

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 533**

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61P 1/08 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2003 PCT/GB2003/00451**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2003 WO03063847**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2003 E 03734779 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 1482917**

54 Título: **Composiciones que comprenden ácido cannabidiólico para el tratamiento de náuseas, vómitos, emesis, mareos o afecciones similares**

30 Prioridad:

01.02.2002 GB 0202385

15.03.2002 GB 0206183

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

02.01.2020

73 Titular/es:

GW PHARMA LIMITED (100.0%)
Sovereign House, Histon
Cambridge CB24 9BZ, GB

72 Inventor/es:

WHITTLE, BRIAN y
JAVID, FARIDEH AFSHIN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 736 533 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

Composiciones que comprenden ácido cannabidiólico para el tratamiento de náuseas, vómitos, emesis, mareos o afecciones similares.

5 El vómito funcional es la expulsión enérgica de los contenidos gástricos producidos por la contracción involuntaria de la musculatura abdominal. Esto ocurre cuando el fondo gástrico y el esfínter esofágico inferior están relajados. Los vómitos funcionales pueden estar acompañados de náuseas (una sensación desagradable de que está a punto de producirse vómitos). Las náuseas se asocian con una actividad fisiológica alterada, incluida la hipomotilidad gástrica y un aumento del tono parasimpático. Las náuseas pueden preceder y acompañar a los vómitos. Representan la conciencia del paciente de los estímulos aferentes hacia el centro de vómitos medulares.

10 El vómito fisiológico es una condición funcional que se produce en respuesta a una serie de factores que afectan al centro del vómito. También se puede desencadenar por factores periféricos, tal como la ingestión de toxinas, la alteración del sistema vestibular, la inflamación peritoneal y la obstrucción intestinal. También puede ocurrir en trastornos de vaciamiento gástrico retardado como, por ejemplo, en diabetes y gastroparesia idiopática.

15 Los vómitos psicogénicos pueden ser autoinducidos o pueden ocurrir involuntariamente en situaciones que inducen ansiedad, amenazan o de alguna manera son consideradas como desagradables por el sujeto. También es posible que los factores psicológicos que conducen a los vómitos estén determinados culturalmente (por ejemplo, comer alimentos exóticos se puede considerar repulsivo en el propio grupo cultural del sujeto). El vómito también puede expresar hostilidad como cuando los niños vomitan durante un berrinche o en ciertos trastornos de conversión.

20 Las náuseas y los vómitos también pueden ser inducidos por quimioterapia y radioterapia citotóxicas. Después de la operación, los pacientes también pueden vomitar y experimentar náuseas, que se pueden atribuir a los agentes anestésicos y analgésicos que se administran con frecuencia al mismo tiempo.

25 Por lo tanto, existen mecanismos periféricos y centrales que están implicados en la expresión de náuseas y vómitos francos. Las terapias existentes están disponibles para el tratamiento de estas afecciones, pero tienen limitaciones, y existe la necesidad de tratamientos alternativos, particularmente cuando estos pueden ejercer su efecto a través de un mecanismo nervioso central.

30 La investigación de una serie de agentes en un modelo animal consciente en el que se induce el mareo por movimiento ha confirmado que los extractos de cannabis tienen un efecto antiemético. Convencionalmente, el efecto antiemético del cannabis se ha atribuido al delta⁹-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC). El uso de un modelo animal completo y consciente para explorar este efecto, y la disponibilidad de extractos de cannabis que contienen predominantemente un cannabinoide u otro han permitido un análisis más detallado de la contribución de cannabinoides específicos.

35 Sorprendentemente, se ha encontrado que el efecto antiemético, en un modelo de mareo por movimiento en *Suncus murinus* (la musaraña casera asiática) es mayor en extractos que contienen un contenido alto de cannabidiol (CBD) (y/o su forma ácida CBDA) en lugar de extractos que contienen un alto contenido de tetrahidrocannabinol (THC) (y/o su forma ácida THCA) (más del 50% de CBD, más preferiblemente más del 80%, más preferiblemente más del 90% en relación con otros cannabinoides presentes).

40 Se plantea la hipótesis de que los resultados se extenderán a la náusea y el vómito también puede ser inducido por quimioterapia citotóxica y radioterapia. Después de la operación, los pacientes también pueden vomitar y experimentar náuseas, que se pueden atribuir a los agentes anestésicos y analgésicos que se administran con frecuencia al mismo tiempo.

Por lo tanto, existen mecanismos centrales y periféricos que están implicados en la expresión de náuseas y vómitos francos. Las terapias existentes están disponibles para el tratamiento de estas afecciones, pero tienen limitaciones, y existe la necesidad de tratamientos alternativos, particularmente cuando estos pueden ejercer su efecto a través de un mecanismo nervioso central.

45 La investigación de una serie de agentes en un modelo animal consciente en el que se induce el mareo por movimiento ha confirmado que los extractos de cannabis tienen un efecto antiemético. Convencionalmente, el efecto antiemético del cannabis se ha atribuido al delta⁹-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC). El uso de un modelo animal completo y consciente para explorar este efecto, y la disponibilidad de extractos de cannabis que contienen predominantemente un cannabinoide u otro han permitido un análisis más detallado de la contribución de cannabinoides específicos.

50 Antecedentes de la técnica

Varios documentos han descrito previamente el uso de cannabinoides en la terapia.

El documento US 4,847,290 (Burstein) describe el uso de una forma no psicoactiva de THC en el tratamiento de la analgesia y la inflamación.

El documento WO 93/05031 (Yissum) describe una forma novedosa adicional de THC y sugiere diversos usos terapéuticos.

El documento US 5,434,295 (Mechoulam) describe nuevos compuestos de tipo cannabinoide que tienen un grupo ácido.

- 5 Burstein et al. (1999) describe el potencial terapéutico de los ácidos cannabinoides, pero no describe ni sugiere el uso de estos compuestos como antieméticos.

El documento WO 01/95889 describe el uso de CBD y sus derivados como composiciones farmacéuticas, pero no describe ni sugiere el uso de estos compuestos como antieméticos.

- 10 Yotoriyama et al. (1991) compara los extractos de THCA y CBDA en los índices de catalepsia, hipotermia, sueño y actividad locomotora, pero no describe ni sugiere el uso de estos compuestos como antieméticos.

Molnar et al. (2000) analiza el uso de CBDA para reducir la acumulación de fármacos en ratones resistentes a múltiples fármacos, pero no describe ni sugiere el uso de estos compuestos como antieméticos.

El documento WO 99/52524 (Feldmann) enseña el uso de CBD como agente antiinflamatorio, pero no describe ni sugiere el uso de estos compuestos como antieméticos.

- 15 El documento US 6,328,992 (Brooke) describe los usos medicinales de material vegetal de cannabis completo en el tratamiento de diversos trastornos.

Yamamoto et al. (1995) describe el metabolismo de los cannabinoides y Adams et al. (1941) describe un procedimiento químico orgánico mediante el cual el CBD se convierte en THC al hervir. Este es un procedimiento que no ocurre en el cuerpo. Se ha establecido el metabolismo del CBD y no se produce la formación de THC.

- 20 Hansel et al. (1992) proporciona una revisión del género de cannabis además de los cannabinoides que produce la planta de cannabis.

Parker et al. (2002) describe el uso de CBD y un homólogo de CBD para suprimir las náuseas en un modelo animal, pero se publicó después de la fecha de prioridad de la presente solicitud.

- 25 El documento WO 02/064109 (GW Pharma) describe formulaciones que comprenden CBD y THC y sus usos terapéuticos sugeridos. La solicitud se publicó después de la fecha de prioridad de la presente solicitud.

El documento WO 02/069993 (Werner) describe composiciones que comprenden diversas proporciones de THC y CBD y se publicó después de la fecha de prioridad de la presente solicitud.

El documento WO 03/070232 (Yissum) describe el uso de CBD en vómitos inducidos por quimioterapia, pero se publicó después de la fecha de prioridad de la presente solicitud.

- 30 El documento WO 2004/026857 (GW Pharma) describe un método para purificar cannabinoides, pero se publicó después de la fecha de prioridad de la presente solicitud.

- 35 Sorprendentemente, se ha encontrado que el efecto antiemético, en un modelo de mareo por movimiento en *Suncus murinus* (musaraña casera asiática), es mayor en extractos que contienen un contenido alto de cannabidiol (CDB) (y/o su forma ácida CBDA) en lugar de extractos que contienen un alto contenido de tetrahidrocannabinol (THC) (y/o su forma ácida THCA) (más del 50% de CDB, más preferiblemente más del 80%, más preferiblemente más del 90% en relación con otros cannabinoides presentes)

- 40 Se plantea la hipótesis de que los resultados se extenderán a la variante de propilo de CBD, a saber, CBDV y su forma ácida CBDVA. Más particularmente, los resultados se observaron en extractos en los que los cannabinoides estaban predominantemente en su forma ácida, ya que los extractos se prepararon mediante una extracción metanólica y no se habían sometido a una etapa de descarboxilación mediante, por ejemplo, calentamiento. Es posible, por lo tanto, que los efectos terapéuticos observados se deban a la forma ácida de los cannabinoides. Si es la forma ácida del cannabinoide la responsable del efecto terapéutico observado, esto es particularmente sorprendente ya que hasta la fecha no se sabe que las formas ácidas de los cannabinoides presenten efectos terapéuticos.

- 45 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido cannabidiólico (CBDA) para uso en el tratamiento de náuseas, vómitos, emesis, mareo por movimiento o afecciones similares.

Preferiblemente, el CBDA es sintético.

En una realización, el CBDA es sintético.

- Mientras que la observación se ha realizado en un extracto administrado por vía intraperitoneal, el experto apreciará que se puede preparar un medicamento para su administración por cualquier medio apropiado. Estos incluyen, pero no se limitan a, sólidos, semi sólidos, por ejemplo, geles, líquidos, pulverizadores, aerosoles, inhaladores, vaporizadores, enemas, supositorios rectales y similares. La vía de administración no necesita ser intraperitoneal, sino que puede ser oral, bucal, sublingual o por cualquier otra vía apropiada, por ejemplo, el tracto respiratorio, tracto nasal y recto distal.
- Un "extracto vegetal" es un extracto de un material vegetal como se define en the Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, August 2000, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research.
- El "material vegetal" se define como una planta o parte de una planta (por ejemplo, corteza, madera, hojas, tallos, raíces, flores, frutas, semillas, bayas o partes de estas), así como también los exudados.
- El término "planta (s) de cannabis" abarca Cannabis sativa de tipo salvaje y también variantes de este, incluyendo quimiovaries de cannabis que naturalmente contienen diferentes cantidades de los cannabinoides, la subespecie Cannabis sativa indica que incluye las variantes var. indica y var. Kafiristanica, Cannabis indica y también plantas que son el resultado de cruces genéticos, autocruces o híbridos de estos. El término "material vegetal de cannabis" se debe interpretar de acuerdo con lo anterior como que abarca un material vegetal derivado de una o más plantas de cannabis. Para evitar dudas, se indica por este medio que el "material de la planta de cannabis" incluye la biomasa de cannabis seca.
- En el contexto de esta solicitud, los términos "extracto de cannabis" o "extracto de una planta de cannabis", que se usan de manera intercambiable, abarcan "Sustancias farmacéuticas botánicas (BDS)" derivadas del material vegetal de cannabis. Una sustancia farmacéutica botánica se define en the Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, August 2000, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research como: "Una sustancia farmacéutica 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 etanólica u otros procedimientos similares". Una sustancia farmacológica botánica no incluye una sustancia altamente purificada o modificada químicamente derivada de fuentes naturales. De este modo, en el caso del cannabis, las "sustancias farmacológicas botánicas" derivadas de las plantas de cannabis no incluyen los cannabinoides altamente purificados de grado de farmacoepa.
- Las "sustancias farmacológicas botánicas" derivadas de plantas de cannabis incluyen extractos primarios preparados por procedimientos tales como, por ejemplo, maceración, percolación, extracción con solventes tales como alcoholes de C1 a C5 (por ejemplo, etanol), Norflurane (HFA134a), HFA227 y dióxido de carbono líquido bajo presión. El extracto primario se puede purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante extracción supercrítica o subcrítica, vaporización y cromatografía. Cuando se usan solventes tales como los que se enumeran anteriormente, el extracto resultante contiene material soluble en lípidos no específico. Esto se puede eliminar mediante una variedad de procedimientos, incluido el "invernación", que implica enfriar a -20 °C seguido de una filtración para eliminar el balasto céreo, la extracción con dióxido de carbono líquido y la destilación.
- Los "extractos de cannabis" preferidos incluyen aquellos que se pueden obtener usando cualquiera de los métodos o procedimientos descritos específicamente en este documento para preparar extractos a partir de material de plantas de cannabis. Los extractos de preferencia sustancialmente libres de ceras y otros materiales solubles en lípidos no específicos, pero preferiblemente contienen sustancialmente todos los cannabinoides presentes de forma natural en la planta, más preferiblemente en sustancialmente las mismas proporciones en las que ocurren en la planta de cannabis intacta.
- Las sustancias farmacológicas botánicas se formulan en "Botanical Drug Products" que se definen en the Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft Guidance, August 2000, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research como: "Un producto botánico que es destinado a ser usado como un fármaco; un producto farmacéutico que se prepara a partir de una sustancia farmacéutica botánica".
- Los "cannabinoides" pueden ser sustancias altamente purificadas, de grado farmacéutico y se pueden obtener por purificación a partir de una fuente natural o por medios sintéticos. Los cannabinoides incluirán, pero no se limitan a, tetrahidrocannabinoides, sus precursores, análogos de alquilo (particularmente propilo), cannabidioles, sus precursores, análogos de alquilo (particularmente propilo) y cannabinol.
- En las realizaciones preferidas de la invención, las formulaciones comprenden extractos de una o más variedades de plantas de Cannabis enteras, particularmente Cannabis sativa, Cannabis indica o plantas que son el resultado de cruces genéticos, autocruces o híbridos de estos. El contenido preciso de cannabinoides de cualquier variedad de cannabis en particular se puede determinar cualitativa y cuantitativamente usando métodos bien conocidos para los expertos en el arte, tales como TLC o HPLC. De este modo, uno puede elegir una variedad de Cannabis a partir de la cual preparar un extracto que produzca la proporción deseada de CBD o CBDV a THC o THCV. Alternativamente,

los extractos de dos o más variedades diferentes se pueden mezclar o mezclar para producir un material con la proporción de cannabinoides preferida para formular en una formulación farmacéutica.

La preparación de proporciones convenientes de medicamentos que contienen CBD, CBDV, CBDA y CBDVA se hace posible mediante el cultivo de quimiovars específicas de cannabis. Estas quimiovars (plantas que se distinguen por los cannabinoides producidos, en lugar de las características morfológicas de la planta) se pueden criar mediante una variedad de técnicas de mejora vegetal que serán familiares para un experto en el arte. Los métodos apropiados se proporcionan en el ejemplo 3. La propagación de las plantas mediante esquejes para el material de producción asegura que el genotipo sea fijo y que cada cultivo de plantas contenga los cannabinoides en una proporción sustancialmente igual.

De manera horticultora, es conveniente cultivar quimiovars que producen, por ejemplo, CBD y CBDV como el cannabinoide predominante a partir de esquejes. Esto asegura que el genotipo en cada cultivo sea idéntico y que la formulación cualitativa (la proporción de cada cannabinoide en la biomasa) sea la misma. A partir de estos quimiovars, los extractos se pueden preparar por el método de extracción similar. Los métodos convenientes para preparar extractos primarios incluyen la maceración, la percolación, la extracción con solventes tales como los alcoholes C1 a C5 (etanol), Norflurane (HFA134a), HFA227 y dióxido de carbono líquido bajo presión. El extracto primario se puede purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante extracción supercrítica o subcrítica, vaporización y cromatografía. Cuando se usan solventes tales como los que se enumeran anteriormente, el extracto resultante contiene material soluble en lípidos no específico. Esto se puede eliminar mediante una variedad de procedimientos que incluyen enfriamiento a -20 °C seguido de filtración para eliminar el lastre céreo, extracción con dióxido de carbono líquido y por destilación. Los métodos preferidos de cultivo de plantas y preparación de extractos se muestran en los ejemplos. El extracto resultante es apropiado para su incorporación en preparaciones farmacéuticas.

Un examen detallado de las diferencias farmacológicas entre el CBD y el THC ha revelado diferencias significativas en estos compuestos y, en consecuencia, el descubrimiento de que el CBD y/o su CBDA ácido parecen ser responsables de los efectos terapéuticos observados fue sorprendente. El THC está unido con alta avidéz a los receptores de CB1 y CB2 en la corteza cerebral y otros sitios; el CBD es relativamente inactivo contra los receptores CB1 y parece tener acciones farmacológicas de los receptores no cannabinoides en el sistema nervioso central. Sin perjuicio de las enseñanzas de la invención, es posible que el efecto antiemético del CBD y/o su CBDA ácido esté mediado a través de un mecanismo no cannabinérgico.

La tabla 1 a continuación ilustra algunas de las diferencias entre estos cannabinoides.

Tabla 1:

Efecto	THC	THCV	CBD	CBDV	Referencia
CB ₁ (Receptores cerebrales)	++		±		Pertwee et al, 1998
CB ₂ (Receptores periféricos)	+		-		
Efectos del CNS					
Anticonvulsivo †	--		++		Carlini et al, 1973
Antimetrazol	-		-		GW Data
Anti-electroshock	-		++		GW data
Relajante muscular	--		++		Petro, 1980
Antinociceptivo	++		+		GW data
Catalepsia	++		++		GW data
Psicoactivo	++		-		GW data
Antipsicótico	-		++		Zuardi et al, 1991
Actividad antioxidante neuroprotectora *	+		++		Hampson A J et al, 1998
Antiemético	++		-		

ES 2 736 533 T3

Efecto	THC	THCV	CBD	CBDV	Referencia
Sedación (reducida actividad espontanea)	+		+		Zuardi et al, 1991 GW data
Estimulación del apetito	++				
Supresión del apetito			++		
Ansiolítico	-		++		
Efectos cardiovasculares					Smiley et al, 1976 Adams et al, 1977 Brown, 1998
Bradycardia	-		+		
Taquicardia	+		-		
Hipertensión §	+		-		
Hipotensión §	-		+		
Antiinflamatorio	±		±		
Actividad inmunomoduladora/antiinflamatoria					GW data GW data GW data
Prueba de edema en la pata cruda	-		++		
Cox 1					
Cox 2					
Antagonismo TNF α	+	+	++	++	
Glaucoma	++		+		
<p>* El efecto es independiente del receptor CB1.</p> <p>† THC es pro convulsivo</p> <p>§ El THC tiene un efecto bifásico en la presión arterial; en pacientes ingenuos puede producir hipotensión postural y también se ha informado que produce hipertensión en el uso prolongado.</p> <p>Informe interno de GW No 002/000159.</p>					

Aunque se sabe que el THC se puede se usa para controlar las náuseas y los vómitos antes de la operación, el efecto de otros cannabinoides o combinaciones o el efecto de las formas ácidas presentes en, por ejemplo, extractos de plantas no se conocía hasta ahora.

- 5 Los solicitantes estudiaron el efecto de otros cannabinoides como extractos de cannabis, y particularmente extractos que contienen predominantemente CBD o su forma ácida CBDA en *Suncus murinus* y en los que se puede inducir una respuesta emética mediante un estímulo de movimiento. Los compuestos que son efectivos en esta prueba tienen un beneficio terapéutico en el tratamiento de náuseas y vómitos inducidos por el movimiento, y también estas condiciones cuando son inducidas por otras vías en los sistemas nervioso central y periférico.
- 10 El solicitante ha determinado que, por ejemplo, extractos en los que el contenido de CBD y/o CBDA es de 2-20% p/p, y el contenido de THC y/o THCA es de 0.1 a 2% p/p son particularmente beneficioso.

La invención se ilustra adicionalmente con referencia a las figuras y ejemplos que se acompañan:

La figura 1 es una TLC del extracto metanólico del quimiovar G5 con alto contenido en CBD (M16). Muestra picos significativos de CBD y CBDA en alrededor de 6 y 7 minutos y cantidades menores de THC y THCA en alrededor de 10 y 18 minutos.

5 La figura 2 es la TLC, el extracto metanólico del quimiovar G2 de alto contenido de THC (M6). Muestra picos significativos de THC y THCA en alrededor de 10 y 18 minutos, junto con cantidades menores de CBD y CBDA en alrededor de 6 y 7 minutos. Las figuras mostradas en las figuras 1 y 2 son cuantitativas.

10 La figura 3 es una placa de cromatografía de capa fina que muestra los extractos metanólicos y, a modo de comparación, BDS (descarboxilado y extraído por CO₂ líquido subcrítico). Los resultados confirman que los extractos metanólicos comprenden una alta proporción de los cannabinoides respectivos THC y CBD en lo que luego se demostró que son sus formas ácidas.

La figura 4 ilustra los resultados obtenidos para G5, siendo la traza superior para el BDS (descarboxilado y extraído por CO₂ líquido subcrítico) y la traza más baja para el extracto metanólico. Se marcan el pico de CBD a los 35 minutos y el pico de THC a los 38 minutos.

15 La figura 5 ilustra los resultados obtenidos para G2, siendo la traza superior para el BDS (descarboxilado y extraído por CO₂ líquido subcrítico) y la traza más baja para el extracto metanólico. Se marcan el pico de CBD a los 35 minutos y el pico de THC a los 37 minutos.

Ejemplo 1:

20 Los extractos de cannabis se pueden preparar mediante una serie de técnicas de extracción con solventes, incluido el uso de solventes orgánicos solos o en mezcla con agua y en condiciones subcríticas o supercríticas. Los cannabinoides pueden estar presentes en la biomasa del cannabis como cannabinoides libres y como los precursores ácidos correspondientes. Los métodos convencionales de preparación implican la extracción total de cannabinoides libres y precursores con solventes tales como alcoholes de alquilo inferior, particularmente metanol. En este ejemplo, los extractos totales de un THC alto y un quimiovar que contiene un alto contenido de CBD se hicieron con metanol.

25 La biomasa de cada quimiovar se extrajo por separado en una columna con metanol a temperatura ambiente, y se recogió el percolato agrupado. El solvente se eliminó por evaporación en un evaporador rotatorio a una temperatura que no excede los 43 °C. Los extractos de THC alto y CBD alto resultantes se dispersaron en Polisorbato 80 al 5%/solución salina normal y se usó un vehículo de Polisorbato/solución salina como control. El extracto de THC alto (M6) contenía más del 10% de THC y/o THCA y menos del 1% de CBD y/o CBDA. El extracto de CBD alto (M16) contenía más del 7.3% de CBD y/o CBDA y menos del 2% de THC y/o THCA.

30 Un análisis preliminar por HPLC de los extractos metanólicos (y datos comparativos para una sustancia farmacéutica botánica (BDS), cuando se preparan mediante extracción con CO₂ subcrítico después de la descarboxilación) se presenta en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2.

Extracto /Analito	Extracto metanólico de un quimiovar rico en CBD % p/p	Comparativo de extracto CO ₂ descarboxilado de quimiovar rico en THC % p/p	Comparativo de extracto CO ₂ descarboxilado de quimiovar rico en CBD % p/p
THC	N.D.	64.2%	2.9%
THCA	1.4%	N.D.	N.D.
CBD	6.1%	1.1%	70.2%
CBDA	49.9%	N.D.	N.D.
CBN	N.D.	1.0%	N.D.

35 Como se esperaría, las formas ácidas del cannabinoide predominan en el extracto metanólico de la hierba no descarboxilada.

Para los extractos metanólicos, el % p/p del cannabinoide principal (suma de formas ácidas + neutras) es más bajo que el encontrado en el BDS equivalente. De nuevo, esto es de esperar debido a la menor selectividad del metanol,

en comparación con el CO₂ líquido. De este modo, la extracción metanólica da lugar a la extracción de más material no diana y una dilución del contenido activo del extracto.

El contenido del extracto metanólico se confirmó mediante análisis de TLC y las trazas del cromatograma para los extractos de THC alto y CBD se muestran en las figuras 1 y 2.

- 5 Las trazas en las figuras 1 y 2 indican que la forma ácida del cannabinoide es el componente principal observado, y también se detectan pequeñas cantidades del cannabinoide neutro correspondiente.

Las muestras de los extractos metanólicos se procesaron en una placa de TLC junto con algunos marcadores de cannabinoides y, a modo de comparación, la sustancia farmacológica botánica (BDS) (descarboxilada y extraída por CO₂ líquido subcrítico). Los resultados se ilustran en la figura 3.

- 10 Un análisis adicional de los extractos metanólicos, y a modo de comparación el BDS (descarboxilado y extraído por CO₂ líquido subcrítico), usando cromatografía de gases indica la presencia de terpenos alrededor de la marca de 14 a 18 minutos. Se debe tener en cuenta que debido a que la G.C se opera a alrededor de 250 °C, cualquier forma ácida del CBD y el THC presente en los extractos se descarboxila y aparece en la traza como CBD o THC. Los resultados se ilustran en las figuras 4 y 5.

- 15 La diferencia más significativa entre las trazas inferiores de las figuras 4 y 5 es la diferencia entre los picos de THC y CBD.

Ejemplo 2:

- 20 Se inyectaron *Suncus murinus* adultos (30-89 g de peso corporal) de ambos sexos con ya sea G2 (M6) o G5 (M16) en un intervalo de dosis desde 1.0, 2.0 o 4.0 mg/kg (o vehículo), intraperitonealmente, 30 minutos antes de un estímulo de movimiento (1 Hz 40 mm de amplitud de agitación durante 10 minutos). Los animales fueron observados por cualquier cambio de comportamiento manifiesto. Se registraron una serie de episodios eméticos y la latencia de inicio. Los datos se expresaron como la media ± s.e.m., tamaño del grupo n = 6 y se analizaron estadísticamente usando ANOVA, seguido de la prueba T de Bonferroni Dunnett. Los resultados se resumen en la tabla 3 a continuación.

- 25 Tabla 3: Efecto de los extractos de cannabis administrados por vía intraperitoneal en la frecuencia de la latencia a la primera emesis (media ± s.e.m.)

Tratamiento	Dosis mg/kg	Episodios eméticos, media ± s.e.m.			
		Latencia (segundos)	Valor P	Número	Valor P
Control de vehículo		103.0 + 25.3		12.4 + 2.4	
M16 quimiovar alto CBD	1.0	206.8 ± 33.9	<0.05	6.3 ± 1.4	<0.05
	2.0	250.5 ± 84.5	<0.05	6.6 ± 2.4	<0.05
	4.0	Aumento	N5	Aumento	N5
M6 quimiovar alto THC	1.0	† NDDC		NDDC	
	2.0	NDDC		NDDC	
	4.0*	<100		>18	<0.05

† NDDC no hay diferencia detectable del control
* Aumento del vómito, reducción de la latencia

- 30 Los resultados para el extracto de quimiovar que produce CBD alto (M16) que se muestra en la tabla 3 no son diferentes a las curvas de respuesta a la dosis en forma de U señaladas por algunas otras acciones farmacológicas de los cannabinoides.

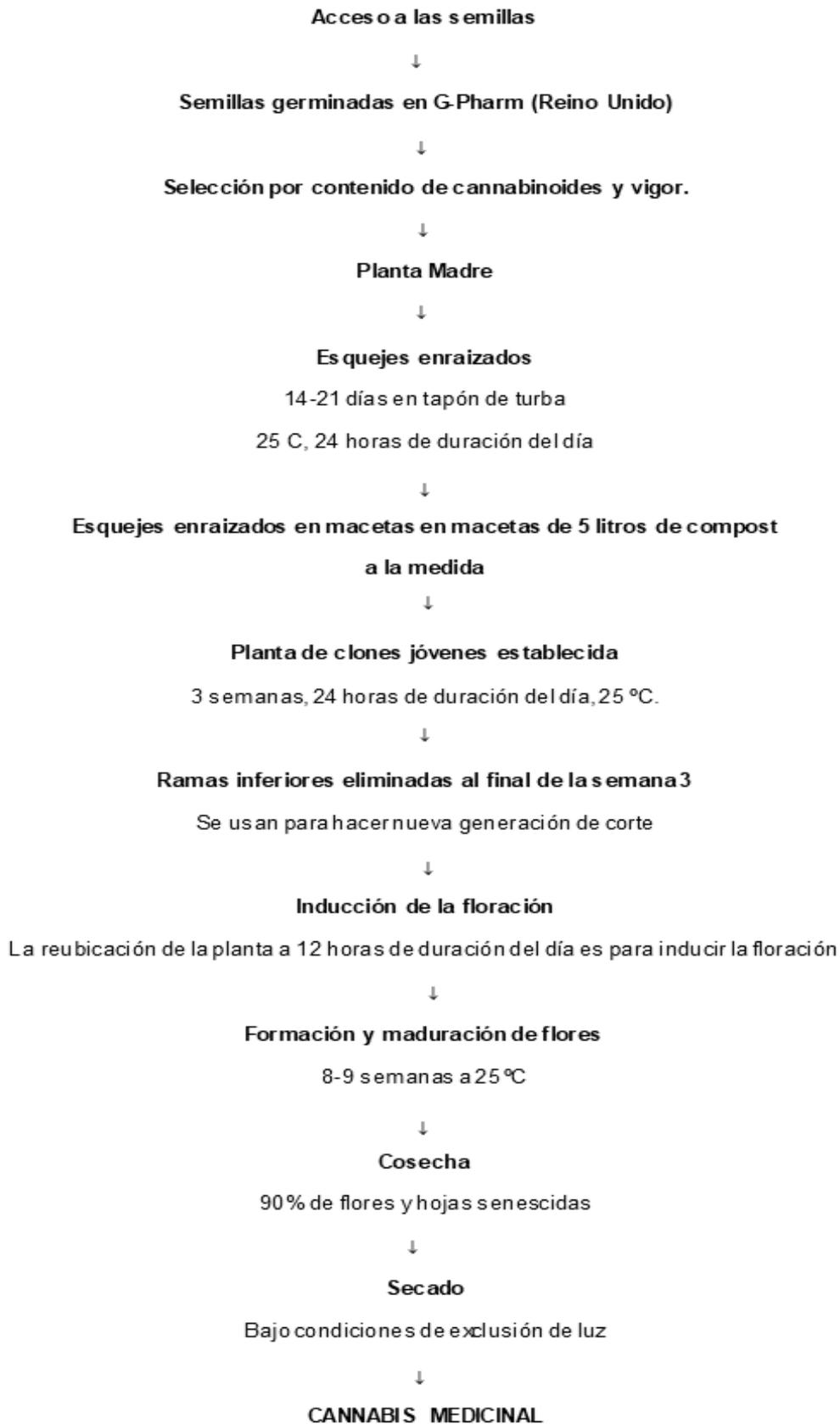
La falta de efecto del extracto de quimiovar que produce THC alto en este sistema de prueba es sorprendente. De hecho, en dosis altas parece haber un aumento en los vómitos y una reducción en la latencia. Se confirmó que ni M6 ni M16 tenían actividad emética por derecho propio. Estos datos enfatizan aún más las diferencias observadas en los efectos farmacológicos de THC y CBD, que han sido investigados por el solicitante.

Ejemplo 3 Cultivo de cannabis medicinal

Las plantas se cultivan como clones a partir de semillas germinadas, bajo vidrio a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$, durante 3 semanas a la luz del día 24 horas; esto mantiene a las plantas en un estado vegetativo. La floración es inducida por la exposición a 12 horas de duración del día durante 8-9 semanas.

- 5 No se usan pesticidas, herbicidas, insecticidas o fumigantes artificiales. Las plantas se cultivan orgánicamente, con control biológico de plagas de insectos.

Las etapas esenciales en la producción desde el acceso de semillas hasta el cannabis medicinal seco se resumen a continuación:



Ejemplo 4 Determinación del contenido de cannabinoides en plantas y extractos
Identidad por TLC

a) Materiales y métodos.

Dispositivo de aplicación de equipo capaz de suministrar un volumen de solución controlado con precisión, esto es, una pipeta capilar de 1 µl o una jeringa de microlitro.

Depósito de revelado TLC con tapa

5 Soplador de aire caliente

Placas de TLC de gel de sílice G (SIL N-HR/UV254), capa de 200 µm con indicador fluorescente sobre soporte de poliéster.

Depósito de inmersión para reactivo de visualización.

Fase móvil 80% de éter de petróleo 60: 80/20% de éter dietílico.

10 Reactivo de visualización 0.1% p/v de Fast Blue B acuoso (100 mg en 100 ml de agua desionizada). Un método opcional es escanear a UV 254 y 365 nm.

b) Preparación de la muestra.

i) Materia prima de hierbas

15 Se pesan aproximadamente 200 mg de cannabis seco molido finamente en un matraz volumétrico de 10 ml. Se lleva a volumen con solvente de extracción, metanol: cloroformo (9:1).

Se extrae con ultrasonido durante 15 minutos. Se decanta el sobrenadante y se usa directamente para cromatografía.

ii) Extracto del fármaco de hierbas

20 Se pesan aproximadamente 50 mg de extracto en un matraz volumétrico de 25 ml. Se lleva a volumen usando solvente de metanol. Se agita vigorosamente para disolver y luego se usa directamente para cromatografía.

c) Patrones

0.1 mg/ml de delta-9-THC en metanol.

0.1 mg/ml de CBD en metanol.

25 Las soluciones de patrones se almacenan congeladas a -20°C entre usos y se usan hasta 12 meses después de la preparación inicial.

d) Soluciones de prueba y método.

Se aplican a puntos separados por un mínimo de 10 mm.

i) ya sea 5 µl de extracto de hierba o 1 µl de solución de extracto de hierbas según corresponda,

ii) 10 µl de 0.1 mg/ml de delta-9-THC en solución patrón de metanol,

30 iii) 10 µl de 0.1 mg/ml de CBD en solución patrón de metanol.

Se eluye la placa de TLC a una distancia de 8 cm, luego se retira la placa. Se permite que el solvente se evapore de la placa y luego se repite la elución por segunda vez (doble desarrollo).

35 La placa se sumerge brevemente en el reactivo Fast Blue B hasta que comienza a desarrollarse el color característico/naranja de los cannabinoides. La placa se retira y se deja secar en condiciones ambientales en la oscuridad.

Un registro permanente del resultado se realiza ya sea mediante la reproducción de la imagen mediante un escáner digital (opción preferida) o anotando las posiciones de las manchas y los colores en un papel de calco.

Ensayo de THC, THCA, CBD, CBDA y CBN por HPLC

a) Materiales y métodos.

Equipo: HPLC HP 1100 con detector de matriz de diodos e inyector automático. El equipo se configura y opera según los procedimientos operativos estándar internos (SOPIab037)

ES 2 736 533 T3

Columna de HPLC	Discovery C8 de 5 µm, 15x 0.46 cm, más precolumna Kingsorb ODS2 5 µm 3 x 0.46 cm.
Fase móvil	Acetonitrilo:metanol: ácido acético acuoso al 0.25% (16: 7: 6 en volumen)
Temperatura de funcionamiento de la columna	25 °C
Velocidad de flujo	1.0 ml/min
Volumen de inyección	10 µl
Tiempo de ejecución	25 min
Detección	Cannabinoides neutros y ácidos 220nm (ancho de banda 16nm) Longitud de onda de referencia 400nm/ancho de banda 16nm Ranura 4nm Los cannabinoides ácidos se monitorean de forma rutinaria a 310nm (ancho de banda 16nm) solo con fines de identificación cualitativos y de confirmación.
Captura de datos	HP Chemstation con software versión A7.01

b) Preparación de la muestra.

Aproximadamente 40 mg de extracto medicinal a base de cannabis se disuelven en 25 ml de metanol y esta solución se diluye de 1 a 10 en metanol. Esta dilución se usa para cromatografía.

- 5 Se tomaron muestras de 0.5 ml de la solución de relleno, contenida dentro de la unidad Pump Action Sublingual Spray, mediante una pipeta de vidrio. La solución se diluye en un matraz de 25 ml y se lleva a la marca con metanol. 200 µl de esta solución se diluyen con 800 µl de metanol.

- 10 Las muestras de hierba o resina se preparan tomando una muestra de 100 mg y tratándola con 5 o 10 ml de metanol/cloroformo (9/1 p/v). La dispersión se somete a ultrasonido en un tubo sellado durante 10 minutos, se deja enfriar y se centrifuga una parte alícuota y se diluye adecuadamente con metanol antes de la cromatografía.

c) Patrones

Se usa la estandarización externa para este método. La dilución de los patrones de reserva de THC, CBD y CBN en metanol o etanol se hace para proporcionar patrones de trabajo finales de aproximadamente con precisión 0.1 mg/ml. Los patrones de trabajo se almacenan a -20°C y se usan hasta 12 meses después de la preparación inicial.

- 15 La inyección de cada patrón se realiza por triplicado antes de la inyección de cualquier solución de prueba. A intervalos apropiados durante el procesamiento de las soluciones de prueba, se realizan inyecciones repetidas de patrones. En ausencia de patrones confiables de CBDA y THCA, estos compuestos se analizan usando respectivamente los factores de respuesta patrones de CBD y THC.

- 20 La orden de elución se ha determinado como CBD, CBDA, CBN, THC y THCA. Otros cannabinoides se detectan con este método y se pueden identificar y determinar según sea necesario.

d) Soluciones de prueba

Las soluciones de prueba diluidas se preparan en metanol y deben contener analitos en el intervalo de trabajo lineal de 0.02-0.2 mg/ml.

e) Criterios de aceptación de la cromatografía:

- 25 Los siguientes criterios de aceptación se aplican a los resultados de cada secuencia, ya que se ha encontrado que dan como resultado una resolución apropiada de todos los analitos (incluidos los dos analitos que más cerca eluyen el CBD y el CBDA)

i) Ventanas de tiempo de retención para cada analito:

- 30 CBD 5.4-5.9 minutos
CBN 7.9-8.7 minutos

THC 9.6-10.6 minutos

ii) Forma del pico (factor de simetría según el método de BP)

CDB <1.30

CBN <1.25

5 THC <1.35

iii) Se han desarrollado una serie de modificaciones al método estándar para tratar con aquellas muestras que contienen picos de impurezas de elución tardía, por ejemplo, el método CBD2A extiende el tiempo de ejecución a 50 minutos. Todas las soluciones deben aclararse por centrifugación antes de ser transferidas a viales de inyector automático sellados con sello y tapón de septo con cara de teflón.

10 iv) La precolumna es crítica para la calidad de la cromatografía y se debe cambiar cuando la contrapresión aumenta por encima de los 71 bar y/o los criterios de aceptación con respecto al tiempo de retención y la resolución, caen fuera de los límites especificados.

f) Procesamiento de datos

15 Los cannabinoides se pueden subdividir en neutros y ácidos; la identificación cualitativa se puede realizar usando el modo de longitud de onda dual DAD. Los cannabinoides ácidos absorben fuertemente en la región de 220nm-310nm. Los cannabinoides neutros solo absorben fuertemente en la región de 220 nm.

De forma rutinaria, solo los datos registrados a 220 nm se usan para el análisis cuantitativo.

El DAD también se puede configurar para tomar exploraciones espectrales de UV de cada pico, que luego se pueden almacenar en una biblioteca espectral y usar con fines de identificación.

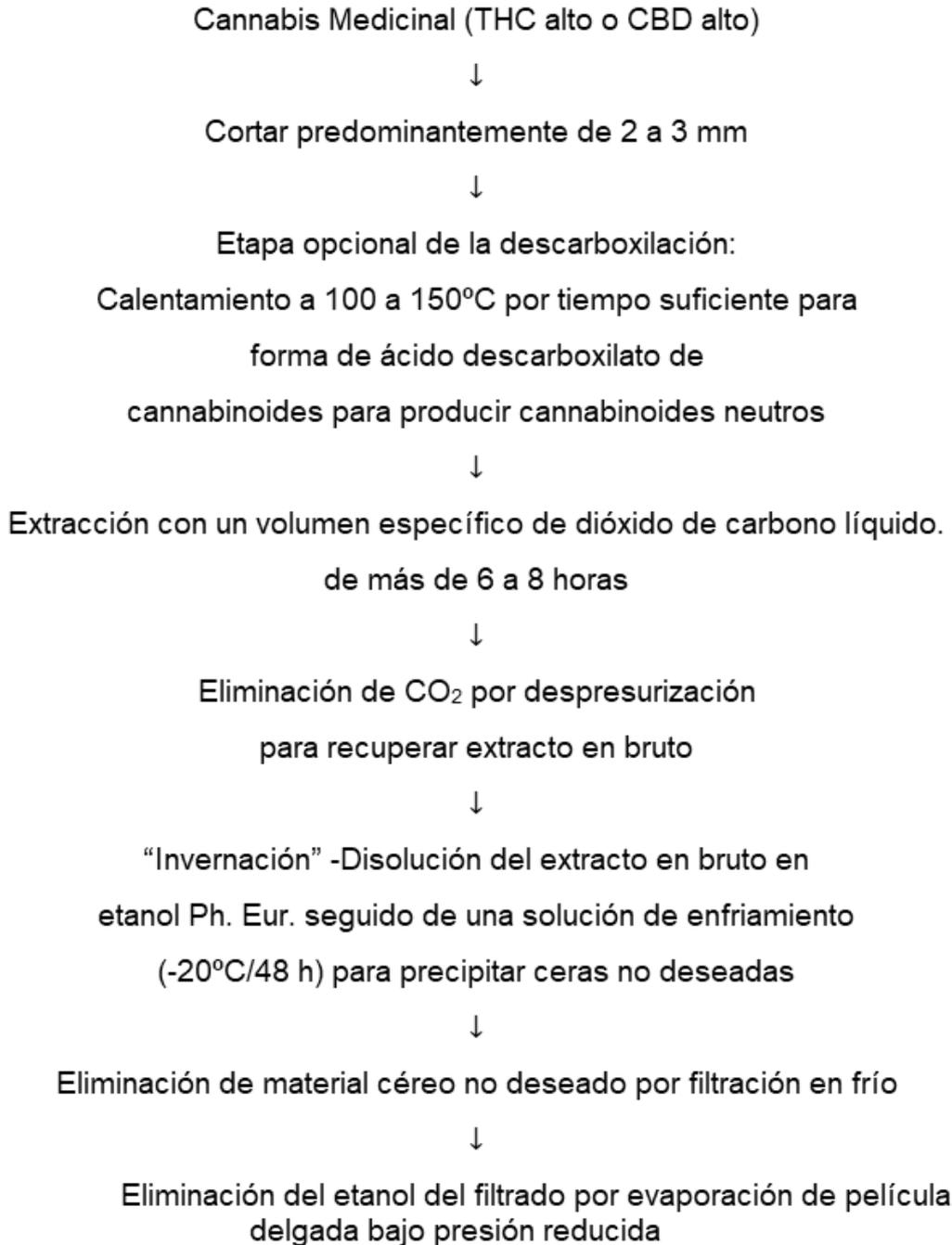
20 El procesamiento de datos para la cuantificación usa un software de procesamiento por lotes en la Hewlett Packard Chemstation.

a) Cromatogramas de muestra

Los cromatogramas de muestra de HPLC para extractos de fármacos de hierbas de THC y CBD se proporcionan en las figuras adjuntas.

25 Ejemplo 5 Preparación del extracto de fármaco a base de hierbas

A continuación, se muestra un diagrama de flujo que muestra el procedimiento de fabricación de extractos de los quimiovarios de alto contenido en THC y alto contenido de CBD (formas ácidas y no ácidas):



Ejemplo 6

5 El cannabis con alto contenido de CBD se cultivó bajo vidrio a una temperatura media de 21 + 2°C, HR 50-60%. La hierba se recolectó y se secó a temperatura ambiente a una HR de 40-45% en la oscuridad. Cuando se secaron, la hoja y la cabeza de la flor se quitaron del tallo y esta biomasa seca se conoce como "cannabis medicinal".

10 El cannabis medicinal se redujo a un polvo grueso (partículas que pasan a través de una malla de 3 mm) y se empacó en la cámara de un extractor de fluido supercrítico. La densidad de empaquetamiento fue de 0.3 y se pasó dióxido de carbono líquido a una presión de 600 bar a través de la masa a una temperatura de 35 °C. La extracción supercrítica se lleva a cabo durante 4 horas y el extracto se recuperó mediante descompresión gradual en un recipiente de recogida. El extracto resinoso aceitoso de color verde-marrón resultante se purifica adicionalmente. Cuando se disolvió en etanol BP (2 partes) y se sometió a una temperatura de -20 °C, durante 24 horas, se eliminó un depósito (que consistía en material céreo, soluble en grasa) y se eliminó por filtración. El solvente se eliminó a baja presión en un evaporador rotatorio. El extracto resultante es un extracto suave que contiene aproximadamente

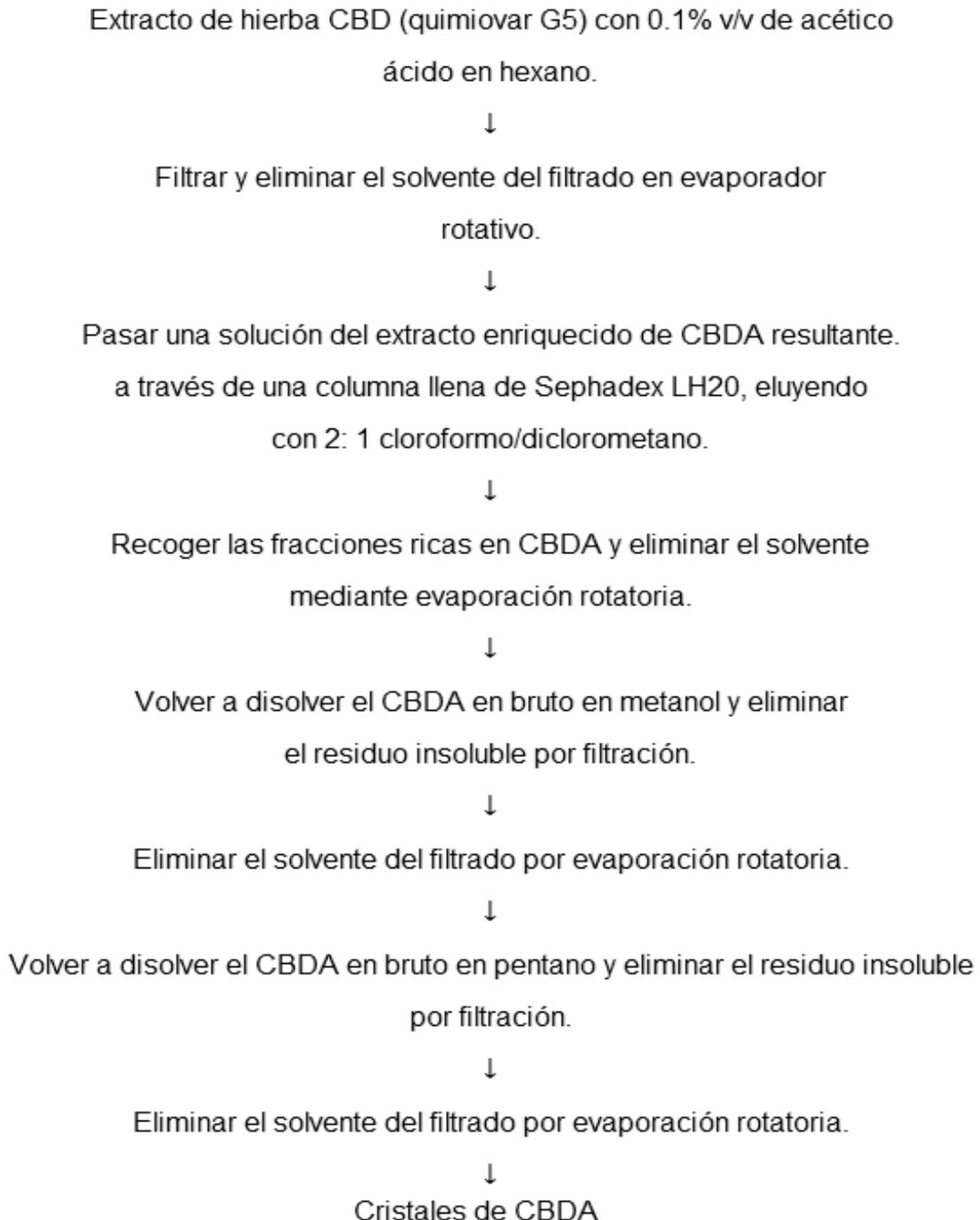
60% de CBD con hasta 4% de tetrahidrocannabinol, dentro de un total de otros cannabinoides del 6%. Los extractos se realizaron usando los quimiovars de THCV y CBDV usando el método general descrito anteriormente.

5 Un quimiovar de THC alto se trató de manera similar y produjo un extracto que contenía aproximadamente 60% de THC y aproximadamente 6% de otros cannabinoides, de los cuales 1-2% es cannabidiol y el resto son cannabinoides menores, incluido el cannabinol. El rendimiento cuantitativo fue del 9% p/p basado en el peso del cannabis medicinal seco.

Una persona experta en el arte apreciará que se pueden usar otras combinaciones de temperatura y presión (en el intervalo de + 10°C a 35°C y 60 - 600 bar) para preparar extractos en condiciones supercríticas y subcríticas.

Ejemplo 7-Preparación de CBDA

10 Resumen del procedimiento:



Rendimiento:

100 g de quimiovar G5 producen aproximadamente 5 g de CBDA purificado.

Características:

Sólido cristalino de color amarillo pálido.

5 Punto de fusión = 45-48°C

Pureza cromatográfica = 94% de CBDA por normalización de área

* CBD 3%.

THCA no detectado, esto es, <0.1%

THC no detectado, esto es, <0.1%

10 El material se descarboxila lentamente en solución.



* Como el CBDA no se eluye con el CBD durante el procesamiento del extracto en el método de cromatografía en columna de baja presión empleado, es probable que el CBD detectado se forme a partir de la descomposición del CBDA durante el procesamiento y análisis. Esta descarboxilación indeseable del material purificado podría minimizarse mediante la manipulación de CBDA a temperaturas subambientales.

15

Ejemplo 8-Purificación de CBD

Resumen del procedimiento

20 A partir de material vegetal recién cosechado, el procedimiento comprende seco y descarboxilación del material vegetal, tratamiento opcional (por ejemplo, molido) del material vegetal seco para reducir el tamaño de partícula (preferiblemente a menos de 2000 µm), extracción con dióxido de carbono líquido, precipitación etanólica para reducir la cantidad de material no diana, limpieza del extracto etanólico en bruto por paso a través de carbón activado, eliminación del solvente (etanol) para producir una fracción enriquecida con CBD y recristalización de CBD a partir de pentano.

Material vegetal

25 GW Pharma Ltd ha desarrollado distintas variedades de híbridos de plantas de cannabis para maximizar la producción de los componentes químicos específicos, los cannabinoides. Un quimiovar de "alto contenido de CBD" designado G5 produce > 90% del contenido total de cannabinoides como CBD (que ocurre naturalmente en la planta en forma de CBDA). Se pueden obtener variedades alternativas con "alto contenido de CBD" - véanse, por ejemplo, los fenotipos de cannabinoides comunes en 350 existencias de cannabis, Small and Beckstead, Lloydia vol 36b, 30 1973 p144-156- y criarlas usando técnicas bien conocidas para los expertos para maximizar el contenido de cannabinoides.

Solventes

Todos los solventes usados en el aislamiento y análisis de CBD (por ejemplo, n-pentano) fueron, a menos que se indique lo contrario, de cromatografía o grado A.R.

35 Patrones

Los materiales de referencia de Sigma se usaron como patrones en el análisis de extractos, productos intermedios y productos terminados, estos fueron: Δ⁹ THC en metanol BN 10601/B (aprox. 1 mg/ml) y CBD en metanol BN 10601/C (aprox. 1 mg/ml).

Preparación de un extracto que contiene cannabidiol.

40 Un extracto que contiene cannabidiol se prepara a partir de un quimiovar de cannabis "alto contenido de CBD" según el siguiente procedimiento:

Se prepara la solución etanólica de la sustancia farmacológica botánica de la siguiente manera:

Cosechar material vegetal de cannabis, secar, reducir el tamaño de partícula por molienda a menos de 2000 μm



material vegetal molido descarboxilado por calentamiento a aproximadamente 105 °C durante 15 minutos, seguido de aproximadamente 145 °C durante un mínimo de 55 minutos (el tiempo y la temperatura de descarboxilación NB pueden variar)



Extraer con dióxido de carbono líquido (CO_2) [de Grado Alimenticio] durante hasta 10 horas Condiciones: aproximadamente 60 bar \pm de 10 bar de presión y 10°C \pm 5°C



Eliminación de CO_2 por despresurización para recuperar el extracto en bruto



"Invernación" -Disolución del extracto en bruto en etanol seguido de solución de enfriamiento (-20°C \pm 5°C/hasta 52 horas) para precipitar las ceras no deseadas



Eliminación de material céreo no deseado por filtración en frío (filtro de 20mm)



Solución etanólica de BDS
(Almacenada a -20°C \pm 5 °C)

5 La extracción usando CO_2 líquido se lleva a cabo en condiciones subcríticas a una temperatura de aproximadamente 10°C \pm 5°C usando una presión de aproximadamente 60 bar \pm 10bar. El material vegetal descarboxilado se empaqueta en una sola columna y se expone a CO_2 líquido bajo presión durante aproximadamente 8 horas, un flujo de masa de CO_2 de 1250 kg/h \pm 20%.

Después de la despresurización y la descarga del CO_2 , el extracto de BDS en bruto se recoge en recipientes sellados. El extracto en bruto de BDS se mantiene a -20 °C \pm 5°C.

El extracto en bruto de BDS contiene ceras y moléculas de cadena larga. La eliminación se realiza mediante "invernación", por lo que el extracto en bruto de BDS se calienta, por ejemplo, 40°C ± 4°C para licuar el material. El etanol se añade en una proporción de volumen de etanol 2: 1 a peso de extracto de BDS en bruto. La solución etanólica se enfría luego a -20°C ± 5°C y se mantiene a esta temperatura durante aproximadamente 48 horas.

- 5 Una vez completada la invernación, el precipitado se elimina por filtración en frío a través de un filtro de 20 µm, para dar una solución etanólica del BDS.

- 10 La limpieza preliminar de carbón se puede llevar a cabo pasando la solución etanólica de BDS (400-500 mg/ml) a través de una columna de plástico desechable (130 mm x 27 mm i.d) empacada con carbón activado (grado decolourcarb DCL GDC, de Sutcliffe Speakman Carbons, 15.4 g por unidad). Etanol absoluto B.P. (Hayman) se usa como solvente.

El etanol y algo de agua que pueda estar presente se eliminan mediante evaporación rotatoria o evaporación de película delgada a presión reducida (60°C ± 2°C, con vapor a 40°C ± 2°C/172 mbar y 72 mbar ± 4mbar) para producir un extracto rico en CBD.

Recristalización de solventes.

- 15 El extracto rico en CBD se vuelve a disolver en un solvente apropiado (por ejemplo, n-pentano) y se filtra para eliminar el material insoluble. Luego el solvente es eliminado, por ejemplo, por evaporación rotatoria, para producir CBD cristalino. Todas las etapas se llevan a cabo según los procedimientos estándar de laboratorio, como sería conocido para los expertos en el arte.

Características del producto

- 20 Rendimiento:

3 g de CBD BDS producen aproximadamente 1 g de CBD purificado.

Características:

Sólido cristalino de color blanco.

Pureza cromatográfica > 99% de CBD por normalización de área.

- 25 Pureza cromatográfica superior al patrón de CBD de Sigma disponible en el mercado (consulte las figuras 1 y 3).

No se detecta THC, esto es, < 0.1%.

No se detecta CBN, esto es, <0.1%

Identidad confirmada por HPLC, GC y comportamiento de retención de TLC en comparación con el patrón de CBD de Sigma.

- 30 Ensayo frente a ambos Sigma CBD estándar en el intervalo 98.0-102.0%

Punto de fusión = 64-66 °C (valor de la literatura = 66-67 °C).

Análisis de HPLC

La composición de los productos aislados se puede determinar mediante análisis de HPLC.

- 35 Un ensayo de HPLC típico para Δ⁹ THC, Δ⁹ THCA, CBD, CBDA y CBN se puede llevar a cabo de la siguiente manera:

a) Materiales y métodos.

Equipo de cromatografía y condiciones:

Equipo Agilent (HP) 1100 HPLC con detector de UV de longitud de onda variable o detector de matriz de diodos.

Columna HPLC Discovery C8 5µm 15cm x 0.46cm

Pre-Columna Kingsorb C18 5µm 3cm x 0.46cm

Fase móvil: Acetonitrilo: Metanol: 0.25% p/v de ácido acético (16: 7: 6 por volumen)

Temperatura de la 25 °C

columna

Velocidad de flujo 1.0ml min⁻¹

Detección 220nm 600mA f.s.d. Segunda longitud de onda 310 nm

Volumen de inyección 10 µl

Tiempo de ejecución 20-25 minutos (se puede extender para muestras que contienen una pequeña cantidad de picos de elución tardía)

Orden de elución CBD, CBDA, Δ⁹ THCV, CBN, Δ⁹ THC, CBC, Δ⁹ THCA

b) Preparación de la muestra.

5 Las muestras de cannabidiol "puro" se diluyen en metanol antes del análisis por HPLC. Las diluciones óptimas se pueden determinar empíricamente.

Las muestras de cannabis de hierbas se preparan tomando una muestra de 100 mg y tratándola con 5 o 10 ml de metanol/cloroformo (9/1 p/v). La dispersión se somete a ultrasonido en un tubo sellado durante 10 minutos, se deja enfriar y se centrifuga una parte alícuota y se diluye adecuadamente con metanol antes de la cromatografía.

c) Patrones

10 Las soluciones patrón almacenadas de CBD, CBN y Δ⁹ THC en metanol a aproximadamente 1 mg ml⁻¹ se almacenan a -20 °C. Los patrones de trabajo diluidos (0.1 mg/ml para Δ⁹ THC y CBD y 0.01 mg/ml para CBN) se preparan en metanol a partir de los patrones de reserva y se almacenan a -20 °C (período máximo de doce meses después de la preparación inicial). Después de la preparación, las soluciones patrón se deben dividir para reducir la cantidad de patrón expuesta a temperatura ambiente. Antes de su uso en un ensayo de muestra de HPLC, el número requerido de viales patrón se extrae y se deja equilibrar a temperatura ambiente.

15 La inyección de cada patrón se realiza por triplicado antes de la inyección de cualquier solución de prueba. A intervalos apropiados durante el procesamiento de las soluciones de prueba, se realizan inyecciones repetidas de patrones. En ausencia de patrones confiables de CBDA y Δ⁹ THCA, estos compuestos se analizan usando respectivamente los factores de respuesta patrón de CBD y Δ⁹ THC.

20 d) Soluciones de prueba

Las soluciones de prueba diluidas se preparan en metanol y deben contener analitos en el intervalo de trabajo lineal de 0.02-0.2 mg/ml.

e) Criterios de aceptación de la cromatografía:

25 Los siguientes criterios de aceptación se aplican a los resultados de cada secuencia, ya que se ha encontrado que dan como resultado una resolución apropiada de todos los analitos (incluidos los dos analitos CBD y CBDA que eluyen más cerca)

Tabla 1- Ventanas de tiempo de retención y tiempo de retención relativo (RRT) a Δ⁹ THC para cada analito

Cannabinoide	Tiempo de retención (minutos)	RRT (THC)
CBD	5.1-5.8	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
Δ ⁹ THCV	5.9-6.2	0.645
CBC	11.6-12.8	1.30
Δ ⁹ THCA	14.6-16.0	1.605

Tabla 2- Forma de pico (factor de simetría según el método de la Farmacopea británica)

Cannabinoides	Factor de simetría
CBD	<1.30
CBN	<1.25
Δ^9 THC	<1.35

f) Procesamiento de datos

- 5 Los cannabinoides se pueden subdividir en neutros y ácidos - la identificación cualitativa se puede realizar usando el modo de longitud de onda dual DAD. Los cannabinoides ácidos absorben fuertemente en la región de 220nm-310nm. Los cannabinoides neutros solo absorben fuertemente en la región de 220 nm.

De forma rutinaria, solo los datos registrados a 220 nm se usan para el análisis cuantitativo.

- 10 El DAD también se puede configurar para tomar exploraciones espectrales de UV de cada pico, que luego se pueden almacenar en una biblioteca espectral y usar con fines de identificación.

El procesamiento de datos para la cuantificación usa un software de procesamiento por lotes en la Hewlett Packard Chemstation.

g) cálculo:

- 15 La pureza cromatográfica de las muestras de cannabinoides se calcula como un % del contenido total de cannabinoides mediante la normalización del área.

Análisis de cromatografía de gases capilares (GC)

a) Equipo y condiciones de cromatografía.

Equipo	Sistema Agilent (HP) 5890 o 6890 GLC con inyector automático HP7673 y detector FID
Columna GLC	SE54 (EC5) 30m x 0.32 mm i.d. (Alltech) espesor de la fase 0.25 μ m
Velocidad de flujo	Presión constante (10.3 psi). Velocidad de flujo inicial normal 34 cm seg ⁻¹ (2.0 ml min ⁻¹)
Horno de columna	70°C inicialmente luego rampa 5°C min ⁻¹ a 250 °C. Mantener a 250°C, durante 15 minutos.
Temperatura del inyector	250°C
Temperatura del detector	325°C
Inyección Vol.	1 μ l, proporción de división 2.5: 1
Tiempo de ejecución	45 minutos
Gases de combustible	Hidrógeno 40 ml min ⁻¹ Aire 450 ml min ⁻¹ Helio 45 ml min ⁻¹

b) Preparación de patrón.

- 20 Las soluciones patrón almacenadas de CBD, CBN y Δ^9 THC en metanol a aproximadamente 1 mg ml⁻¹ se almacenan a -20°C. Los patrones de trabajo diluidos (0.1 mg/ml para Δ^9 THC y CBD y 0.01 mg/ml para CBN) se preparan en metanol a partir de los patrones de reserva y se almacenan a -20°C (período máximo de doce meses

después de la preparación inicial). Se permite que una parte alícuota pipeteada en un vial de inyector automático se equilibre a temperatura ambiente antes de se use en un ensayo de GC.

c) Preparación de la muestra.

5 Las muestras de productos finales, esto es, cannabidiol "puro", se diluyen en metanol antes del análisis por HPLC. Las diluciones óptimas se pueden determinar empíricamente.

Las muestras de material vegetal de cannabis se preparan tomando 100 mg de material seco troceado y tratándolo con 5 o 10 ml de metanol/cloroformo (9:1 v/v). Se extrae la muestra en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos y se deja reposar en la oscuridad durante 18 horas.

d) Procedimiento de cromatografía.

10 Las soluciones patrón se usan para proporcionar datos cuantitativos y de tiempo de retención. Estos se pueden inyectar por lo general por triplicado antes de la inyección de cualquier solución de muestra y luego individualmente a intervalos apropiados durante la ejecución, con un máximo de 10 muestras de prueba entre patrones.

Tabla 3-Tiempos de retención

THCV	33.7-34.5 minutos
CDB	35.6-36.3 minutos
Δ^9 THC	37.2-38.1 minutos
CBN	38.5-39.1 minutos

15 Análisis de TLC

La composición cualitativa de los productos finales y materiales de partida también se puede controlar mediante TLC.

20 La TLC usa tanto el tiempo de retención como el color de mancha característico para identificar de manera efectiva los componentes cannabinoides/ácidos cannabinoides en una mezcla compleja. Las soluciones metanólicas de los productos finales y el material de partida, más los patrones, se preparan para TLC. Se coloca una alícuota en una placa de TLC, junto con muestras de referencia apropiadas (por ejemplo, para al menos Δ^9 THC y CBD). Tras la exposición al reactivo Fast Blue B, el THC y el THCA se presentan como manchas rosadas, mientras que el CBD y el CBDA son de color naranja. Los neutrales se pueden distinguir de los ácidos por comparación del valor de Rf con el obtenido para los patrones. La identidad se confirma mediante la comparación de Rf y el color de la mancha de la muestra, con el obtenido para el patrón apropiado.

25 Un protocolo de TLC típico es el siguiente:

a) Materiales y métodos.

Equipo:

30 Dispositivo de aplicación capaz de entregar un volumen de solución controlado con precisión, esto es, una pipeta capilar de 1 μ l o una jeringa de microlitro.

Depósito de revelado TLC con tapa

Soplador de aire caliente

Placas de TLC con gel de sílice G (SIL N-HR/UV254), capa de 200 μ m con indicador fluorescente sobre soporte de poliéster.

35 Depósito de inmersión para reactivo de visualización.

Fase móvil 80% de éter de petróleo 60: 80/20% éter dietílico.

Reactivo de visualización 0.1% p/v de sal de Fast Blue B acuosa BN (Sigma Corp) (100 mg en 100 ml de agua desionizada). Un método opcional es escanear a UV 254 y 365 nm.

b) Preparación de la muestra.

i) Materia prima de hierbas

Se pesan aproximadamente 200 mg de cannabis seco molido finamente en un matraz aforado de 10 ml. Se lleva a volumen con solvente de extracción metanol: cloroformo (9: 1).

Se extrae con ultrasonido durante 15 minutos. Se decanta el sobrenadante y se usa directamente para cromatografía.

5 ii) productos finales

Los productos finales (CBD cristalino) se disuelven en metanol a una concentración apropiada (que se puede determinar empíricamente), luego se usan directamente para cromatografía. Todas las preparaciones de muestra deben producir una concentración final de aproximadamente 0.5 mg/ml.

iii) Sustancia farmacológica botánica.

10 Se pesan con precisión aproximadamente 50 mg de sustancia farmacológica botánica en un matraz volumétrico de 25 ml. Se disuelven para hacer volumen con metanol de grado HPLC.

c) Patrones

0.1 mg/ml de Δ^9 -THC en metanol (Sigma).

0.1 mg/ml de CBD en metanol (Sigma).

15 Las soluciones patrón se almacenan congeladas a -20°C entre usos y se usan hasta 12 meses después de la preparación inicial.

d) Soluciones de prueba y método.

Se aplican a puntos separados por un mínimo de 10 mm.

20 i) ya sea 5 μl de extracto de hierba o 1 μl de solución de extracto enriquecido/cannabinoide puro o 1 μl de eluato de columna diluido, según corresponda,

ii) 5 μl de 0.1 mg/ml de Δ^9 -THC en solución patrón de metanol,

iii) 5 μl de 0.1 mg/ml de CBD en solución patrón de metanol.

Se seca la placa preparada con un soplador de aire caliente.

Se coloca la base de la placa de TLC en un tanque de desarrollo que contenga la fase móvil y se sature con vapor.

25 Se eluye la placa de TLC a una distancia de 8 cm, luego se retira la placa. Se permite que el solvente se evapore de la placa y luego se repite la elución por segunda vez (doble desarrollo). Se retira la placa y se deja que se seque al aire.

La placa completa se sumerge brevemente en el reactivo Fast Blue B hasta que comienza a desarrollarse el color rojo/naranja característico de los cannabinoides. La placa se retira y se deja secar en condiciones ambientales en la oscuridad.

30

Los cannabinoides darán un color naranja-púrpura:

Cannabidiol	CBD de color naranja (ejecución más rápida)
Δ^9 Tetrahidrocannabinol	THC de color rosa
Cannabinol	CBN de color morado
Cannabichromene	CBC de color rosa púrpura
Cannabigerol	CBG de color naranja
Δ^9 tetrahidrocannabivarina	THCV de color púrpura

Los ácidos correspondientes forman rayas del mismo color que las manchas del componente neutro. Los ácidos corren a Rf bajo.

35

REIVINDICACIONES

1. Ácido cannabidiólico (CBDA) para uso en el tratamiento de náuseas, vómitos, emesis, mareo por movimiento o afecciones similares.
2. CBDA para uso según la reivindicación 1, en el que el CBDA es sintético.
- 5 3. CBDA para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el CBDA se administra como un sólido, semisólido, gel, líquido, pulverizador, aerosol, inhalador, vaporizador, enema o supositorio rectal.

FIG. 1 CROMATOGRAMA HPLC DE AC 1494
EXTRACTO METANÓLICO DE HIERBA G5

CROMATOGRAMA(S) ACTUAL(ES)

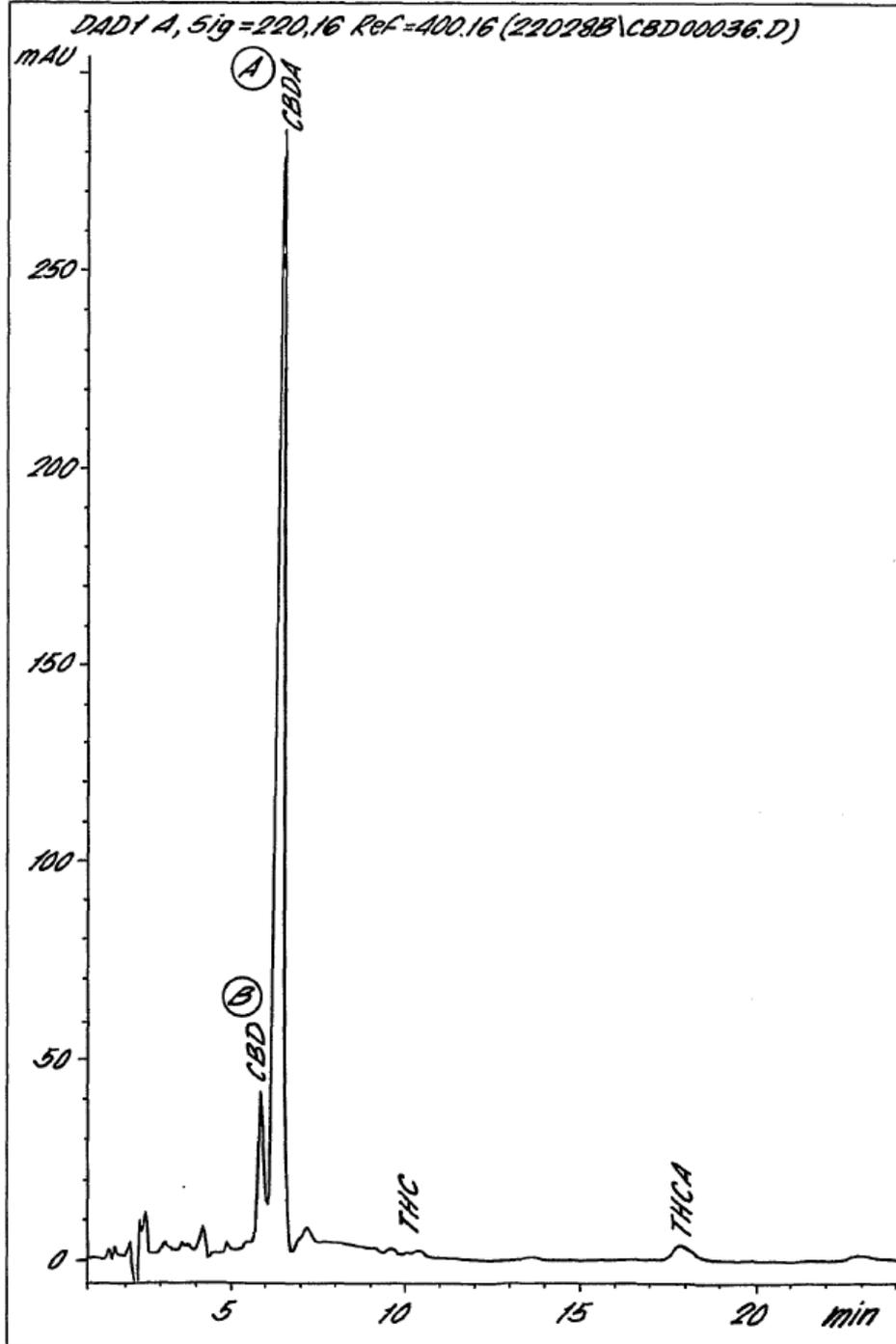


FIG. 2. CROMATOGRAMA HPLC DE AC1495
EXTRACTO METANÓLICO DE HIERBA G2

CROMATOGRAMA(S) ACTUAL(ES)

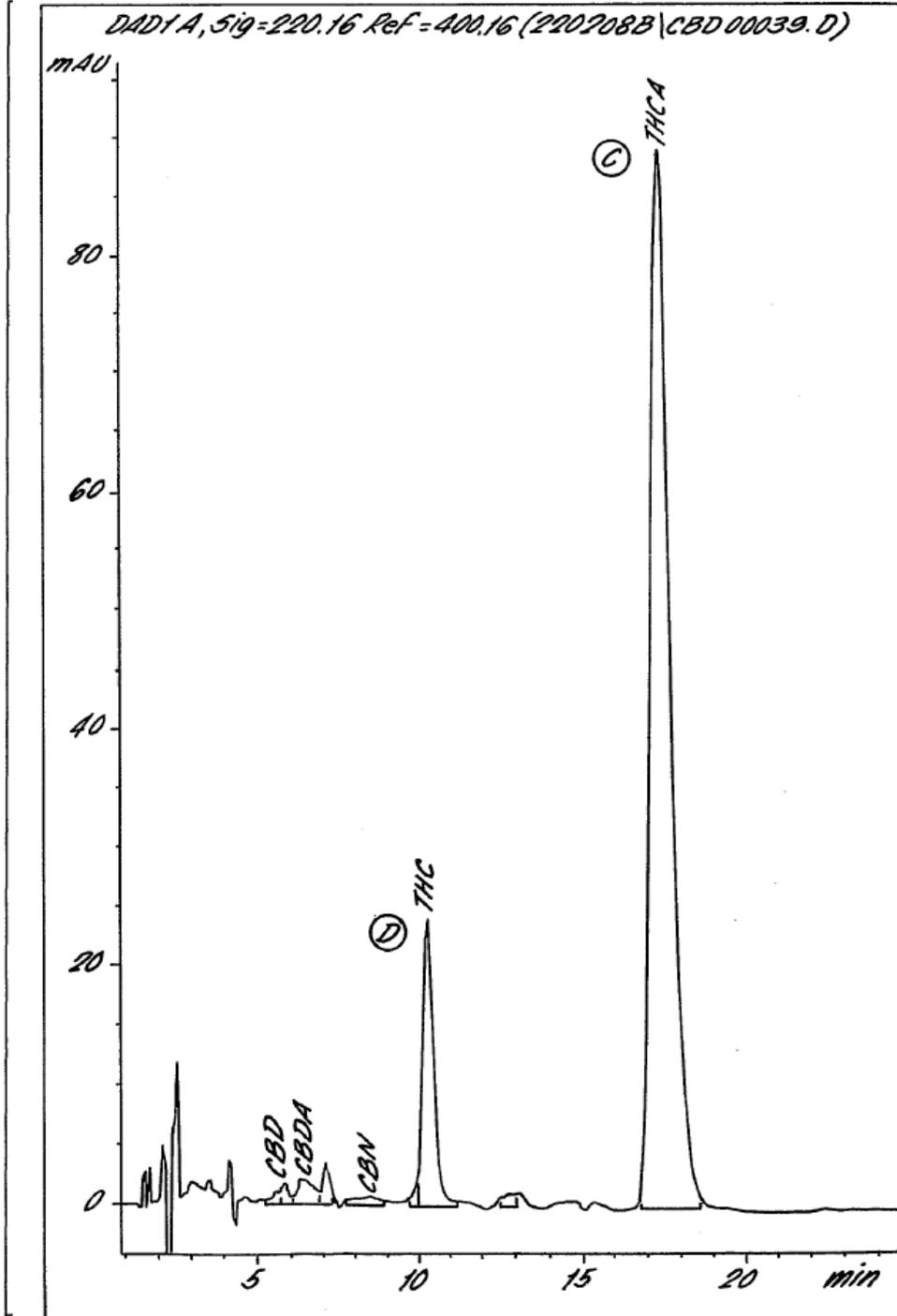


FIG. 3.

TLC DE COMPARACIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE HIERBA G2 (THC) Y HIERBA G5 (CBD) A EXTRACTOS LCO₂ DE QUIMIOVAR CORRESPONDIENTE es decir, BDS (THC) y BDS (CBD)

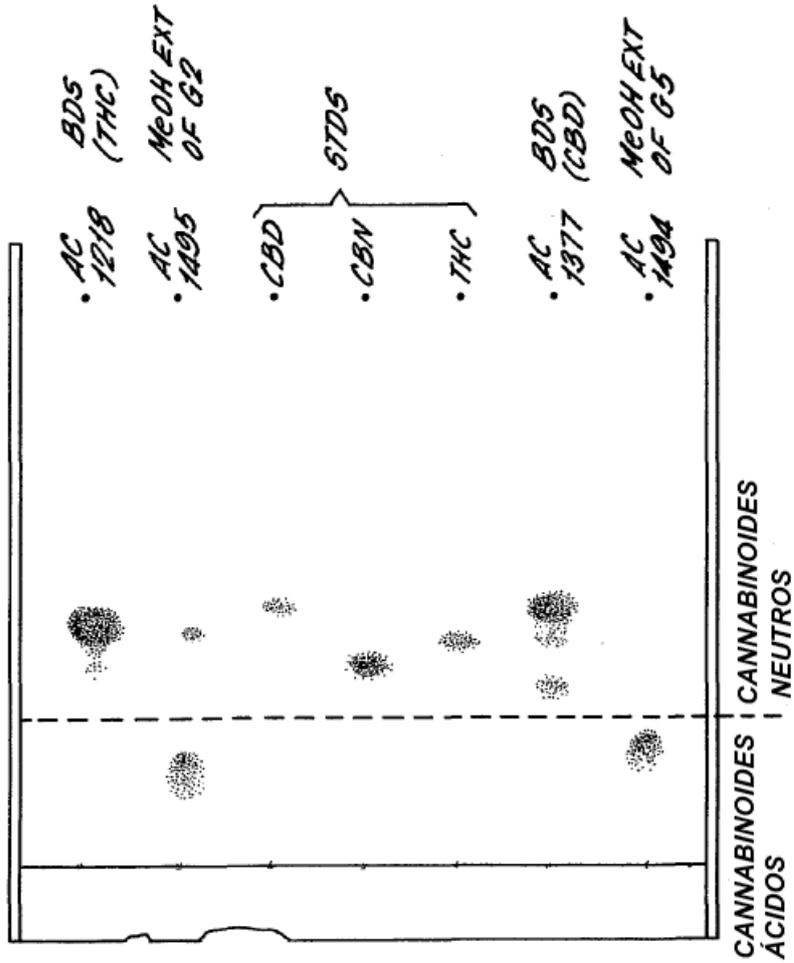


FIG. 4.

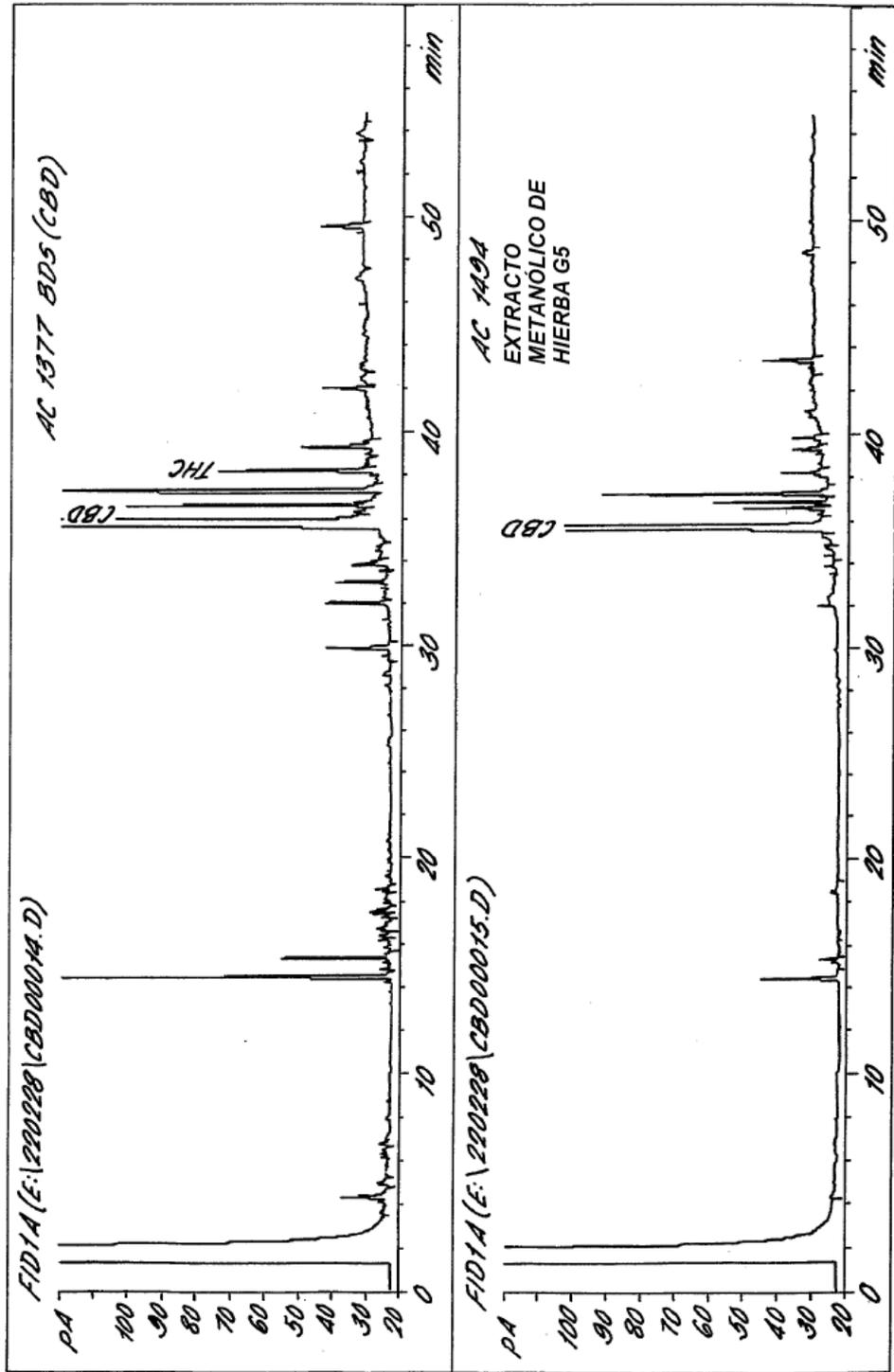


FIG. 5.

