \times 100$$

Se obtiene la cantidad total de Δ^9 THC presente en el extracto completo de sustancia fármaco.

Ejemplo 2- Investigación de la estabilización de sustancia botánica fármaco (BDS) por purificación parcial usando carbón activado

- 10 Los resultados de los estudios de estabilidad de formulaciones de THC indican que THC en forma de BDS es inestable incluso a temperaturas de almacenamiento tan bajas como 5°C. Esto contrasta con el comportamiento del THC purificado (Dronabinol USP) en cápsulas blandas de gel Marinol, para las cuales se acepta una vida útil de 2 años a temperatura ambiente. Debe también advertirse que se reivindica que la vida útil de las disoluciones patrón de THC en metanol suministradas por Sigma-Aldrich es 4 años cuando se almacenan refrigeradas y protegidas de la luz.

Esta aparente discrepancia entre la estabilidad de BDS (THC) y THC purificado lleva a especular que algún componente de BDS estaba desestabilizando al canabinoide principal.

- 20 Una solución a este problema sería purificar la BDS (THC) para dar un canabinoide de alta pureza, preferiblemente cristalino. Sin embargo, los costes adicionales de procesado incurridos para transformar la BDS en el canabinoide puro aumentarían sustancialmente el coste de los productos farmacéuticos acabados que incorporan el canabinoide.

Por lo tanto, el solicitante buscó desarrollar una etapa de purificación sencilla que produjera BDS de mayor estabilidad pero que no aumentara los costes de procesado en una extensión prohibitiva.

- 25 El solicitante ha determinado que una etapa de limpieza con carbón activado puede llevarse convenientemente a cabo en estrecha unión con el procedimiento de "acondicionamiento" pasando la disolución etanólica de acondicionamiento a través del lecho de un filtro para separar las ceras precipitadas y luego directamente a través de una columna de carbón activado en una única etapa y que el uso de carbón activado mejora significativamente la vida útil.

Detalles experimentales

- 30 Se pasaron disoluciones de BDS (THC) o BDS (CBD) a una concentración de 100 mg/mL en etanol absoluto BP a través de una columna empaquetada con carbón activado y se recogieron los eluidos. A continuación, éstos se diluyeron con más etanol absoluto para conseguir una concentración de canabinoide de aproximadamente 25 mg/mL. A continuación, la disolución se transfirió a un vial de 10 mL tipo AX1 (es decir, vidrio ambarino) y se selló por engarce a presión. Estas muestras se designaron como BDS purificado con carbón activado.

- 35 Las muestras de las disoluciones de BDS (THC) y BDS (CBD) que no se habían pasado a través de la columna de carbón activado se diluyeron similarmente para dar una concentración de canabinoide de 25 mg/mL y a continuación se sellaron en un vial de vidrio ambarino del mismo tipo. Estas muestras se designaron "BDS patrón" y sirvieron como testigo para el estudio de estabilidad.

- 40 Los viales que contenían BDS patrón y BDS purificada con carbón activado de cada tipo se almacenaron en un incubador de estabilidad a 40°C y a continuación se extrajeron periódicamente muestras durante un período de 1-12 meses para analizar por HPLC el contenido de cannabinoides y el perfil por TLC.

Los análisis de TLC en fase normal emplearon las siguientes condiciones:

Fase estacionaria:	Gel de sílice G
Fase móvil:	Hexano/acetona 80:20
Desarrollo:	2 x 8 cm, es decir, desarrollo doble
Visualización:	Inmersión en Fast Blue B (aq) al 0,1% p/v

Los análisis de TLC en fase inversa emplearon las siguientes condiciones:

Fase estacionaria:	Gel de sílice revestido con C18
Fase móvil:	Ácido acético al 0,25% v/v (aq)/metanol/acetonitrilo 6:7:16
Desarrollo:	2 x 8 cm, es decir, desarrollo doble
Visualización:	Inmersión en Fast Blue B (aq) al 0,1% p/v.

Para cada muestra se aplicó a la placa de TLC un volumen de disolución que aproximadamente contenía 5 µg de cannabinoides totales.

5 Resultados y discusión

Las disoluciones etanólicas de BDS (THC) patrón y BDS (CBD) patrón son de un color amarillo bastante intenso. El paso de las disoluciones de BDS a través de carbón activado decolora efectivamente las disoluciones, presumiblemente mediante la adsorción de pigmentos de las plantas coextraídos con los cannabinoides durante la preparación de la BDS a partir de hierba de marihuana por extracción con CO₂ líquido.

10 Los resultados de los análisis de HPLC de las cuatro disoluciones de BDS diferentes se tabulan a continuación como Tabla 12 y también se presentan en forma gráfica (figuras 1-3). Todos los datos se dan en % del contenido a t0. Los valores de CBN se incluyen para las disoluciones de BDS (THC) ya que, en estudios previos de estabilidad, este compuesto ha sido identificado como un marcador de la degradación térmica de THC.

15 Tabla 12: Valores del análisis de cannabinoides de las disoluciones BDS patrón y purificada para el período 1-12 meses a 40°C

Meses		1	4	6	12
BDS (THC) patrón	THC	97,3%	92,4%	85,3%	74,0%
	CBN	104%	119%	133%	154%
BDS (THC) purif.	THC	102,9%	107,4%	96,0%	88,6%
	CBN	94%	111%	111%	120%
BDS (CBD) patrón	CBD	100,3%	103,6%	93,3%	91,0%
BDS (CBD) purif.	CBD	101,0%	100,7%	97,2%	96,9%

A partir de los datos anteriores, está bastante claro que tanto para BDS (THC) como para BDS (CBD) hay algún componente del lastre, que no puede separarse mediante carbón activado, el cual está desestabilizando a los cannabinoides.

20 La comparación de los grados de degradación alcanzados después de 12 meses a 40°C para la BDS patrón y la correspondiente BDS purificada con carbón activado indica que, para ambos extractos de THC y CBD, la purificación con carbón activado aumenta la resistencia a la degradación térmica por encima del 50%.

Para BDS (THC) se ve que la concentración de CBN aumenta en función de la pérdida del cannabinoide principal (Fig. 3). Como se observa para otras formulaciones que contienen THC, se confirma de nuevo que la concentración de CBN es un marcador de la degradación térmica.

25 La comparación entre regiones de cannabinoides de los cromatogramas de HPLC de muestras de BDS (CBD) patrón y BDS (CBD) purificada después de 12 meses a 40°C (datos no mostrados) no reveló ninguna información significativa. Sin embargo, una comparación similar de los cromatogramas de HPLC de las BDS (THC) patrón y purificada después de la degradación aportó información relevante.

30 El CBN estuvo en una mayor concentración en la BDS patrón sin purificar mucho más degradada, pero también se observó un segundo producto de degradación significativo, el cual está de nuevo presente en ambas muestras pero

que es más abundante en la muestra más degradada. El espectro de este producto de degradación fue de nuevo esencialmente idéntico al del CBN y en base a esto y al tiempo de retención pareció que era uno de los análogos del CBN.

Conclusión

- 5 Mediante un simple tratamiento con carbón activado se consigue una significativa mejora de la resistencia a la degradación térmica.

Ejemplo 3- Efecto de la adición de un agente modificador orgánico sobre la extracción de material de plantas de marihuana con CO₂

- 10 El siguiente ejemplo describe una investigación sobre el efecto de la adición de un codisolvente polar sobre las características de un extracto producido a partir de material de plantas de marihuana (quimiovariante G5) usando extracción con CO₂ líquido, e ilustra la diferencia de selectividad obtenida usando extracción con CO₂ subcrítico vs supercrítico.

Detalles experimentales

- 15 Se llevaron a cabo experimentos de extracción usando un aparato de extracción con CO₂ de 1 litro de capacidad. Como disolventes se emplearon CO₂ grado alimentario etanol absoluto grado BP.

Se usó un lote de G5 marihuana (una quimiovariante rica en CBD). El contenido de CBD después de la descarboxilación fue 7,3% p/p. El análisis del contenido de canabinoide de los extractos se llevó a cabo por HPLC.

Resultados y discusión

- 20 Los datos relacionados con la composición del extracto final obtenido después de un tiempo de extracción de 4 horas en las condiciones especificadas se presentan a continuación en la Tabla 13:

Tabla 13: Datos de composición y rendimientos de extractos producidos en diferentes condiciones de extracción

MUESTRA	CONDICIONES DE EXTRACCIÓN	EXTRACTO (P/P)	%CBD (p/p)	RECUPERACIÓN DE CBD (%)
AC470	10°C/60 BAR	8,4%	63,6%	72,9%
AC471	40°C/100 BAR	10,7%	54,4%	79,5%
AC472	40°C/100 BAR + ETANOL 2%	10,3%	64,6%	91,0%

La eficiencia de la recuperación está basada en el CBD disponible en el material de plantas descarboxilado cargado en el depósito para cada extracción.

- 25 Los resultados ilustran que cambiando las condiciones de extracción de subcríticas a supercríticas aumenta el poder solvatante del CO₂ y da lugar a una mayor recuperación del CBD disponible. Sin embargo, el CO₂ supercrítico puede ahora solubilizar una mayor gama de compuestos y la extracción de estos compuestos adicionales tiene el efecto de diluir la concentración de CBD en el extracto en tal extensión que es ahora menor que la obtenida para la extracción subcrítica. Consecuentemente, la recuperación marginal adicional de CBD disponible de la materia prima no debería superar esta desventaja y demuestra que el uso de condiciones supercríticas no es deseable.

- 30 La adición de 2% p/p de etanol absoluto al CO₂ supercrítico como agente modificador aumenta la recuperación del CBD disponible a > 90%. Presumiblemente, el canabinoide relativamente polar es más soluble en el extracto de mayor polaridad.

- 35 Interesantemente, la concentración de CBD en el extracto se acrecienta ligeramente mediante la adición de un agente modificador polar. Esto parecería indicar que el material no canabinoide co-extractable presente en el material de plantas es menos polar que el canabinoide diana y, por lo tanto, la extracción de este material (el "lastre") disminuye cuando aumenta la polaridad. Así, la extracción de material de plantas de marihuana con CO₂ supercrítico + etanol al 2% p/p da un aumento de la recuperación del compuesto activo diana sin ninguna penalización asociada de pérdida de selectividad.

En resumen:

- 40 1. Un cambio de las condiciones subcríticas a las supercríticas produce poca ventaja en términos de la recuperación global de canabinoide de la materia prima pero da lugar a la desventaja de reducir el contenido de compuesto activo del extracto.

2. La adición de 2% de etanol absoluto como agente modificador al CO₂ supercrítico da lugar a una mejora significativa de la recuperación de canabinoide de la materia prima sin ninguna penalización del contenido de compuesto activo por el material coextraído.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sustancia botánica fármaco en forma de un extracto de CO₂ obtenido en condiciones subcríticas, que ha sido tratado para reducir la proporción de materiales no cannabinoides, obtenidos a partir de una planta de marihuana que contiene un alto contenido de THC, en la que dicho extracto tratado comprende al menos un 60% de constituyentes cannabinoides, y al menos un 40% de constituyentes no cannabinoides, y en la que los constituyentes cannabinoides comprenden al menos un 90% de THC, y los constituyentes no cannabinoides incluyen terpenos, hidrocarburos y ceras de triglicéridos y pigmentos de plantas en los que las ceras se han reducido por tratamiento.
2. Una sustancia botánica fármaco como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende no más que 4 ppb de aflatoxina.
- 10 3. Una sustancia botánica fármaco como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende no más que 20 ppm de metales pesados totales.
4. Una sustancia botánica fármaco como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende no más que 15% p/p de disolventes residuales.
- 15 5. Una sustancia botánica fármaco como se reivindica en la reivindicación 4, en la que el disolvente residual es etanol.
6. Una sustancia botánica fármaco como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende no más que 10⁵ cfu/g de TVC (Cuentas Viables Totales), no más que 10⁴ cfu/g de hongos, no más que 10³ cfu/g de enterobacterias y otros organismos no gram negativos, y ningún valor detectable de *E. coli*, *Salmonella* o *S. aureus*.
- 20 7. Una sustancia botánica fármaco obtenida mezclando una sustancia botánica fármaco según se reivindica en la reivindicación 1, conjuntamente con una sustancia botánica fármaco en forma de un extracto de CO₂ obtenido en condiciones subcríticas, que ha sido tratado para reducir la proporción de materiales no cannabinoides, obtenidos a partir de una planta de marihuana que contiene un alto contenido de CBD, en la que dicho extracto tratado comprende al menos un 60% de constituyentes cannabinoides, y al menos un 40% de constituyentes no cannabinoides, y en la que los constituyentes cannabinoides comprenden al menos un 85% de CBD, y los
- 25 constituyentes no cannabinoides incluyen terpenos, hidrocarburos y ceras de triglicéridos y pigmentos de plantas en los que las ceras se han reducido por tratamiento.
8. Una composición farmacéutica que comprende una sustancia botánica fármaco, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

30

Figura 1: Pérdida de THC a 40°C de BDS (THC) patrón y BDS (THC) purificada

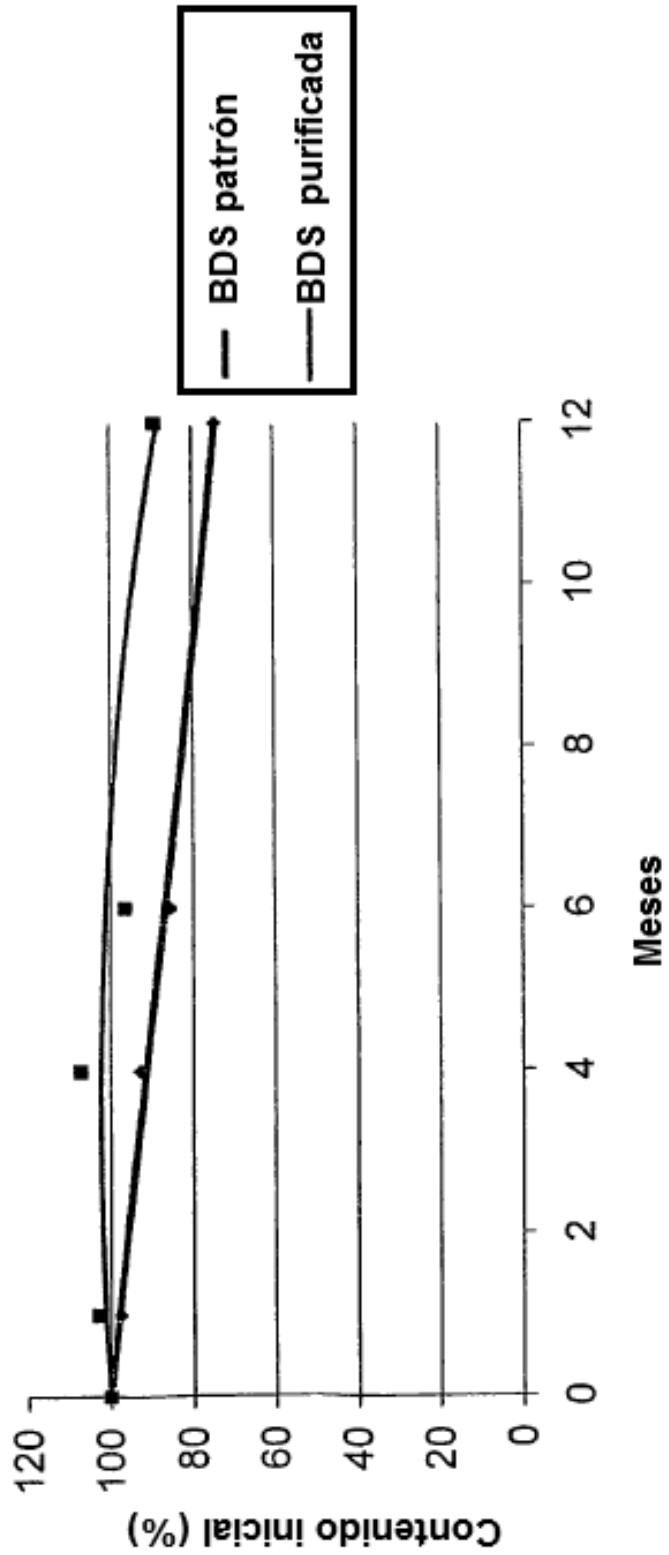


Figura 2: Pérdida de CBD a 40°C de BDS (CBD) patrón y BDS (CBD) purificada

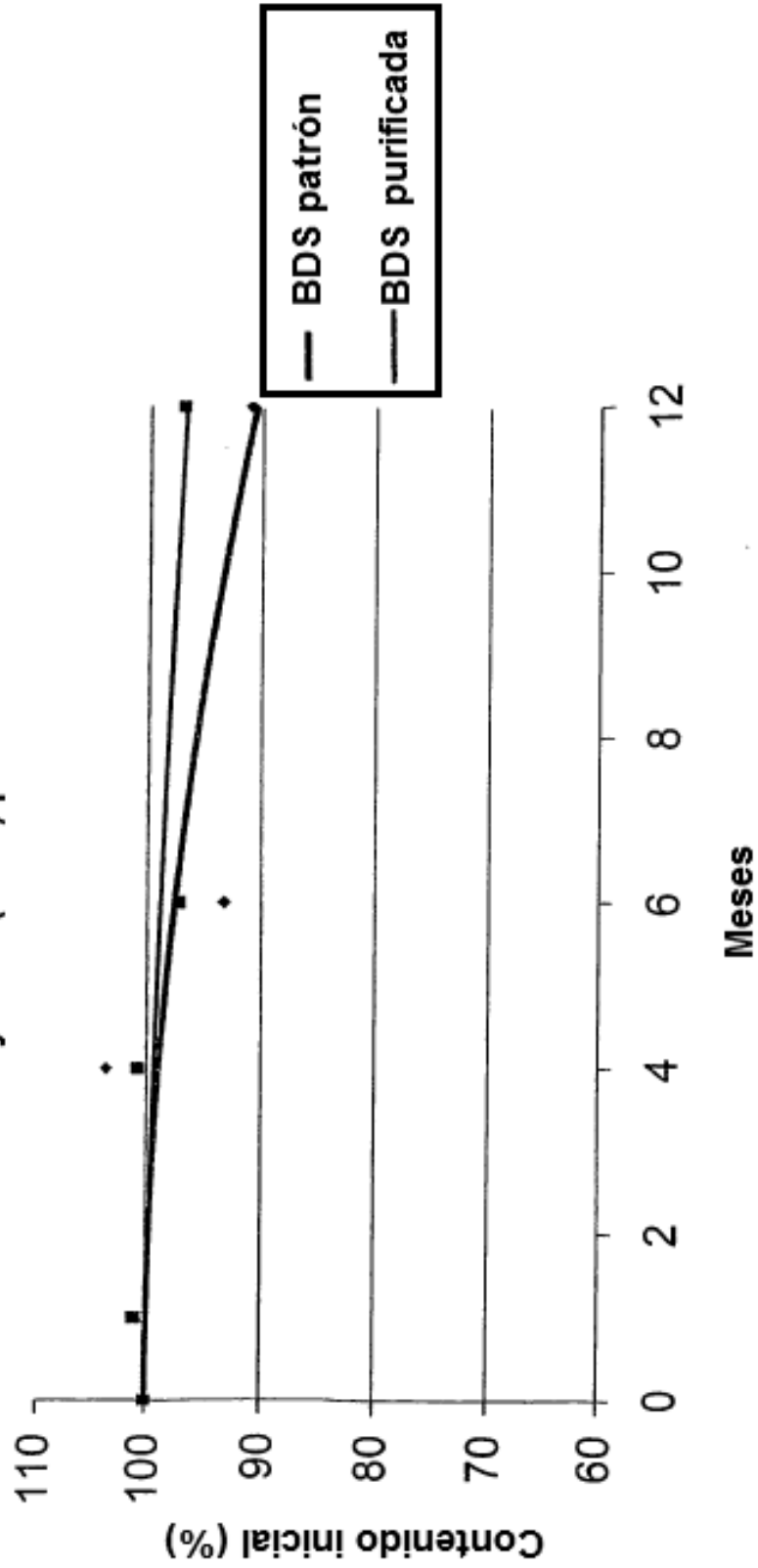


Figura 3: Formación de CBN a 40°C para BDS (THC) patrón y BDS (THC) purificada

