

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



DESARROLLO Y EVALUACIÓN “IN VITRO E IN VIVO” DE MICROESFERAS BIODEGRADABLES PARA LA VEHICULACIÓN DE CANNABINOIDES.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Dolores Hernán Pérez de la Ossa

Bajo la dirección de las doctoras

Ana Isabel Torres Suárez
María Esther Gil Alegre

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-7813-7

© Dolores Hernán Pérez de la Ossa, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN
IN VITRO E *IN VIVO* DE MICROESFERAS
BIODEGRADABLES PARA LA
VEHICULIZACIÓN DE CANNABINOIDES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR CON MENCIÓN EUROPEA

PRESENTADA POR

Dolores Hernán Pérez de la Ossa

Bajo la dirección de las doctoras

Ana Isabel Torres Suárez

Maria Esther Gil Alegre

Madrid, 2010



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Memoria presentada por Dolores Hernán Pérez de la Ossa para optar al
Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Fdo.: Dolores Hernán Pérez de la Ossa

VºBº

Los Directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: Dra. Ana Isabel Torres Suárez
Doctora en Farmacia
Profesora Titular de Universidad
Departamento de Farmacia y
Tecnología Farmacéutica

Fdo.: Dra. María Esther Gil Alegre
Doctora en Farmacia
Profesora Titular de Universidad
Departamento de Farmacia y
Tecnología Farmacéutica

**DEVELOPMENT AND *IN VITRO-IN VIVO*
EVALUATION OF BIODEGRADABLE
MICROSPHERES FOR CANNABINOID
VEHICULIZATION**

**Submitted to the School of Pharmacy in partial fulfillment of the
requirements for the Degree of DOCTOR OF PHILOSOPHY in
Pharmacy and Pharmaceutical Technology with European Mention
at the Complutense University**

by

Dolores Hernán Pérez de la Ossa

Madrid, 2010

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han prestado su apoyo, tanto profesional como personalmente, durante el difícil camino recorrido para finalizar esta tesis doctoral.

Particularmente quiero agradecer a la Dra. Irene Teresa Molina Martínez, Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, el haberme permitido realizar la tesis doctoral en este departamento.

Gracias también a mis directoras de tesis, las Dras. Ana Isabel Torres y M^{ca} Esther Gil por acogerme en su grupo de investigación.

De un modo especial quiero agradecer a los Dres. Billy R. Martin y Aron H. Lichtman del Department of Pharmacology and Toxicology-School of Medicine of Virginia Commonwealth University (Richmond, VA, EEUU), y a todo su equipo, el haberme permitido realizar una estancia científica en sus laboratorios, así como su cariño y su acogida.

Igualmente, al Dr. Vincenzo Di Marzo, jefe del Endocannabinoid Research Group, por permitirme realizar una estancia científica en sus laboratorios del Istituto di Chimica Biomolecolare-CNR, y a todo su equipo y los demás compañeros del Istituto por su ayuda durante mi estancia allí.

No puedo olvidarme de dar las gracias a los Dres. Guillermo Velasco y Mar Lorente, así como a Sofía Torres, del Dpto. de Bioquímica y

Biología Molecular de la Facultad de Biológicas-UCM por sus consejos y ayuda en los estudios de eficacia "in vivo".

A los Dres. Jesús Molpeceres y Rosario Aberturas por su ayuda en los análisis del tamaño de partícula llevados a cabo en la Universidad de Alcalá de Henares, y en los estudios con nanopartículas.

Asimismo quiero agradecer a mis compañeros del Departamento, a los que ya se han ido y a los que aún están, su apoyo y amistad, sin los cuales este camino hubiese sido más difícil.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación, ya que este trabajo ha sido realizado gracias a una beca predoctoral dentro del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU).

Y finalmente dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres, a quienes les dedico esta tesis doctoral, por su cariño y haber estado siempre a mi lado.

Acknowledgments

It is a pleasure to thank the many people who made this thesis possible.

First of all, I would like to thank Dr Irene Molina, chair of the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, for enabling me to enrol the Department for doing my PhD.

I am also grateful to my thesis advisors, Dr Ana Isabel Torres and Dr M^{ra} Esther Gil, for giving me the opportunity to join their lab.

I am appreciative of all the colleagues and friends of the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology with whom I have worked with, bounded ideas off, and laughed with over the years.

My special appreciation goes to Dr Billy R. Martin and Aron H. Lichtman from the Department of Pharmacology and Toxicology at Virginia Commonwealth University for accepting me to do a research stay at their labs, encouraging my work at VCU and for all the wise advises. I feel privileged to have been able to work with them. I am grateful to them and to all my other friends from VCU (especially to April, Steven, Scott and Qing) who were always ready to help me and let me feel at home while in Richmond. I will never forget the fun time we had together.

Thank you to Dr. Vincenzo Di Marzo, chair of the Endocannabinoid Research Group, for allowing me to do a stay at his labs. Thanks to Alessia, Marco, Tiziana, Stefania, Luciano and all my other friends from the Institute of Biomolecular Chemistry-CNR.

I thank Dr. Jesús Molpeceres and Dr. Rosario Aberturas for the help with the particle size analysis and the nanoparticles work.

I would like to thank my collaborators Dr. Guillermo Velasco, Dr. Mar Lorente and Sofía Torres, from the School of Biology for their helpful assistance and discussions regarding the antitumoral "in vivo" experiments.

Additionally, I am wholeheartedly grateful to the friends and colleagues who have contributed either directly or indirectly to this project.

Last, but not least, I would like to thank my family. I thank my parents for their unending love and support, for nurturing me to believe in myself and my abilities. To them I dedicate this thesis.

I would also like to deeply thank the Spanish Ministry of Education and Science (MEC) for the FPU PhD fellowship which has supported me during the PhD program.

I am very aware as I close this section that this work has been a group project in the truest sense of the concept. I could not have done this alone, and it would not be the same piece without the contributions and influences of all of the aforementioned parties.

THANK YOU ALL!

Índice (Table of contents)

I. INTRODUCCIÓN (INTRODUCTION)	1
1. Cannabinoids.....	4
2. <i>Cannabis sativa</i>	4
3. The endogenous cannabinoid system (ECS)	7
3.1. Functions of the ECS	7
3.2. Cannabinoid receptors	8
3.2.1. Cannabinoid receptor distribution	11
CB ₁ receptor	11
CB ₂ receptor	14
3.2.2. Signalling of cannabinoid receptors	15
3.3. Endocannabinoids	16
4. Cannabinoid receptor agonists and antagonists	20
5. Therapeutic potential of cannabinoids	22
5.1. Cannabinoids and cancer	25
6. Side effects and how to circumvent them	30
7. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and cannabidiol	33
7.1. Pharmacology	34
7.2. Physicochemical properties	38
7.3. Cannabinoid stability	43
7.4. Cannabinoid pharmacokinetics	47
7.5. Cannabinoid dosage forms	57
MICROENCAPSULATION	67
II. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL (OBJECTIVES & PLANNING)	73
III. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	83
A) ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE	86
B) CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	88
MÉTODO	88
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	102
CONCLUSIONES	120

IV. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS (MICROSPHERES DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION)	121
MATERIALES Y MÉTODOS	123
1.1. ELABORACIÓN DE LAS MICROESFERAS	123
1.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS	128
1.2.1. Tamaño, forma y estado de agregación	128
a. <i>Microscopio electrónico (SEM)</i>	128
b. <i>Difracción de rayos láser</i>	129
1.2.2. Contenido en principio activo y eficacia de encapsulación	130
1.2.3. Compatibilidad y solubilidad principio activo:polímero, estado físico del cannabinoide en las microesferas y efecto del contenido en cannabinoide sobre el grado de cristalinidad de la PCL	131
1.2.4. Ensayos de cesión <i>in vitro</i>	133
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	140
2.1. ELABORACIÓN DE LAS MICROESFERAS	140
2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS DE CANNABIDIOL	143
2.2.1. Tamaño, forma y estado de agregación	143
a. <i>Microscopio electrónico (SEM)</i>	143
b. <i>Difracción de rayos láser</i>	144
2.2.2. Contenido en principio activo y eficacia de encapsulación	146
2.2.3. Compatibilidad y solubilidad cannabidiol-poli-ε-caprolactona ..	147
2.2.4. Estado físico del CBD en las microesferas y efecto del CBD sobre el grado de cristalinidad de la poli-ε-caprolactona	149
2.2.5. Ensayos de cesión <i>in vitro</i>	154
2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS DE Δ⁹-TETRAHIDROCANNABINOL	165
2.3.1. Tamaño, forma y estado de agregación	166
a. <i>Microscopio electrónico (SEM)</i>	166
b. <i>Difracción de rayos láser</i>	167
2.3.2. Contenido en principio activo y eficacia de encapsulación	169
2.3.3. Estado físico del THC en las microesferas y efecto del THC sobre el grado de cristalinidad de la poli-ε-caprolactona	171
2.3.4. Ensayos de cesión <i>in vitro</i>	174
Efecto de la incorporación del antioxidante sobre los perfiles de liberación del THC	177
CONCLUSIONES	185

V. ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES (CELL CULTURE STUDIES)	187
MATERIALES Y MÉTODOS	189
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	196
2.1. Evaluación de la ausencia de citotoxicidad de micropartículas placebo	196
2.2. Evaluación del efecto citotóxico del cannabinoide en solución	197
2.2.1. <i>Cannabidiol</i>	197
2.2.2. Δ^9 - <i>tetrahidrocannabinol</i>	198
2.3. Puesta a punto de un protocolo para la evaluación el efecto citotóxico de las micropartículas a largo plazo	199
2.4. Determinación de la eficacia de las micropartículas de CBD y Δ^9 -THC	199
2.4.1. <i>Cannabidiol</i>	200
2.4.2. Δ^9 - <i>tetrahidrocannabinol</i>	203
CONCLUSIONES	207
VI. ESTUDIOS DE EFICACIA <i>IN VIVO</i> (<i>IN VIVO</i> EFFICACY STUDIES)	209
MATERIALES Y MÉTODOS	214
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	217
2.1. Eficacia de los fármacos en disolución	220
2.2. Eficacia de los fármacos formulados en micropartículas	221
2.3. Eficacia del CBD en disolución versus las micropartículas de CBD	222
2.4. Eficacia del Δ^9 -THC en disolución versus las micropartículas de Δ^9 -THC	223
2.5. Eficacia de la mezcla de CBD y Δ^9 -THC en disolución versus la mezcla de micropartículas de CBD y de Δ^9 -THC	224
2.6. Evaluación de los tratamientos al finalizar el estudio	225
CONCLUSIONES	230
VII. SUMMARY	233
VIII. CONCLUSIONES (CONCLUSIONS)	269
IX. BIBLIOGRAFÍA (REFERENCES)	275
ANEXO (APPENDIX): Pharmacokinetics of subcutaneous CBD administered in solution and encapsulated into (controlled-release) polymeric microparticles	293

Note to English-speaking readers:

In order to fulfill the requirements for the "**European Doctorate Mention**" this thesis is written both in English and Spanish. Chapters III to VI, which are presented in Spanish, are summarized in Chapter VII.

The image features a minimalist abstract design. Three overlapping circles are arranged in a triangular pattern. The top circle is the largest, the middle one is the smallest, and the bottom one is the largest. Each circle is composed of three concentric layers: a dark gray inner circle, a light gray middle ring, and a medium gray outer ring. Two thin, light gray lines intersect to form an 'X' shape across the page, with the circles positioned at the intersections and within the resulting quadrants.

I. INTRODUCCIÓN
I. INTRODUCTION

Currently, there is a growing interest in the biology, chemistry, pharmacology, and toxicology of cannabinoids and in the development of potential cannabinoid medications (Huestis, 2005b).

This thesis will focus on two phytocannabinoids, delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), the main psychoactive component of cannabis, and its non-psychoactive but highly physiologically relevant isomer, cannabidiol (CBD).

Therefore, the aim of this chapter is to describe the physicochemical, pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of these molecules. These properties justify not only the scientific interest but also the therapeutic usefulness of developing the controlled release delivery systems object of the present PhD thesis.

1. Cannabinoids.

The term “cannabinoids” was introduced by Mechoulam and Gaoni in 1967 to embrace the group of C₂₁ compounds characteristically present in *Cannabis sativa*, their carboxylic acids, analogues, homologues and transformation products (Mechoulam, 1981).

However, this classical definition -which originally referred only to natural plant cannabinoids- has been changed since and currently includes a larger number of compounds, referring to a heteromorphic group of molecules that demonstrate activity upon cannabinoid receptors and are characterized by three varieties (Grotenhermen, 2006):

- ◆ endogenous cannabinoids or *endocannabinoids*,
- ◆ *synthetic cannabinoids*, and
- ◆ *phytocannabinoids*, which are natural terpenophenolic compounds derived from *Cannabis sativa*, such as Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and cannabidiol (CBD).

2. *Cannabis sativa*.

Cannabis sativa L., also known as marijuana or hashish, depending on the particular preparation, is one of the first plants to have been used as a medicine, for religious ceremonies or recreationally. In fact, references to the use of this plant date back over 12,000 years (Adams *et al.*, 1996). However, despite a long history of medicinal use (Grotenhermen, 2005), the introduction of cannabinoids into modern medicine is only beginning.

The therapeutic use of cannabis was not introduced in Western medicine until the first half of the 19th century and reached its climax in the last two decades of the same century, when Δ^9 -tetrahydrocannabinol, the main psychotropic component of marijuana, was identified and synthesized.

However, the use of cannabis as a medicine almost completely disappeared at about the middle of the 20th century. The main reasons for this disappearance

were the variable potency of cannabis extracts, the erratic and unpredictable individual responses, the introduction of synthetic and more stable pharmaceutical substitutes such as aspirin, chloral hydrate and barbiturates, the recognition of important adverse effects such as anxiety and cognitive impairment, and the legal restrictions to the use of cannabis-derived medicines (Zuardi, 2006). In fact, in addition to its potential therapeutic value, marijuana also possess psychoactive properties such as a psychological high that have resulted in its popularity as a recreational drug of abuse, being the third most popular recreational drug after alcohol and tobacco (UNODC, 2009).

Moreover, today, cannabis or marijuana is the focus of strong social, legal, and medical controversy over its therapeutic utility, and a growing interest in cannabis as a source of medicinal compounds has emerged during the last few years.

The main active psychotropic constituent of cannabis, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), was isolated, identified and synthesized in the 1960's by Mechoulam's group (Gaoni *et al.*, 1964). Almost three decades later, cannabinoid receptors in the brain were described and cloned and the endogenous cannabinoids were isolated and identified. As a result of these discoveries the interest in cannabis research has remarkably increased (Zuardi, 2006). In fact, over the last few years, cannabinoids have been recognized as being useful in the treatment of various medical conditions, such as nausea, AIDS associated wasting syndrome, anorexia, multiple sclerosis, pain and glaucoma (Järvinen *et al.*, 2002).

The plant *Cannabis sativa* produces over 421 different chemical compounds, approximately 70 of these compounds are unique to it and known collectively as plant cannabinoids or **phytocannabinoids** (ElSohly *et al.*, 2005; Hanus, 2009; Izzo *et al.*, 2009; Mechoulam *et al.*, 2000; Mechoulam *et al.*, 2007; Pertwee, 2008; Thomas *et al.*, 2007).



Figure 1. Cannabis (Indian hemp) consists of the aerial parts of *Cannabis sativa* L. (Cannabidaceae). The plant is a dioecious annual herb indigenous to central and western Asia. It grows as both male and female plants and is cultivated in other tropical and temperate regions for the fibre (production of ropes, carpets, etc) and seeds, which yield 30-35% of a fixed oil (industrial uses).

In addition to Δ^9 -THC, cannabidiol (CBD), Δ^8 -THC, cannabichromene (CBC), cannabigerol and cannabinol (CBN) are other cannabinoids that are found in the plant. It has been suggested that these other cannabinoids may modulate the effects of Δ^9 -THC, providing benefits that cannot be obtained with Δ^9 -THC alone (Grotenhermen, 2006). Particular interest has been given to CBD, usually the second most abundant constituent (Varvel *et al.*, 2005).

In fact, cannabinoid plant chemistry is far more complex than pure cannabinoids, and different effects may be expected not only due to the presence of additional cannabinoids but also to other chemicals (Huestis, 2005b). Indeed, in addition to cannabinoids, numerous terpenes, phenolic compounds, alkaloids, flavonoids and other natural products have been isolated from *Cannabis sativa* (Mechoulam, 1981), and animal and human studies have shown that these other constituents of marijuana can modify the effects of Δ^9 -THC (Varvel *et al.*, 2005).

The cannabinoid content of the plant varies widely depending upon the climate, soil, cultivation, type of plant and part of the plant being used (Adams *et al.*, 1996). Both female and male plants produce cannabinoids, but the female

plants produce larger amounts. The highest concentration of cannabinoids in the plant is found in the flowering tops, followed by the leaves. There are many different preparations of the crude drug (hashish, marihuana, charas, ganja, kief, dagga, etc.). The best one, named hashish (4-10% in Δ^9 -THC), consists almost exclusively of the glandular hairs and it is a brown mass with a conspicuous smell (Nocerino *et al.*, 2000). The Mexican term marijuana refers to cannabis leaves or other crude plant material (Adams *et al.*, 1996).

3. The endogenous cannabinoid system (ECS).

The endogenous cannabinoid system (ECS) includes: (1) at least two G-protein-coupled receptors (GPCRs), known as the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors; (2) the endogenous agonists at these receptors, known as *endocannabinoids*, of which anandamide and 2-arachidonoylglycerol are the best known; and (3) proteins and enzymes responsible for the regulation of endocannabinoid biosynthesis, cellular uptake, metabolism and action at receptors (De Petrocellis *et al.*, 2004; Mackie, 2008a; Pertwee, 2009).

The number of members of this endocannabinoid signalling system seems to be ever increasing as new non-CB₁ non-CB₂ receptors for endocannabinoids, endocannabinoid-related molecules with little activity at CB₁ and CB₂ receptors, and new enzymes for endocannabinoid biosynthesis and degradation are being identified every year (De Petrocellis *et al.*, 2009a; Pertwee, 2009).

3.1. Functions of the ECS.

The ECS has been found in mammals, birds, amphibians, fish, sea urchins, molluscs and leeches (Grotenhermen, 2006). The ubiquitous expression of various components of the ECS, as well as its presence in lower-level organisms, indicates a vital role for this system in normal physiology. In fact, this system is of great importance for the normal function of the body and is millions of years old (Grotenhermen, 2006). With its ability to modulate several physiological and pathophysiological processes (e.g. neurotransmitter release in the central and peripheral nervous system, pain perception, and cardiovascular, gastrointestinal and liver functions), the endocannabinoid system represents a potential target for pharmacotherapy (Di Marzo, 2008; Izzo *et al.*, 2009). Hence, since the discovery of

the endogenous cannabinoid system, research into the pharmacology and therapeutic potential of cannabinoids has steadily increased.

As a result, during the past 15 years a remarkable amount of studies have been performed in order to understand the biological role of the endocannabinoid system and its regulatory functions in health and disease. Since then, the endocannabinoid system has been implicated in a growing number of physiological functions, both in the central and peripheral nervous systems and in peripheral organs. More importantly, modulating the activity of the endocannabinoid system turned out to hold therapeutic promise in a wide range of disparate diseases and pathological conditions (figure 2), ranging from mood and anxiety disorders, movement disorders such as Parkinson's and Huntington's disease, neuropathic pain, multiple sclerosis and spinal cord injury, to cancer, atherosclerosis, myocardial infarction, stroke, hypertension, glaucoma, obesity/metabolic syndrome and osteoporosis, to name just a few (Pacher *et al.*, 2006; Pisanti *et al.*, 2009).

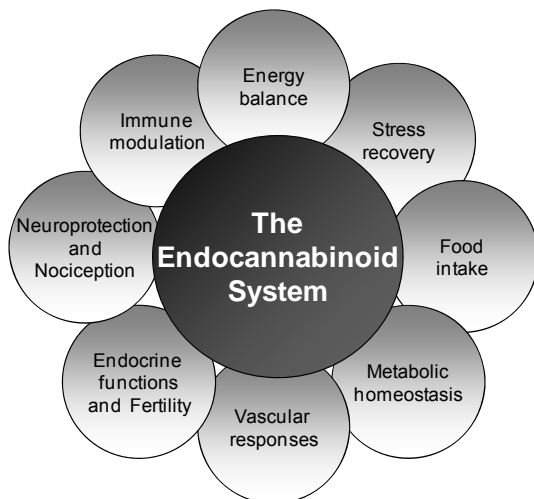


Figure 2. Normal functions of the ECS. The ECS has been shown to modulate energy balance and metabolic homeostasis, as well as behaviours such as food intake. Other functions of the ECS in normal physiology may be related to endocrine functions, vascular responses, immune modulation, nociception, neuroprotection, learning and memory and bone turnover.

3.2 Cannabinoid receptors.

For many decades, the mechanism of action of cannabinoids was unknown. Initially, due to the highly lipophilic nature of phytocannabinoids and the central depressant effects, cannabinoids were thought to mediate their actions by

inserting directly into biomembranes, similar to the mechanism of action of general anaesthetics (Adams *et al.*, 1996). Nevertheless, this scenario changed markedly in the early 1990s, when further work indicated that cannabinoid action was highly stereospecific (Pertwee, 2006). These results prompted to look for a specific receptor and, in 1990 the first cannabinoid receptor -CB₁- was identified. This finding revolutionized the study of cannabinoid biology, revealing that cannabinoids may exert many of their biological functions through receptor-mediated mechanisms. This led not only to an impressive expansion of basic cannabinoid research, but also to a renaissance in the study of the therapeutic effects of cannabinoids, which now constitutes a widely debated issue with ample scientific, clinical and social relevance (Guzmán, 2003). As a matter of fact, our knowledge of the mechanisms of action of cannabinoids has increased greatly in the past several years.

Cannabinoid receptors received their name as those receptors that respond to cannabinoid drugs, such as Δ^9 -THC, and its biologically active synthetic analogs. Several endogenous ligands for cannabinoid receptors have also been identified, most notably arachidonylethanolamide (anandamide), 2-arachidonoylglycerol, and 2 arachidonoylglyceryl ether (noladin ether) (Howlett *et al.*, 2002).

To date, two types of cannabinoid receptors have been identified for sure, the **CB₁** (cloned in 1990) -located predominantly in the central nervous system- (Matsuda *et al.*, 1990) and the **CB₂** receptor (cloned in 1993) (Munro *et al.*, 1993) -located primarily in the immune system-, exhibiting 48% aminoacid sequence identity (Grotenhermen, 2005; Howlett *et al.*, 2002). Both CB₁ and CB₂ receptors belong to the large family of the G-protein-coupled receptors (GPCR). Thus, they are cell surface proteins that consist of seven transmembrane domains, with an extracellular amino-terminus, and an intracellular C-terminus (Mackie, 2008b) (figure 3). GPCRs are the most common receptors, containing 1,000-2,000 members in vertebrates.

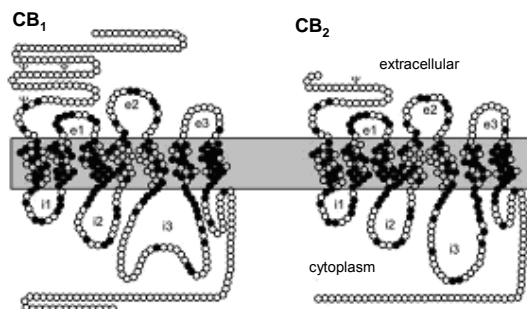


Figure 3. CB₁ and CB₂ receptors.

CB₁/CB₂ homology= ca 44% (35 % to 82% within the transmembrane domains).

Besides their difference in amino acid sequence, they differ in signalling mechanisms, tissue distribution, and sensitivity to certain agonists and antagonists that may show marked selectivity for one or the other receptor type (Howlett *et al.*, 2002) (table 1).

Table 1. Characteristics of CB₁ and CB₂ receptors -adapted from (Sugiura *et al.*, 2006)-

	CB ₁	CB ₂
<i>Amino acids</i>	472 (Human)	360 (Human)
<i>G protein</i>	G _{i/o}	G _{i/o}
<i>Endogenous ligands</i>	2-AG, anandamide	2-AG, anandamide?
<i>Synthetic agonists</i>	CP55940, WIN55212-2, HU-210, ACEA, APCA	CP55940, WIN55212-2, HU-210, HU-308, JWH133, AM1241
<i>Antagonists/inverse agonists</i>	SR141716A, AM251, AM281, LY320135	SR144528, AM630, JTE-907
<i>Expression</i>	The nervous system (brain) Peripheral nerve terminals Testis	The immune system (spleen, tonsils)
<i>Intracellular mechanism</i>	Adenylyl cyclase inhibition MAPK activation Inactivation N- type and P/Q- type Ca ²⁺ channels Activation of A-type and inwardly rectifying K ⁺ channels Gene expression	Adenylyl cyclase inhibition MAPK activation Gene expression

Although endocannabinoids clearly activate CB₁ and CB₂ receptors, they also interact with other GPCRs and ion channels. Indeed, nowadays there is increasing pharmacological evidence for the existence of additional cannabinoid receptor subtypes in the brain and periphery (Howlett *et al.*, 2002; Pacher *et al.*, 2006). One of these receptors may be the orphan G-protein- coupled receptor **GPR55**, as recent studies have indicated that anandamide, and possibly 2-AG, activate GPR55 (Mackie, 2008a; Pertwee, 2007; Ryberg *et al.*, 2007). The best known and characterized of the ion channel interactions is the activation of transient receptor potential vanilloid 1 (**TRPV1**) channels by anandamide (Szallasi *et al.*, 2000), and the peroxisome proliferator activated receptors (**PPAR**)- α and - γ , a class of nuclear receptors that control the expression of several genes involved particularly in metabolism and immune/inflammatory responses (De Petrocellis *et al.*, 2009a; Klein *et al.*, 2000; Pertwee, 2006b).

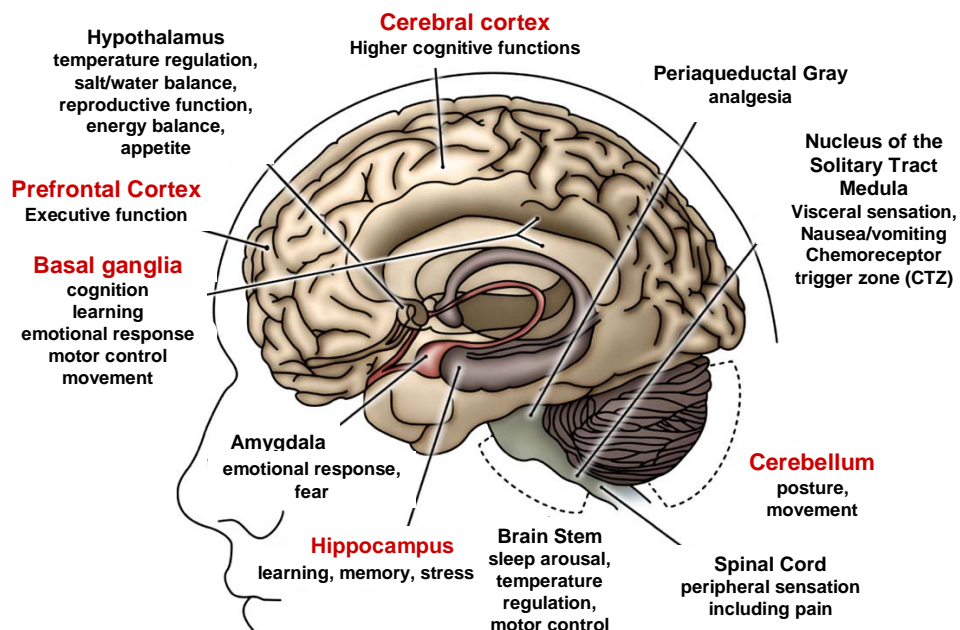
3.2.1. Cannabinoid receptor distribution.

CB₁ receptor

Although CB₁ receptors are present in particularly high concentrations within the central nervous system (CNS), they are also found peripherally, in both neuronal and nonneuronal tissues (Pertwee, 1999a; Pertwee, 1997).

CB₁ receptors are among the most abundant and widely distributed G-protein coupled receptors in the central nervous system (Grotenhermen, 2006; Mackie, 2008b), their densities being similar to levels of γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamate-gated ion channels receptors (Howlett *et al.*, 2004). The CB₁ distribution within the CNS is heterogeneous, which accounts for both clinical benefits and adverse effects associated with cannabinoids (Davis, 2008). Expression of this receptor (figure 4 and table 2) is abundant in the brain, particularly in discrete areas that are involved in the control of motor activity (basal ganglia –lateral caudate putamen, globus pallidus, entopeduncular nucleus, substantia nigra pars reticulata- and cerebellum), memory and cognition (cortex and hippocampus –dentate gyrus molecular layer and the CA3 regions-), emotion (amygdala), sensory perception (thalamus), autonomic and endocrine functions – appetite, weight, and blood pressure- (hypothalamus, pons and medulla), and pain modulation (certain parts of the spinal cord, periaqueductal grey), while their

expression in the brainstem is low, which may account for the lack of cannabis-related acute fatalities, e.g. depression of respiration (Grotenhermen, 2006), and for the lack of toxicity associated with very high doses of Δ^9 -THC or other cannabinoid ligands (Howlett *et al.*, 2004).



Red= abundant CB1 receptor expression

Black= moderately abundant CB1 receptor expression

Figure 4. Brain regions that express the CB₁ receptor.

Table 2. Brain regions in which cannabinoid receptors are abundant and their corresponding functions adapted from (Pérez, 2006).

Brain Region	Functions Associated with Region
<i><u>Brain regions in which cannabinoid receptors are abundant</u></i>	
Basal ganglia	Movement control
Substantia nigra pars reticulata	
Entopeduncular nucleus	
Globus pallidus	
Putamen	
Cerebellum	Body-movement coordination
Hippocampus	Learning and memory, stress
Cerebral cortex, especially cingulate, frontal, and parietal regions	Higher cognitive functions
Nucleus accumbens	Reward center
<i><u>Brain regions in which cannabinoid brain receptors are moderately concentrated</u></i>	
Hypothalamus	Homeostasis=Body housekeeping functions (body-temperature regulation, salt and water balance, reproductive function)
Amygdala	Emotional response, fear
Spinal cord	Peripheral sensation, including pain
Brain Stem	Sleep and arousal, temperature regulation, motor control
Central gray	Analgesia
Nucleus of the solitary tract	Visceral sensation, nausea and vomiting

CB₁ receptors have a striking presynaptic localization (Mackie, 2008b). There is good evidence that the activation of presynaptic CB₁ receptors can lead to inhibition of the evoked release of a number of different excitatory or inhibitory neurotransmitters (acetylcholine, noradrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine, γ -aminobutyric acid, glutamate, D-aspartate, cholecystokinin,...) both in the brain and in the peripheral nervous system as a result of a decrease of calcium entry through voltage dependent calcium channels

(Howlett, 2002; Pertwee, 2009). Thus, CB₁ receptor activation protects the nervous system from over-activation or over-inhibition by neurotransmitters (Grotenhermen, 2006).

The CB₁ receptors are also expressed in peripheral nerve terminals and various extraneural sites such as the testis, eye, vascular endothelium, adipose tissue, heart, spleen, pancreas, endocrine glands, skeletal muscles, leukocytes and parts of the reproductive, urinary and gastrointestinal tracts (Grotenhermen, 2004; Pertwee, 2006b).

CB₂ receptor

Determination of the distribution of CB₂ receptors has lagged considerably behind that for CB₁ receptors. There are many reasons for this, including the lower abundance of CB₂ receptors relative to CB₁ receptors and the difficulty in raising highly selective CB₂ receptor ligands. Nonetheless, strong evidence supports the notion that cannabinoid CB₂ receptors, in contrast to CB₁ receptors, are mostly found in the periphery. The CB₂ receptor has a more limited distribution, being almost exclusively expressed in the immune system, both by cells (with a rank order of B cells > natural killer cells >> monocytes/macrophages > polymorphonuclear neutrophils > T8 lymphocytes > T4 lymphocytes), and by tissues, including the spleen, tonsils, thymus and lymph nodes (Howlett, 2002). One of the functions of cannabinoid receptors in the immune system is modulating the release of cytokines, which are responsible for inflammation and regulation of the immune system (Grotenhermen, 2006).

While the abundance of CB₁ receptors in the CNS is undisputed, the presence of CB₂ receptors in the CNS has been subject to debate. However, recent investigations have shown that although this receptor is primarily found in cells of the immune system, there is CB₂ receptor expression in neuronal populations under certain circumstances (Mackie, 2008b; Morgan *et al.*, 2009; Van Sickle *et al.*, 2005). Nevertheless, nowadays the localization and function of CB₂ receptors within CNS remains controversial.

3.2.2. Signalling of cannabinoid receptors.

Several effector systems have been identified for cannabinoid receptors. In particular, there is convincing evidence that both CB₁ and CB₂ receptors are coupled through G_{i/o} proteins, negatively to adenylate cyclase and positively to mitogen-activated protein kinase (Howlett, 2002; Howlett *et al.*, 2002; Howlett *et al.*, 2004; Pertwee, 2006b). However, under certain conditions (only when other G_{i/o} protein-coupled receptors are concomitantly activated), CB₁ receptors may also act through G_s proteins to activate adenylate cyclase (Mackie *et al.*, 2006; Pertwee, 1999b).

In addition, there is good evidence that CB₁ receptors are negatively coupled through G_{i/o}-protein to N-type and P/Q-type calcium channels, and that they are positively coupled through G_{i/o}-protein to potassium channels, both A-type and inwardly rectifying, as illustrated in figure 5.

Together or separately, the activation of these signalling pathways by CB₁ receptors, and the high levels of these receptors on presynaptic terminals, mean that endocannabinoid stimulation of CB₁ receptors suppresses neuronal excitability and inhibits neurotransmitter release from nerve terminals (Howlett, 2002; Mackie, 2008a). Neurotransmitters modulated by cannabinoids include glutamate, acetylcholine and noradrenaline, among others (Davis, 2008).

Stimulation of CB₂ receptors has similar consequences, except the modulation of ion channels by CB₂ receptors is more variable (Mackie, 2008a).

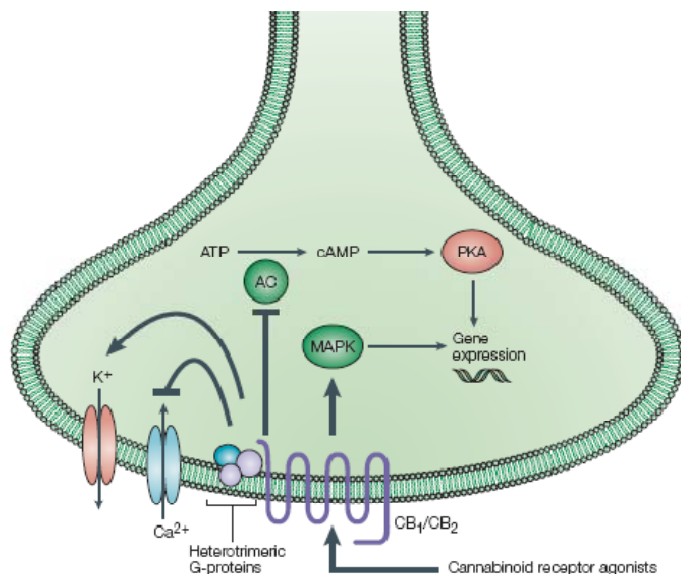


Figure 5. Major signalling pathways associated with cannabinoid receptor activation by agonists. Cannabinoid receptors are embedded in the cell membrane where they are coupled to G-proteins. Activation of both cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors, and the subsequent stimulation of G_{i/o} heterotrimeric proteins, is well known to be coupled to inhibition of adenylyl cyclase (AC) with corresponding inactivation of the protein kinase A (PKA) phosphorylation pathway, or to stimulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). These intracellular events lead to, among other effects, the regulation of the expression of several genes. However, more complex protein phosphorylation cascades — specifically, those involving phosphoinositide-3-kinase and protein kinase B — are also proposed to be triggered by CB₁ receptors. Furthermore, stimulation, rather than inhibition, of AC by CB₁, but not CB₂, receptors, via G_s proteins, has also been described occasionally. CB₁-, but not CB₂-, receptor stimulation of G_{i/o} proteins is also directly coupled to inhibition of N-type and P/Q type voltage-dependent Ca²⁺ channels and stimulation of inwardly rectifying K⁺ channels in neurons, with subsequent inhibition of neurotransmitter release. The choice between which of these pathways is modulated by cannabinoid receptor activation also depends on the type of agonist under study (Di Marzo *et al.*, 2004). ATP: adenosine triphosphate; cAMP: cyclic adenosine monophosphate.

3.3. Endocannabinoids.

The discovery of the cannabinoid receptors and their G-protein-coupled nature strongly suggested the existence of one or more endogenous cannabimimetic ligands (named *endocannabinoids*) that exert their physiological activity upon binding to these receptors (Mackie, 2008b). All endocannabinoids

are derivatives of polyunsaturated fatty acids, thus differing in chemical structure from cannabinoids of the cannabis plant.

Two types of endogenous molecules have been proposed to act as endocannabinoids (De Petrocellis *et al.*, 2009; Di Marzo *et al.*, 2007) (figure 6):

(1) long chain polyunsaturated fatty acid amides, including:

- (i) N-acylethanolamines (NAEs) with 20 carbon atoms and at least 3 double bonds, of which N-arachidonoylethanolamine (anandamide) is the most studied representative, and
- (ii) N-arachidonoyl dopamine (NADA); and

(2) non-amide derivatives, including:

- (i) esters of arachidonic acid, such as the widely studied 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and O-arachidonoylethanolamine (virodhamine), and
- (ii) the more controversial ether analogue of 2-AG, noladin ether.

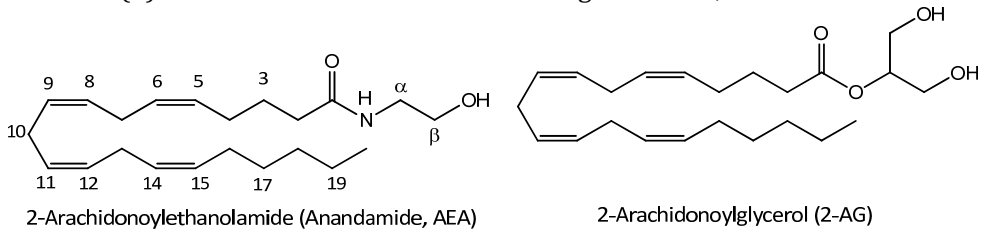


Figure 6. The two best characterized endocannabinoids: Anandamide (arachidonoylethanolamide) detected in 1992, and 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) detected in 1995.

The first endocannabinoid discovered was named **anandamide (AEA)** (Devane *et al.*, 1992), from the sanskrit ananda, ‘internal bliss’, and with reference to its chemical structure arachidonoylethanolamide, the amide of arachidonic acid (AA) and ethanolamine (Et). A second arachidonic-acid derivative, **2-arachidonoylglycerol (2-AG)**, the ester (at the s_n two position) of arachidonic acid and glycerol, which binds to cannabinoid receptors, was subsequently described (Stella *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 2002; Sugiura *et al.*, 1995). Both share the similarity that they exist as precursors in the cell membrane and are produced in response to specific stimuli. However, they differ in their pharmacological properties (e.g., 2-AG is a much more efficacious agonist than anandamide) and

are produced and degraded by very different enzymatic pathways (Di Marzo, 2006; Mackie, 2008b).

Other endocannabinoids are 2-arachidonylglyceryl ether (noladin ether), O-arachidonoyl- ethanolamine (virodhamine), and N-arachidonoyl-dopamine (NADA).

The synthesis, cellular transport and degradation of endocannabinoids are tightly regulated processes (Howlett *et al.*, 2002).

A feature that distinguishes endocannabinoids from many other neuromodulators is that they are not synthesized in advance and stored into vesicles in the nerve cells; AEA and 2AG, like prostanooids, have been shown to be synthesized “on demand” (by cleavage of membrane lipid precursors by specific enzymes) in response to a depolarization-induced rise elevations of intracellular calcium in post-synaptic neurons (Pacher *et al.*, 2006), and then are released from cells (figure 7). Several pathways may exist for both the synthesis and catabolism of AEA and 2-AG.

The immediate precursor of anandamide is the phospholipid N-arachidonoylphosphatidylethanolamine (NArPE) –formed from the N-arachidoylation of phosphatidylethanolamine via N-acyltransferases (NATs)-, whereas 2-arachidonoylglycerol is formed from diacylglycerols (DAGs), the first of these processes being catalysed by N-acylphosphatidylethanolamine-selective phospholipase D (NAPE-PLD) and the second by two diacylglycerol lipase isozymes, DAGL α and DAGL β (De Petrocellis *et al.*, 2009).

Endocannabinoids subsequently act as retrograde messengers by binding to presynaptic CB₁ cannabinoid receptors, which are coupled to the inhibition of voltage-sensitive Ca²⁺ channels and the activation of K⁺ channels (figure 7). This blunts membrane depolarization and exocytosis, thereby inhibiting the release of neurotransmitters such as glutamate, dopamine and γ -aminobutyric acid (GABA) and affecting, in turn, processes such as learning, movement and memory, respectively. Although the physiological roles of the endocannabinoids have been only partially clarified, it is now generally accepted that one important role of the endocannabinoids is their role in brain neuromodulation serving as retrograde synaptic messengers that prevent the development of excessive neuronal activity

in the central nervous system in a manner that maintains homeostasis in health and disease (Pertwee *et al.*, 2002).

Endocannabinoid neuromodulatory signalling is terminated by cellular re-uptake via a specific and yet-to-be characterized membrane-transport system (T), which appears to also mediate the release of the novo-biosynthesized endocannabinoids. Then, endocannabinoids are degraded by intracellular enzymes: anandamide mainly by fatty acid amide hydrolase (FAAH), which degrades AEA to arachidonic acid (AA) and ethanolamine (Et) (Cravatt *et al.*, 1996), but also by N-palmitoylethanolamine-preferring acid amidase (PAA), cyclooxygenase-2, lipoxygenases and cytochrome P450; and 2-AG mainly by monoacylglycerol lipase (MAGL) but also by FAAH (De Petrocellis *et al.*, 2009).

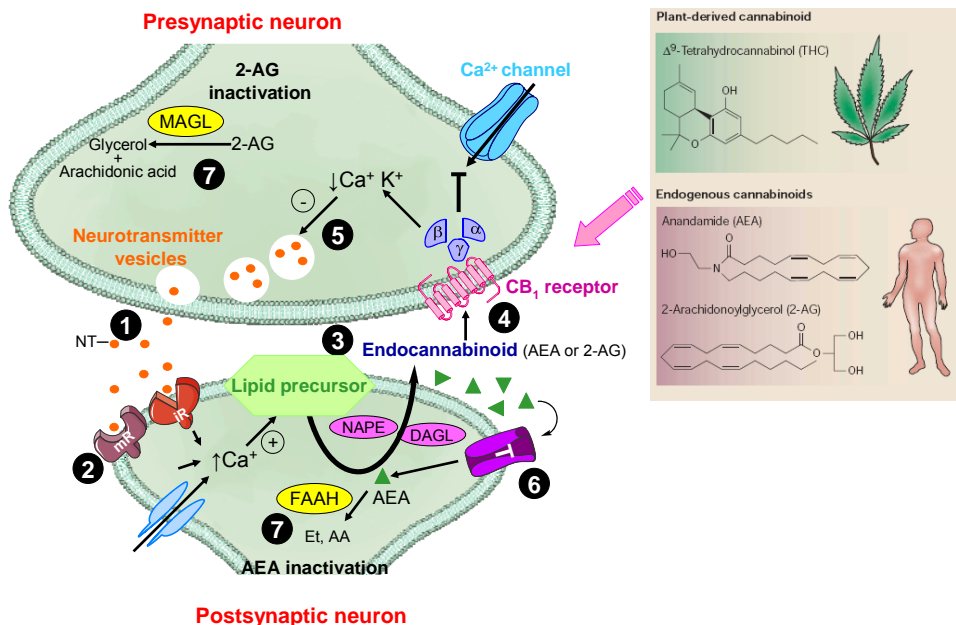


Figure 7. Schematic representation of the endocannabinoid system in pre- and postsynaptic neurons. Neurotransmitter released from vesicles within the presynaptic neuron (1) activate the postsynaptic neuron (2). Endogenous cannabinoids are synthesized on demand from membrane fatty-acid precursors in postsynaptic neurons (3) after intracellular calcium increase (they are not synthesized in advance and stored in vesicles). Several pathways might exist for both the formation and catabolism of AEA and 2-AG (De Petrocellis *et al.*, 2009). Endocannabinoid biosynthesis is catalyzed by phosphodiesterase (PDE) enzymes such as phospholipase D (AEA) and phospholipase C (2-AG). The endocannabinoids diffuse and activate pre-synaptic CB₁ receptors (4) and induce intracellular cascades, inhibiting neuronal activity and neurotransmitter (NT) release (5). Anandamide (AEA) undergoes re-uptake (6) and

hydrolysis by fatty acid amide hydrolase (FAAH) (7), whereas 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) is broken down by monoacylglycerol lipase (MAGL) (7). The existence of a membrane “endocannabinoid-transporter” is controversial (Guzmán, 2003; Sugiura *et al.*, 2006).

The endogenous cannabinoid system might also exert modulatory functions outside the brain, both in the peripheral nervous system and in extraneural sites, controlling processes such as peripheral pain, vascular tone, intraocular pressure and immune function.

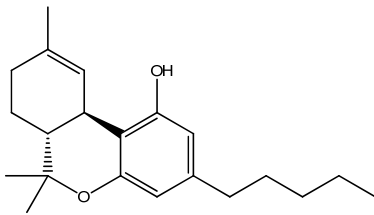
4. Cannabinoid receptor agonists and antagonists.

Cannabinoid agonists are usually classified according to their chemical structure into four main groups (Pertwee, 1999) (figure 8):

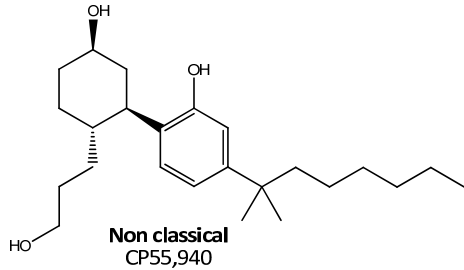
- a) The first of these is the “*classical cannabinoid group*”. This is made up of dibenzopyran derivatives and includes Δ^9 -THC.
- b) The second, “*nonclassical cannabinoid group*” was developed by a Pfizer research team and consists of bicyclic and tricyclic analogs of Δ^9 -THC that lack a pyran ring (the B ring). An important member of this group of compounds is CP 55,940.
- c) The third group of cannabimimetic compounds is made up of aminoalkylindoles, which are structurally quite different from members of the first two groups. The prototype of this “*aminoalkylindole group*” is the pravadoline derivative, R(+)-WIN 55,212-2.
- d) The fourth “*eicosanoid group*” contains arachidonic acid derivatives, and the prototypic member of this group is the endogenous cannabinoid receptor ligand arachidonylethanolamide (anandamide).

All have been subjected to comprehensive structure–activity relationship studies, which, by selectively modifying the chemical structure of cannabinoid molecules, have led to the generation of various types of potent synthetic cannabinoid-receptor agonists.

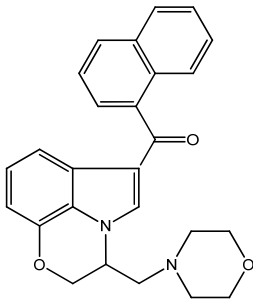
CANNABINOID AGONISTS



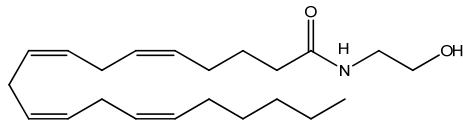
Classical
(-)- Δ^9 -THC



Non classical
CP55,940

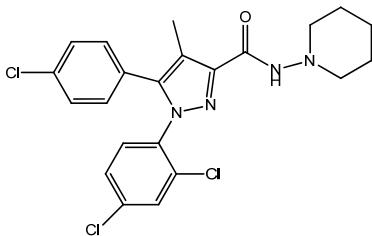


Aminoalkylindole
WIN55,212-2

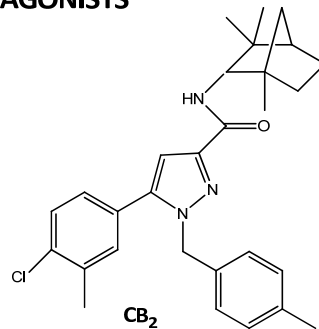


Eicosanoid
(Anandamide)

CANNABINOID ANTAGONISTS



CB₁
SR 141716A



CB₂
SR 144528

Figure 8. Chemical structures of cannabinoid ligands.

In rodents, cannabinoid agonists produce a “**tetrad**” of characteristic pharmacological effects: antinociception, hypothermia, hypomotility and catalepsy, the combination of which has achieved acceptability as a screening procedure for “cannabimimetic compounds” (Martin *et al.*, 1987).

Selective cannabinoid receptor antagonists, such as the diarylpyrazoles have also been developed. For example, SR141716A, which is a potent, surmountable antagonist with marked selectivity for the CB₁ receptor (Pertwee, 1997), and SR144528 which is a selective antagonist for the CB₂ receptor (figure 8), both developed by Sanofi Recherche. All of these compounds are excellent pharmacological tools which have been used to achieve a detailed knowledge of cannabinoid action, and might serve as templates for the design of clinically useful drugs (Guzmán, 2003). For instance, CB₁ receptor antagonists/inverse agonists have therapeutic potential as appetite suppressants as well as in the management acute schizophrenia and for ameliorating cognitive/memory dysfunctions associated with disorders such as Alzheimer's disease (Pertwee, 1999).

5. Therapeutic potential of cannabinoids.

Recently, there has been a renewed interest in cannabinoids for medicinal purposes. Consequently, in recent years much progress has been done about the potential use of *Cannabis sativa*-derived compounds as well as cannabimimetic fatty acid derivatives as therapeutic agents.

Despite the fact that cannabis has been used as a medicine over many centuries, individual cannabinoid receptor ligands were introduced into the clinic only quite recently.

To do justice to the scientific evidence with regard to different indications, a hierarchy of therapeutic effects can be devised (Grotenhermen, 2004):

- 1) clinically established,
- 2) clinically relatively well-confirmed,
- 3) clinically less confirmed and
- 4) preclinical evidence for the therapeutic potential available.

1. Established Effects

First on the scene to be introduced into the clinic was the CB₁/CB₂ receptor agonist, nabilone LY109514 (**Cesamet**[®], Valeant Pharmaceuticals International, Aliso Viejo, CA, USA) which is a synthetic analogue of Δ^9 -THC and was licensed as a medicine in 1981 in the USA for the suppression of nausea and vomiting

produced by chemotherapy (Grotenhermen, 2004). Subsequently, Δ^9 -THC itself became a medicine. It initially entered the clinic as **Marinol**[®] (Dronabinol, Solvay Pharmaceuticals, Marietta, GA, USA), in 1985 as an anti-emetic for nausea and vomiting caused by antineoplastic drugs, and in 1992 as an appetite stimulant, for example for AIDS patients experiencing excessive loss of body weight. In 2005, nabilone and dronabinol were joined by the cannabis-based medicine, **Sativex**[®] (GW Pharmaceuticals Ltd., Salisbury, Wiltshire, UK), which is an oromucosal spray that contains approximately equal amounts of Δ^9 -THC and the non-psychoactive plant cannabinoid, cannabidiol, and is prescribed in Canada for the symptomatic relief of neuropathic pain in adults with multiple sclerosis (Grotenhermen, 2005; Pertwee, 2006b) and, since August 2007, as adjunctive analgesic treatment for adult patients with advanced cancer (Pertwee, 2008; Pertwee, 2009; Pertwee, 2006b; Thumma *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2002). In addition, Sativex[®] is currently under review for approval as a prescription medication for treatment of spasticity in multiple sclerosis in the United Kingdom and Spain (Baker *et al.*, 2003; Grotenhermen, 2002; <http://www.gwpharma.co.uk>; Naef *et al.*, 2004).

Table 3. Cannabinoid drugs. Currently approved indications.

Indication	Drug product	Route	Country
Nausea and vomiting associated with cancer chemotherapy in patients who have failed to respond adequately to conventional antiemetic treatments (1985)	Marinol [®] ^a Cesamet [®] ^b	Oral	USA UK Canada Ireland
Appetite stimulation in AIDS- related anorexia associated with weight loss (1992)	Marinol [®] ^a	Oral	USA
Symptomatic relief of neuropathic pain in Multiple Sclerosis (2005). Adjunctive analgesic treatment in patients with advanced cancer who experience moderate to severe pain during the highest tolerated dose of strong opioid therapy for persistent background pain (2007).	Sativex [®] ^c	Sublingual	Canada

- a. Dronabinol (Marinol[®]): capsules containing a solution of Δ^9 -THC in sesame oil.
- b. Nabilone (Cesamet[®]): capsules of a synthetic analogue of Δ^9 -THC
- c. Sativex[®]: sublingual spray of Δ^9 -THC 27 mg/mL and CBD 25mg/mL from a *Cannabis sativa* extract.

2. Relatively Well-Confirmed Effects

Relatively well—confirmed effects were described related to painful conditions, especially neurogenic pain, movement disorders (including dystonia and levodopa-induced dyskinesia, Parkinson’s disease, Tourette’s syndrome, Huntington’s disease) and asthma (Ben Amar, 2006; Costa, 2007; Grotenhermen, 2004; Grotenhermen, 2002; Naef *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2002).

Moreover, cannabinoids have the potential of becoming a useful treatment for glaucoma, as they seem to have neuroprotective properties and effectively reduce intraocular pressure (Grant *et al.*, 2005; Järvinen *et al.*, 2002; Mechoulam *et al.*, 1998).

3. Less Confirmed Effects

There are several indications, in which mainly case reports suggest benefits. These are allergies, inflammation, bronchial asthma, epilepsy, depression, bipolar disorders, anxiety disorders, dependency to opiates and alcohol, withdrawal symptoms, and disturbed behaviour in Alzheimer’s disease.

4. Basic Research Stage

Basic research shows promising possible future therapeutic uses, among them neuroprotection in hypoxia and ischemia due to traumatic head injury, nerve gas damage and stroke. Some immunological mechanisms of Δ^9 -THC hint to possible benefits in autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, arthritis, and Crohn’s disease (Klein *et al.*, 2007).

Other fields of research are disorders of circulation, blood pressure and antineoplastic activity (Grotenhermen, 2004).

Moreover, cannabinoids also represent a novel way to treat disorders not responding to traditional agents or therapies (Adams *et al.*, 1996). In fact, due to the large clinical potential of the cannabinoids, it has been suggested that cannabis could be the “aspirin of the 21st century” (Baker *et al.*, 2003).

However, despite all this research work, the therapeutic potential of many phytocannabinoids still remains largely unexplored prompting a need for further preclinical and clinical research directed at establishing whether phytocannabinoids are indeed ‘a neglected pharmacological treasure trove’

(Pertwee, 2008). Therefore, it seems clear that the Cannabis plant still has highly relevant potential for medicine (Hazekamp *et al.*, 2006).

5.1 Cannabinoids and cancer.

Within the current renewed interest in cannabinoids for medicinal purposes, their beneficial effects in oncology constitute one of the main issues endowed with important potential therapeutic applications. These effects include not only the treatment of a wide variety of cancer-related disorders including analgesia, mood elevation, muscle relaxation and relief of insomnia, among others; but also they could represent an important new strategy for reduction of tumoral cells due to their direct antiproliferative effects -by modulating key cell-signalling pathways- (Guzmán, 2003; Hall *et al.*, 2005; Lopez-Rodriguez *et al.*, 2005; Pacher *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2003).

However, although the scientific community has gained substantial knowledge of the antitumour actions of cannabinoids during the past few years, further basic research and more exhaustive clinical trials are still required before cannabinoids can be routinely used as anticancer drugs (Guzmán, 2003).

a) Palliative effects of cannabinoids.

Cannabinoids have been known to exert palliative effects in oncology since the early 1970s, and for this reason they are given to patients — although quite restrictedly — in the clinic. In fact, cannabinoids have been successfully used in the treatment of some of the side effects that often accompany cancer, such as nausea and vomiting, weight loss, lack of appetite and pain (Alexander *et al.*, 2009).

Inhibition of nausea and emesis.

Prolonged nausea and vomiting is a devastating side effect that regularly accompanies the administration of cancer chemotherapeutic drugs. This unwanted effect can be so severe that some patients stop their treatments despite the persistence of malignant cancer.

The best-established palliative effect of cannabinoids in cancer patients is the inhibition of chemotherapy-induced nausea and vomiting. Today, capsules of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (dronabinol, Marinol®) and its synthetic analogue nabilone

-LY109514- (Cesamet®) are approved for this purpose (Alexander *et al.*, 2009; Guzmán, 2003; Martin *et al.*, 2004; Mechoulam *et al.*, 2001).

Appetite stimulation.

More than half of the patients with advanced cancer experience lack of appetite and/or weight loss, and they consistently rank anorexia/cachexia as one of the most troublesome symptoms.

Many studies have reported that Δ^9 -THC and other cannabinoids have a stimulatory effect on appetite and increase food intake in animals. These effects are particularly seen when cannabinoids are administered at low to moderate doses, which do not produce marked side effects. In fact, Marinol® and Cesamet® are now prescribed for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS (Guzmán, 2003; Hall *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2004; Mechoulam *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2003).

Pain inhibition.

Pain has a negative impact on the quality of life of cancer patients. Almost half of all patients with cancer experience moderate to severe pain, and it increases in patients with metastatic or advanced-stage cancer.

There is sufficient evidence that cannabinoids produce antinociception by activating CB₁ receptors in the brain (thalamus, periaqueductal grey matter and rostral ventromedial medulla), the spinal cord (dorsal horn) and nerve terminals (dorsal root ganglia and peripheral terminals of primary-afferent neurons), and that endocannabinoids function naturally to suppress pain by inhibiting nociceptive neurotransmission. In addition, peripheral CB₂ and/or CB₂-like receptors might mediate local analgesia, possibly by inhibiting the release of various mediators of pain and inflammation, which could be important in the management of cancer pain. Nowadays, Sativex® is approved in Canada as an adjunctive analgesic treatment in patients with advanced cancer who experience moderate to severe pain.

Potential palliative effects of cannabinoids in cancer patients.

Furthermore, cannabinoids could represent an important new strategy for the treatment of the wide variety of cancer-related disorders including mood

elevation, muscle relaxation and relief of insomnia (Guzmán, 2003; Hall *et al.*, 2005; Lopez-Rodriguez *et al.*, 2005; Pacher *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2003).

b) Antitumoral effects of cannabinoids.

Although cannabinoids are used in the palliative treatment of cancer, they are not yet used as a treatment for tumor progression itself. However, numerous recent studies have suggested that cannabinoids might directly inhibit cancer growth (reviewed in Guzmán, 2003; Guzmán *et al.*, 2002; Massi *et al.*, 2004; Parolaro *et al.*, 2008; Patsos *et al.*, 2005; Velasco *et al.*, 2004) discerning between tumor cells and their non-transformed counterparts. This suggests that agonists of cannabinoid receptors could represent novel tumor-selective tools to treat cancer in addition to their already exploited use as palliative drugs in cancer patients (Pisanti *et al.*, 2009). Therefore, one of the most active and promising areas of current research in the cannabinoid field is the study of the potential application of cannabinoids as antineoplastic drugs (Parolaro *et al.*, 2008).

The antiproliferative properties of cannabis compounds were first reported almost 35 years ago by Munson *et al.* (Munson *et al.*, 1975), who showed that Δ^9 -THC inhibits Lewis lung-adenocarcinoma cell growth *in vitro* and after oral administration to mice. Although these observations were promising, further studies in this area were not carried out until the late 1990s.

Several plant-derived (for example Δ^9 -THC and CBD), synthetic (for example WIN 55,212-2 and HU-210) and endogenous cannabinoids (for example, anandamide and 2 arachidonoylglycerol) have been shown to exert antiproliferative actions on a wide spectrum of tumor cells in culture (Guzmán, 2003; Guzmán, 2005; Ligresti *et al.*, 2006; Massi *et al.*, 2004; McAllister *et al.*, 2005). The molecular determinants for these processes is not yet known and quite complicated, varying depending on the cancer cell type or process studied (Grant *et al.*, 2005).

The present literature suggests that cannabinoids could provide a two-tiered approach for inhibiting tumor growth (Bifulco *et al.*, 2002). First, cannabinoids have been shown to produce direct antiproliferative and apoptotic effects in cell lines derived from many types of cancers (Guzmán *et al.*, 2002). This direct antitumor activity has been primarily attributed to the activation of both CB₁ and

CB₂ receptors but there are also data suggesting that cannabinoids can directly inhibit the growth of cancer through other mechanisms (Massi *et al.*, 2004; McAllister *et al.*, 2005)

More importantly, these cannabinoid antitumoural effects have been demonstrated not only in cell cultures but also in *in vivo* experiments showing that cannabinoid administration to nude mice curbs the growth of various types of tumour xenografts, including lung carcinomas, gliomas, thyroid epitheliomas, skin carcinomas and lymphomas (Pisanti *et al.*, 2009; Velasco *et al.*, 2007).

The proposed antitumour mechanisms are complex and may involve induction of apoptosis in tumor cells, antiproliferative action, and an antimetastatic effect through inhibition of angiogenesis and tumor cell migration (Freimuth *et al.*, 2009; Guzmán, 2003; Guzmán *et al.*, 2002; Parolaro *et al.*, 2008; Patsos *et al.*, 2005; Velasco *et al.*, 2004), as depicted in figure 9.

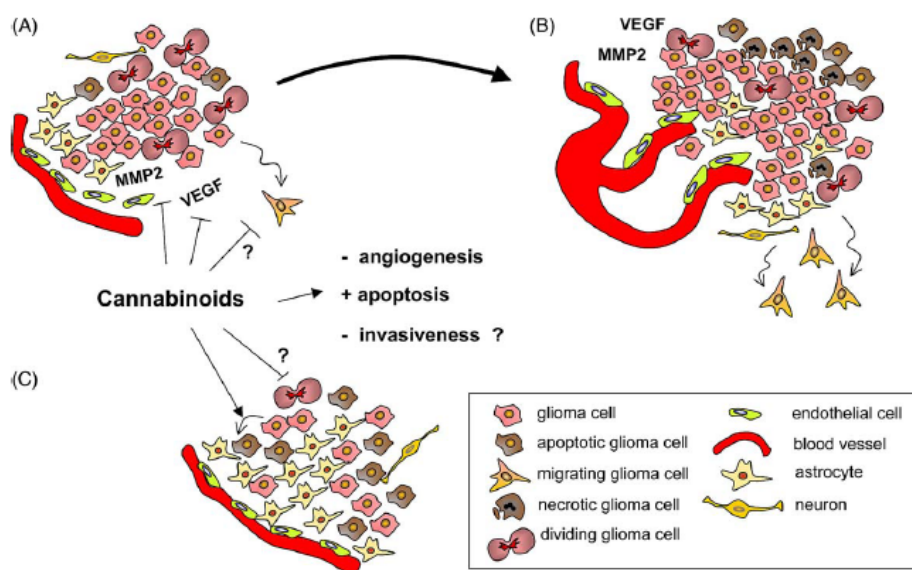


Figure 9. Speculative model of cannabinoid antitumoural action in gliomas. (A) An early stage glioma; (B) The high proliferation rate of tumour cells leads to increased growth and therefore enhanced blood supply demand of gliomas. This leads in turn to the production of proangiogenic factors such as VEGF and of enzymes that allow tissue breakdown and remodelling such as MMP2; (C) Cannabinoids may mediate their antitumoural actions in gliomas via three mechanisms: (1) induction of tumour cell apoptosis—and perhaps growth arrest—of glioma cells, (2) inhibition of tumour angiogenesis and (3) inhibition of tumour cell migration and invasiveness. The latter effect could depend on (i) a direct action of cannabinoids

on tumour cells by inhibiting proangiogenic factor production, and (ii) the inhibition of vascular endothelial cell migration and survival. In addition, cannabinoids might inhibit the expression of matrix metalloproteinases and other factors potentially involved in tumour cell invasiveness (Velasco *et al.*, 2004).

Antitumour compounds should selectively affect tumour cells. It seems that cannabinoids can do this, as they kill tumour cells but do not affect their non-transformed counterparts and might even protect them from cell death, therefore displaying a tumour-selectivity that common cytotoxic agents do not have. The molecular basis of this 'ying-yang' behaviour is not yet completely understood, but could result from the differential capacity of tumour and non-tumour cells to synthesize ceramide in response to cannabinoids (Velasco *et al.*, 2004). Nevertheless, further basic and preclinical research on cannabinoid anticancer properties is required.

Regarding effectiveness, as mentioned above, cannabinoids exert notable antitumour activity in animal models of cancer, but their possible antitumour effect in humans has not been well established. Only a single pilot Phase I/II clinical trial, approved by the Spanish Ministry of Health in 2002, has been performed so far, and the results have been recently disclosed (Guzmán *et al.*, 2006). This study was aimed at evaluating the safety profile of THC administration and its anti-tumor efficacy in a cohort of nine terminal patients affected by recurrent glioblastoma multiforme. The main goal of this study was to assess the safety of intracranial administration of THC and to confirm the absence of significant psychotropic effects at the used regimen.

Glioblastoma multiforme (GBM), or grade IV astrocytoma, is the most frequent class of malignant primary brain tumour and is one of the most malignant forms of cancer. As a consequence, survival after diagnosis is normally just 6–8 months (Guzmán, 2003; Louis *et al.*, 2007; Maher *et al.*, 2001). Present therapeutic strategies for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours are usually inefficient and in most cases just palliative, and include surgery and radiotherapy. Some chemotherapeutic agents, such as temozolomide, carmustin, carboplatin and thalidomide have been tested and the most recent strategies for glioblastoma multiforme treatment are focused on gene therapy, but no trial carried out so far has been successful (Guzmán, 2003; Louis *et al.*, 2007; Maher *et al.*, 2001). For these reasons, one of the main areas of

research in the cannabinoid field is their usefulness as antitumoural agents in GBM as well as the cellular mechanisms underlying these effects.

The use of cannabinoid-derived medications as palliative drugs and the results from the unique clinical trial performed up to now in glioma patients with THC, reassured about the good-safety profile and the absence of significant psychotropic effects at the doses used. The potential adverse effects are enduring and fit well in the range of those induced by commonly used anti-tumor drugs (in fact, they do not produce the generalized toxic effects of conventional chemotherapies) (Guzmán, 2003).

6. Side effects and how to circumvent them.

A widely accepted opinion has been expressed in the report of the US Institute of Medicine (IOM) of 1999 on the medical use of marijuana: “Marijuana is not a completely benign substance. It is a powerful drug with a variety of effects. However, except for the harms associated with smoking, the adverse effects of marijuana are within the range of effects tolerated for other medications” (Watson *et al.*, 2000).

Cannabinoids have a favourable drug safety profile (Guzmán, 2003). Although Δ^9 -THC is a potent drug that may produce psychoactive effects, Δ^9 -THC (and the other cannabinoids) has relatively low toxicity, and lethal doses in humans have not been described (Carter *et al.*, 2004). The median lethal dose (LD_{50}) of oral THC in rats has been reported to be 800–1900 mg/kg depending on sex and strain. There have been no cases of death due to toxicity following the maximum oral THC dose in dogs (up to 3000 mg/kg THC) and monkeys (up to 9000 mg/kg THC) (Adams *et al.*, 1996; Grotenhermen, 2003; Guzmán, 2003). Acute fatal cases due to cannabis use in humans have not been substantiated. Even a long-term high-dose therapy has been tolerated well (Grotenhermen, 2001). Moreover, cannabinoids are usually well tolerated in animal studies and do not produce the generalized toxic effects of most conventional chemotherapeutic agents. However, the use of some cannabinoids, like Δ^9 -THC, in medicine is severely limited by their psychoactive effects.

Therefore, despite the emerging evidence regarding therapeutic activities of cannabinoids, their effective introduction in clinical use is still controversial and strongly limited by the unavoidable psychotropic effects exhibited by many of them. In this context, much attention has been focused on CBD that constitutes up to 40% of the cannabis extract, and represents one of the most promising candidates for clinical utilization due to its remarkable lack of any cognitive and psychoactive actions (Mechoulam *et al.*, 2002a; Scuderi *et al.*, 2008).

Adverse effects

Adverse effects of medical cannabis use are within the range of effects tolerated for other medications. In fact, long-term medical use of cannabis for more than 15 years has been reported to be well-tolerated without significant physical or cognitive impairment (Grotenhermen, 2004).

CB₁/CB₂ receptor agonists can produce adverse effects in patients, and many of these are probably caused by the activation of central CB₁ receptors rather than of CB₂ or peripheral CB₁ receptors.

Acute effects of cannabis mainly pertain to psyche, cognition, psychomotor performance, and circulation (Grotenhermen, 2001). Cannabis and THC may impair memory, attention, reaction time, motor performance and coordination, decreasing the ability to manage cognitive and motor tasks, for example, driving a car (Carlini, 2004).

Cannabis intoxication is usually described as a pleasant and relaxing experience. Use in social context may result in laughter and talkativeness.

Acute physical effects most often observed, at least in clinical trials with multiple sclerosis patients, have been hyposalivation with dry mouth and throat (atropine-like effect), dizziness/light-headedness, increased heart rate, conjunctival injection, decrease of tear flow, possible orthostatic hypotension, tiredness/fatigue, muscle weakness and myalgia (Pertwee, 2008). However, tolerance is developed within a few days (Grotenhermen, 2001).

Other less frequently reported side effects of CB₁/CB₂ agonists include disorientation, feeling of drunkenness, 'high sensation', mental clouding and/or altered time perception, impairment of memory or ability to concentrate, tremor,

balance impairment or lack of coordination, nausea/feeling sick, blurred vision, constipation or diarrhoea, confusion, dysphoria/depression, disorientation, paranoia and hallucinations (Pertwee, 2008).

It is possible, however, for patients being treated with a cannabinoid receptor agonist to optimize the benefit-to-risk ratio by downward self-titration of the dose they take. It is also noteworthy that there is evidence that tolerance develops more readily to some of the unwanted effects of a CB₁/CB₂ receptor agonist than to some of its sought-after therapeutic effects (Pertwee, 2009).

As the unwanted psychotropic effects of cannabinoids are mediated largely or entirely by CB₁ receptors in the brain, a first possibility would be to use cannabinoids that target CB₂ receptors. Selective CB₂-receptor activation in mice induces regression of gliomas and skin carcinomas and can also inhibit pain in the absence of overt signs of psychoactivity (Guzmán, 2003). Moreover, certain cannabinoids that act through non-cannabinoid receptors — and are therefore devoid of psychoactivity — would also be useful in cancer therapy. These include cannabidiol, which inhibits glioma-cell growth *in vitro* and *in vivo* (Massi *et al.*, 2004; Mechoulam *et al.*, 2002b), dexanabinol, of which the effect on tumour-cell growth has not yet been tested, and ajulemic acid, which inhibits glioma-cell growth *in vitro* and *in vivo* -the pharmacological properties of ajulemic acid are, however, controversial-(Guzmán, 2003).

The abuse potential of cannabis may also be limited through the use of preparations with controlled composition and the careful selection of dose and route of administration (Pacher *et al.*, 2006).

On the other hand, the only cannabinoid receptor antagonist to have been licensed as a medicine to date is the CB₁ antagonist/inverse agonist, SR141716A (rimonabant; **Acomplia**[®], Sanofi Aventis). It received EMEA approval in June 2006 for the management of obesity. Adverse reactions experienced by some patients in clinical trials with rimonabant, mainly during the first few months, included nausea, vomiting, diarrhoea, headache, dizziness, arthralgia, insomnia, influenza, feelings of anxiety and depression. Unfortunately, safety concerns about the adverse effects of rimonabant in patients taking it as an anti-obesity agent, particularly an increased incidence of depression and suicidality, prompted the European Medicines Agency in October 2008 to suspend its marketing

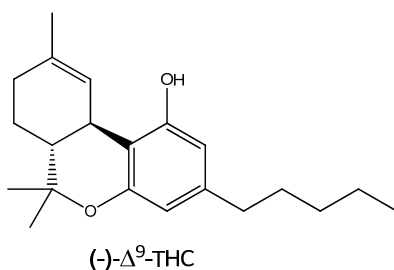
authorisation. Nevertheless, rimonabant does of course remain an extremely valuable experimental tool (Pertwee, 2009).

7. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and cannabidiol.

As reported before, marijuana has been used in medicine for millennia, but it was not until the 1960's when cannabidiol (CBD) first, and of (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) shortly after, the two most abundant Cannabis secondary metabolites, were identified (Gaoni *et al.*, 1964; Mechoulam *et al.*, 1963). Early studies focused more on THC because of its clear psychotropic activity and the social implications of it (De Petrocellis *et al.*, 2009).

As a result, over the last 40 years, cannabinoid chemistry and pharmacology have been the object of thousands of publications.

Although traditionally, most attention has been paid to Δ^9 -tetrahydrocannabinol, over the years interest in cannabidiol (CBD) (figure 10), a non-psychotropic plant constituent which is generally found in relatively high concentrations in Cannabis, has gradually increased (Mechoulam *et al.*, 2007; Pertwee, 2008). CBD is a not intoxicating compound which has shown a wide range of pharmacological activity and, indeed, it has been postulated that the presence of CBD in cannabis may alleviate some of the potentially unwanted effects of THC (Stott *et al.*, 2004).



Isolated in 1964 by Gaoni and Mechoulam, Δ^9 -THC is the primary psychotropic ingredient of Cannabis. It is a partial agonist at CB₁ and CB₂ receptors (K_i approx. 20–40 nM). Δ^9 -THC also activates PPAR- γ (at nanomolar concentrations) and TRPA1 (at micromolar concentrations) (Pertwee, 2008). It is therapeutically used as an antiemetic and to boost appetite in AIDS patients. A Cannabis based-extract with approx 1:1 ratio of Δ^9 -THC and CBD (Sativex®) is marketed in Canada for the symptomatic relief of neuropathic pain in adults with multiple sclerosis and as an adjunctive analgesic treatment for adult patients with advanced cancer (Izzo *et al.*, 2009).

CBD, a major non-psychotropic cannabinoid, was first isolated in 1940 by Adams and coworkers, but its structure and stereochemistry were determined in 1963 by Mechoulam and Shvo. CBD exerts a plethora of pharmacological effects, mediated by multiple mechanisms such as antagonism of CB₁/CB₂ agonist, CB₂ inverse agonism, FAAH inhibition, activation of TRPA1, TRPV1, TRPV2 and PPAR_γ,...

It has been clinically evaluated in anxiety, psychosis, and movement disorders, and to relieve neuropathic pain in patients with multiple sclerosis (in combination with Δ⁹-THC as a 1:1 mixture, i.e. Sativex®) (Izzo *et al.*, 2009).

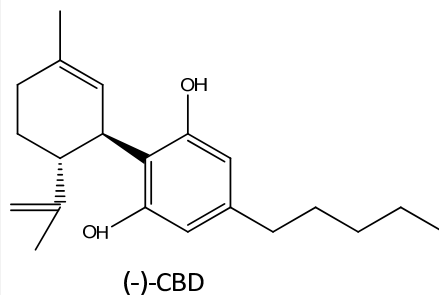


Figure 9. Chemical structures of the two major phytocannabinoids: (-)-Δ⁹-tetrahydrocannabinol (Δ⁹-THC) and (-)-cannabidiol (CBD).

7.1. Pharmacology.

a) Δ⁹-Tetrahydrocannabinol.

Δ⁹-tetrahydrocannabinol (THC) is thought to be the pharmacologically most active cannabinoid of the cannabis plant and its products marijuana (cannabis herb) and hashish (cannabis resin) (Grotenhermen, 2006).

Pharmacological profiling of THC has indicated that it is a partial agonist and binds equally well to the two G-protein-coupled receptors, CB₁ and CB₂, with more potent activity at CB₁ subtypes (Hampson *et al.*, 1998; Razdan, 2009).

Under the clinical point of view, Δ⁹-THC produces some therapeutic benefits which are beyond reasonable doubt. Although so far the only registered indications in the US are the relief of chemotherapy-related nausea and vomiting and the enhancement of appetite particularly in AIDS patients (Mechoulam *et al.*, 1998; Pertwee, 2006a; Thumma *et al.*, 2008a; Watson *et al.*, 2000), THC demonstrates other biological activities, which lend themselves to possible additional therapeutic applications. For example, THC is also found to have analgesic (Martin *et al.*, 1998), anti-inflammatory, neuroprotective (Hampson *et al.*, 1998), anxiolytic (Voth *et al.*, 1997), broncho-dilative, hypotensive, spasmolytic, anticarcinogenic (Adams *et al.*, 1996; Guzmán, 2003; Pertwee, 2008; Pertwee, 1997) and intraocular pressure reducing activity (Baker *et al.*, 2003;

Carlini, 2004; Grotenhermen, 2003; Grotenhermen, 2002; Hazekamp *et al.*, 2006; Mechoulam *et al.*, 1998; Pérez, 2006; Pertwee, 1999b; van Drooge *et al.*, 2005). Its effects on symptoms of multiple sclerosis are clearly demonstrated, and it has been reported that it is also useful in bronchial asthma, epilepsy, Tourette's syndrome and Parkinson's disease (Ben Amar, 2006; Grotenhermen, 2004; Pertwee *et al.*, 2002; Varvel *et al.*, 2005).

Although Δ^9 -THC is largely responsible for the pharmacological effects of cannabis, including its psychoactive properties, several reports have demonstrated that other components of the plant influence its pharmacological activity (Grotenhermen, 2006). One of these components is cannabidiol (CBD).

b) Cannabidiol.

Despite the emerging evidence regarding putative therapeutical activities of cannabinoids, their effective introduction in the clinical use is still controversial and strongly limited by unavoidable psychotropic effects, exhibited by many of them. In this scenario, cannabidiol, which constitutes up to 40% of the Cannabis extract, may represent the most promising candidate for clinical utilization due to its remarkable lack of any cognitive and psychoactive actions, in addition to its excellent tolerability profile in humans (Iuvone *et al.*, 2009; Mechoulam, 1970; Mechoulam *et al.*, 2002b; Pertwee, 2008). Indeed, (-) CBD is the second most prevalent active ingredient in *Cannabis sativa* (Carter *et al.*, 2004), and the main non-psychoactive component of the plant.

In fact, CBD, unlike Δ^9 -THC, exhibits very low affinity for both cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. It has been proposed that it may modulate endocannabinoid function through its ability to inhibit fatty acid amide hydrolase (FAAH, i.e., the enzyme which hydrolyses the endocannabinoid anandamide) (Bisogno *et al.*, 2001; Borrelli *et al.*, 2009; Pertwee, 2008), and the pharmacological interaction of CBD with TRPV1 vanilloid receptors was reported recently (Bisogno *et al.*, 2001). Therefore, it should be noted that not all cannabinoid activities are CB₁/CB₂-mediated. It is thought that this distinct difference in receptor binding may explain why CBD, unlike Δ^9 -THC, is not associated with psychotropic, anxiolytic or sedative effects.

Accordingly, this has prompted the hypothesis that CBD may work synergistically with Δ^9 -THC, antagonizing its psychotropic and sedative activity to enhance potential cannabinoid-mediated therapeutic benefits (Russo *et al.*, 2006). Furthermore, it has been established that coadministration of CBD and Δ^9 -THC may alter the pharmacological effect of the latter, potentiating some reputed benefits of Δ^9 -THC (analgesic, anti-emetic, and anti-carcinogenic properties), whereas attenuating some of its negative effects (tachycardia and bronchodilatation) (Hayakawa *et al.*, 2008; Iuvone *et al.*, 2009; Pérez, 2006; Russo *et al.*, 2006; Scuderi *et al.*, 2008). As a matter of fact, most of the cannabinoid combination therapy data points to the premise of coadministration of Δ^9 -THC and CBD.

CBD is gaining more popularity in Europe, and it seems the drug may be a useful therapy with and without a Δ^9 -THC combination (Stinchcomb *et al.*, 2004). In fact, in the last five years there has been an explosive increase in publications on CBD, with the confirmation of an impressive plethora of pharmacological effects, many of them with therapeutic potential (Grotenhermen, 2004; Iuvone *et al.*, 2009; Mechoulam *et al.*, 2002a; Mechoulam *et al.*, 2002b; Mechoulam *et al.*, 2007; Pacher *et al.*, 2006; Pertwee, 2004; Russo *et al.*, 2006; Scuderi *et al.*, 2008; Vaccani *et al.*, 2005; Zuardi, 2008). In other words, over the last few years, CBD has been claimed to be useful in the treatment of various medical conditions, such as multiple sclerosis (Wade *et al.*, 2006; Zajicek *et al.*, 2003), pain (Costa *et al.*, 2007), epilepsy, glaucoma, central and peripheral inflammatory disorders (Pertwee, 2004), anxiety, acute schizophrenia, dystonia, Parkinson's disease (Lastres-Becker *et al.*, 2006), diabetes, as neuroprotective, anti-nausea, antiemetic, antitumoral, antirheumatoid arthritic (Malfait *et al.*, 2000) or antipsychotic agent (Grotenhermen, 2006; Izzo *et al.*, 2009; Mechoulam *et al.*, 2002b; Mechoulam *et al.*, 2007; Pacher *et al.*, 2006; Pertwee, 2008; Scuderi *et al.*, 2008; Zuardi *et al.*, 2006). CBD also modulates Δ^9 -THC metabolism by blocking its conversion to the more psychoactive 11-hydroxy-THC, prevents glutamate excitotoxicity, serves as a powerful anti-oxidant (Hampson *et al.*, 1998), and has notable neuroprotective and immunomodulatory effects (Malfait *et al.*, 2000; Razdan, 2009). The plethora of positive pharmacological effects observed with CBD make this compound a highly attractive therapeutic entity (Mechoulam *et al.*, 2007). Indeed, together with Δ^9 -THC, cannabidiol is a major constituent of Sativex[®], a medicine that is now

licensed in Canada for neuropathic pain associated with multiple sclerosis (Thomas *et al.*, 2007) and as an adjunctive analgesic in adult patients with advanced cancer pain. Moreover, in February 2009 a Phase III clinical trial demonstrated its efficacy in combination with Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Sativex[®], GW Pharmaceuticals Ltd., UK) for the treatment of multiple sclerosis-associated muscle disorders.

These early data, together with the lack of psychotropic effects -which allows it to be administered in higher doses than would be possible with psychotropic cannabinoids, such as Δ^9 -tetrahydrocannabinol-, and the low toxicity (Cunha *et al.*, 1980; Lodzki *et al.*, 2003; Malfait *et al.*, 2000), supports the notion that CBD may be considered a potentially useful therapeutic agent for the treatment of a number of neurological disorders (Scuderi *et al.*, 2008). Furthermore, CBD is a compound well tolerated in humans, with a profile of very low toxicity, and devoid of psychoactive and cognitive effects (Scuderi *et al.*, 2008).

Although the range of its clinical effect is impressive; however, up to the present, the molecular mechanisms through which CBD exerts its action remain elusive (Iuvone *et al.*, 2009; Scuderi *et al.*, 2008).

Toxicity.

The overall acute toxicity of THC is low. The mean lethal dose (that which kills 50% of animals) of oral THC in rats is 800mg/kg to 1900 mg/kg depending on sex and strain (Bealieu, 2005).

Acute CBD administration by the oral, inhalatory or intravenous route did not induce any significant toxic effect in humans. In fact, the available clinical data suggest that CBD can be safely administered over a wide dose range (Zuardi *et al.*, 2006). The LD₅₀ after intravenous administration to rhesus monkeys was 212 mg/kg (Mechoulam *et al.*, 2002b; Scuderi *et al.*, 2008).

In conclusion, CBD particular properties make it a good candidate: firstly, the lack of psychoactivity associated with CBD allows it to be administered in higher doses than would be possible with psychotropic cannabinoids, such as Δ^9 -tetrahydrocannabinol; secondly, CBD is not toxic, even when chronically administered to humans or given at high doses of 10mg/kg/day (Lodzki *et al.*, 2003).

7.2. Physicochemical properties.

A brief summary of cannabinoid physicochemical properties is shown in the following table:

Table 4. Physicochemical properties of CBD and Δ^9 -THC.

	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC)	Cannabidiol (CBD)
<i>Systematic (IUPAC) name</i>	(6 <i>aR</i> ,10 <i>aR</i>)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6 <i>a</i> ,7,8,10 <i>a</i> -tetrahydro-6 <i>H</i> -benzo[<i>c</i>]chromen-1-ol	2-[(1 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-3-Methyl-6-(prop-1-en-2-yl)-2-cyclohexen-1-yl]-5-pentyl-1,3-benzenediol
<i>INN*</i>	Dronabinol	
<i>CAS-Number</i>	1972-08-3	13956-29-1
<i>Stereochemistry</i>	(6 <i>aR</i> ,10 <i>aR</i>)	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)
<i>Molecular formula</i>	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
<i>Molecular weight</i>	314.472 g/mol	314.472 g/mol
<i>Physical state</i>	Pale yellow amorphous sticky resin	crystals
<i>Glass transition (T_g)</i>	9.3 °C	-
<i>Melting point</i>	Not detected	67,99 °C
<i>Boiling point</i>	155-157 °C (vacuum, 0.07 mbar) 200°C (at 0.02 mmHg)	
<i>Solubility (water)</i>	0.1 µg/mL ^a 2.8 mg/L in pure water at 23 °C ^b	0.1 µg/mL ^a
<i>Solubility (saline)</i>	0.77 mg/L in NaCl 0.15 M at 23°C	
<i>pK_a'</i>	10.6	
<i>Log K_{ow}</i>	6.97 (HPLC); 7.18 (computer) ^c	5.79 (HPLC); 6.92 (computer) ^c
<i>logP</i>	3.78 (water @ pH 7 / octanol)	
<i>Rotation of polarized light</i>	[α] _D ²⁰ = -150.5° (c=0,53 in CHCl ₃)	
<i>UV maxima</i>	275-282 nm in ethanol	

*Dronabinol is the international non-proprietary name (INN) for Δ^9 -THC, the main psychoactive compound of cannabis.

** Δ^9 -THC can also be found in the literature as Δ^1 -THC, due to the existence of two numbering systems for cannabinoids.

^a(Mannila *et al.*, 2007); ^b(Garrett *et al.*, 1974a); ^c(Mechoulam, 1981; Thomas *et al.*, 1990).

Molecule

Both natural (-) Δ^9 -THC and CBD have two chiral centres at C-6a and C-10a (in THC) in the *trans* configuration as shown in figure 11.

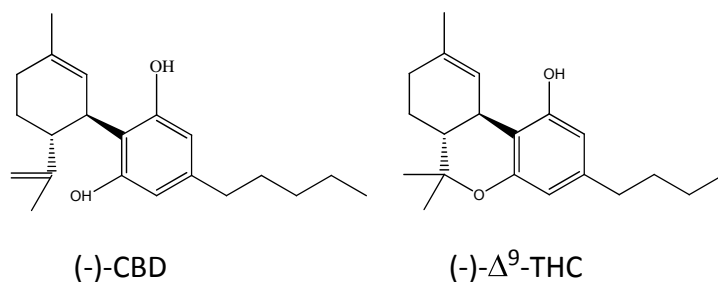


Figure. 11. Structures of (-)-cannabidiol and (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

Nature

Δ^9 -THC is an oily resin that is viscous and sticky at ambient conditions and hardens upon refrigeration (Flora *et al.*, 1981; Repka *et al.*, 2006). The Tg of THC was reported to be 9.3 ± 1.0 °C (Munjaj *et al.*, 2006c; van Drooge *et al.*, 2004), necessitating its storage at relatively low temperatures for stability purposes. The absence of any melting peak on the THC thermogram suggested that the drug was not crystalline. Furthermore, the low Tg is indicative of a high segmental mobility of the molecule (Munjaj *et al.*, 2006c). In fact, Δ^9 -THC molecule is flexible due to the relatively flexible carbon chain (Repka *et al.*, 2006) and, Δ^9 -THC itself possess mucoadhesive properties (Repka *et al.*, 2006).

Δ^9 -THC is **difficult to handle** because it is a gummy-type material which is best described in appearance as similar to “rubber cement.” This, together with cannabinoids tendency to bind avidly to plastic, metal and glassware, makes **difficult to accurately weigh small amounts** and **prepare suspensions for injection** (Dewey, 1986; Pertwee, 1997).

On the other hand, the crystal nature of CBD was determined by Jones *et al.* in 1977 (Lodzki *et al.*, 2003; Mechoulam *et al.*, 2002a; Windholz, 1983).

Solubility

Cannabinoids are highly lipid-soluble neutral compounds (Mechoulam *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 2003) with a very high octanol-water partition coefficient (that of Δ^9 -THC was reported to be of the order of 6,000 (Gill *et al.*, 1972); and all pharmacologically active cannabinoid compounds have log $P_{o/w}$ values higher than 4.5) (Lodzki *et al.*, 2003; Mechoulam, 1981; Thomas *et al.*, 1990).

Neither CBD, which has two phenolic groups, nor Δ^9 -THC, which has one such group, are soluble in dilute base (Mechoulam, 1981).

Methanol is the most effective extracting solvent of those tested (Smith *et al.*, 1977).

Therefore, one practical difficulty associated with the bioassay of cannabinoids both *in vivo* and *in vitro* is the high lipophilicity of these compounds, as this necessitates the use of a nonaqueous solvent or a dispersing agent to make a solution or suspension (Garrett *et al.*, 1974a; Howlett, 2002; Lichtman *et al.*, 2000; Mechoulam *et al.*, 2001). **Therefore, cannabinoid lipophilicity restricts their use in most pharmaceutical preparations and some research experiments** (Garrett *et al.*, 1974a; Hazekamp *et al.*, 2006; Jarho *et al.*, 1998), **being an obstacle for their therapeutic use** (Rashidi *et al.*, 2005). This can be a critical factor in its bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacological action.

Hence, one of the major problems encountered by researchers working with cannabinoids has been the choice of an appropriate vehicle for their administration (Dewey, 1986).

The most commonly used vehicles for the *in vivo* or *in vitro* administration of cannabinoid receptor agonists and antagonists include olive oil (given intraperitoneally), polyethylene glycol or Tween®80-saline given by any route. Ethanol, dimethyl formamide, dimethylsulphoxide, Cremophor®, Emulphor®, bovine serum albumin (BSA), gum Arabic, propylene glycols and polyvinylpyrrolidone (PVP) have also been employed. These are used singly or in

combination, either by themselves or mixed with water or saline (Dewey, 1986; Howlett, 2002).

However, such vehicles often bind/sequester cannabinoid molecules so as to reduce the concentration of these molecules in free solution. They may also be pharmacologically active or interact synergistically or antagonistically with cannabinoids (Pertwee, 1997). For example, many investigators have studied the effects of cannabinoids when dissolved in ethyl alcohol. It is clear that both ethyl alcohol and cannabinoids are predominantly CNS depressants, and therefore it is not surprising that these two substances might act at least additively, and possibly synergistically, when injected together (Dewey, 1986). In addition, these vehicles may also affect the apparent potencies of cannabinoid receptor ligands, or may themselves produce pharmacological changes, for example, by perturbing membrane phospholipids. Consequently, the results obtained using such vehicles should be interpreted with caution and vehicle control experiments are vital (Howlett *et al.*, 2002).

One of the problems with serum albumin is that the Δ^9 -THC is bound to the albumin, and equilibrium is established between the albumin injected and the albumin in the bloodstream. Obviously, some of the cannabinoid is bound and not available for the target tissue. As a result, in most procedures Δ^9 -THC is less potent when injected as an albumin suspension than when it is solubilized or suspended in another vehicle.

The widest discrepancy appears in the effects of Δ^9 -THC when injected in alcohol and when injected in serum albumin. These examples may be considered to be the two extremes of the problem of choosing a vehicle for cannabinoids. However, one should be very critical when reading the literature and keep in mind the importance of the effects of different vehicles on the potency of the cannabinoids.

Nevertheless, there has never been a case where the vehicle has changed the qualitative effects of cannabinoids in animals, only the quantitative aspects, the onset or the duration of action (Borgen *et al.*, 1973; Dewey, 1986).

Moreover, the suspensions prepared by dissolving the cannabinoid in a dispersing agent and diluted with water are not stable and should be used

shortly after preparation (Mechoulam, 1981). Nonetheless, solutions of cannabinoids in ethanol kept at 0°C in the dark are stable for months or years (Mechoulam, 1981).

pKa

The pKa value of Δ^9 -THC has been shown to be 10.6 at 25°C (Garrett *et al.*, 1974a; Mechoulam, 1981).

Regarding CBD pKa value no data was found in the literature.

Binding to glass, plastics and teflon

Δ^9 -THC binds to glass and membranes (Garrett *et al.*, 1974a) and the possibility that there is competition by these surfaces for THC during *in vitro* experiments should not be ignored (Mechoulam, 1981). The rate and extent of Δ^9 -THC glass binding in aqueous solution has been reported to be dependent on the surface area of the glass as well as the concentration of the drug (20 and 40% at 0.1 and 0.05 $\mu\text{g/ml}$, respectively in 50 mL volumetric flasks). However, it could be minimized by silyl pre-treatment of the glass. It has been reported that vigorous shaking immediately prior to sampling reduced the degree of binding, but no more than 50% in any case, although the fraction bound rapidly increased on further standing (Garrett *et al.*, 1974a).

In addition, the drug rapidly diffuses into plastics, and of greater importance in light of the normal handling of samples of biological fluids is the fact that 70-90% of the drug was taken up by the rubber closures used for plasma vials (Garrett *et al.*, 1974a).

Moreover, polycarbonate, polypropylene, teflon and stainless steel containers showed more extensive binding than glass (Garrett *et al.*, 1974a).

Consequently, **the rapid diffusion of Δ^9 -THC into the plastic of containers and into the rubber stoppers normally used as closures for plasma vials (70-97%), and the significant binding to glass at low Δ^9 -THC concentrations definitely demand careful techniques in the handling, storage, and assay** of this compound from aqueous and biological fluids (Garrett *et al.*, 1974a).

No data regarding CBD binding to glass, plastic, teflon has been reported although all cannabinoids –due to their extreme lipophilicity- seem to bind to these surfaces.

7.3. Cannabinoid stability.

As traditionally most attention has been paid to Δ^9 -tetrahydrocannabinol, most of the stability studies have focused on this cannabinoid. Hence, nowadays it is well established that Δ^9 -THC is a highly unstable drug which is susceptible to decomposition by oxidation, heat and light (Mechoulam, 1970; Munjal *et al.*, 2006a).

In fact, its low Tg is indicative of a high segmental mobility of the molecule, due to which it can undergo chemical interactions or reactions leading to degradation (Munjal *et al.*, 2006c).

Consequently, one of the most important aspects for the formulation of THC dosage forms is to overcome the stability problem (Munjal *et al.*, 2006c).

7.3.1. Oxygen.

Δ^9 -THC is very susceptible to oxidation. Indeed, when pure Δ^9 -THC is exposed to air its colour rapidly changes from yellow to purple and subsequently to brown. These colour changes indicate degradation of the material (Mechoulam, 1981; Mechoulam, 1970; Razdan, 1972; van Drooge *et al.*, 2004).

In fact, Δ^9 -THC is an amorphous drug which means it has greater mobility and lacks crystal-lattice stabilization energy, thereby, permitting higher oxygen solubility and permeability. This also facilitates electron transfer to oxygen, thereby, stimulating the oxidation reaction. Therefore, on exposure to air it slowly converts into cannabinol (CBN) (Fairbairn *et al.*, 1976). This is due to the lability of the C3 hydrogen, which is both allylic and benzylic (Mechoulam, 1981). As a result, it has been reported that Δ^9 -THC and other cannabinoids such as CBD are potent antioxidants (Hampson *et al.*, 1998).

Presence of CBN, the most widely recognized thermo-oxidative degradation product of Δ^9 -THC, in the material is indicative of drug degradation by oxidation (Munjal *et al.*, 2006b; Repka *et al.*, 2006). A mechanism for its formation (figure 12, structures I-V) has been proposed by Turner and ElSohly (Turner *et al.*, 1979).

However, other degradation products may also be formed besides CBN (Harvey, 1990; Repka *et al.*, 2006).

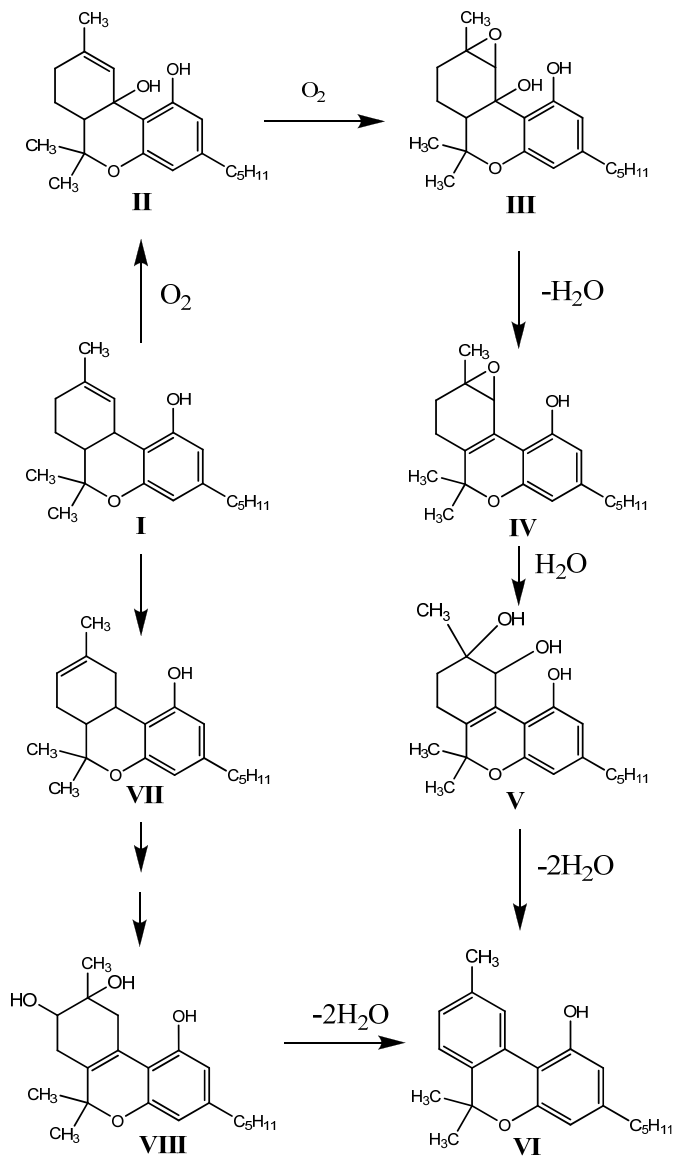


Figure 12. Proposed pathways for decomposition of Δ^9 -THC (I) to its primary degradant, Cannabinol (VI) (adapted from Turner & ElSohly, 1979).

I= Δ^9 -Tetrahydrocannabinol

II and III: Intermediates in the formation of IV

V=9,10-dihydroxy- $\Delta^6a(10a)$ -THC (racemic mixture)

VI= Cannabinol

VII= Δ^8 -Tetrahydrocannabinol

VIII=8,9-dihydroxy- $\Delta^6a(10a)$ -THC (racemic mixture)

CBD is easily oxidized, in the presence of base, to coloured monomeric and dimeric hydroxy-quinones. The anions of the oxidized compounds have a deep violet colour. This is the basis of the Beam reaction used for identification of Cannabis (Mechoulam *et al.*, 2002a). In the crystal form or in ethanolic solution CBD is, however, quite stable (Mechoulam, 1981).

7.3.2. Temperature.

Δ^9 -THC is known to be thermolabile (Fairbairn *et al.*, 1976; Munjal *et al.*, 2006a; van Drooge *et al.*, 2004). In fact, its Tg is below 25°C, necessitating its storage at relatively low temperatures for stability purposes (Munjal *et al.*, 2006c).

Stock solutions of Δ^9 -THC in methanol stored at -20°C or 0°C are stable for at least 1 year (Zoller *et al.*, 2000), but some authors have reported that after 7 days at 80°C THC disappeared completely with the concomitant appearance of CBN (Razdan, 1972), and considerable losses occurred at 85 and 100°C (Fairbairn *et al.*, 1976; Munjal *et al.*, 2006b).

Nevertheless, other authors have reported that most cannabinoids are stable to heat in the absence of air (Mechoulam, 1981). Thus, Δ^9 -THC begins to decompose at 170°C and the onset of rapid degradation is 200°C (Munjal *et al.*, 2006c).

7.3.3. pH

Acid conditions

It has been reported that Δ^9 -THC degrades readily in acid solutions, having a half-life of about 15 min at 37°C and pH 1- typical stomach conditions-, and a $t_{1/2}$ of 1h at pH 1.0 at 55°C, isomerizing to $\Delta^{1(6)}$ -THC (Garrett *et al.*, 1978; Garrett *et al.*, 1974b; Grotenhermen, 2003; Mechoulam, 1981; Mechoulam, 1970).

Also, exposure to acid can oxidize THC to CBN, a much less potent cannabinoid (Huestis, 2007).

With regard to cannabidiol, it was found to be converted to 9 α -hydroxyhexahydrocannabinol (9 α -OH-HHC) and 8-hydroxyiso-hexahydrocannabinol (8-OH-iso-HHC) together with cannabinol (CBN) and Δ^9 -

tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) in artificial gastric juice (Mechoulam *et al.*, 2002a; Watanabe *et al.*, 2007).

Therefore, the large instability of cannabinoids in acid solution implies that the drug may be significantly degraded in the normal stomach (van Drooge *et al.*, 2004). This may account in part for the poor and variable availability of the drug when given orally (Garrett *et al.*, 1974b).

Basic conditions

On the other hand, it has been reported that THC dissolved in basic solutions is more stable. No decomposition was detectable after 22h at 45°C in a solution of 3.1 $\mu\text{g/ml}$ THC in 0,62M methanolic potassium hydroxide, and a decomposition of 9% after 21h at 45°C in a solution of 2.6 $\mu\text{g/ml}$ THC in MeOH-1.24 M aqueous potassium hydroxide solution (1:1, v/v) was observed (Zoller *et al.*, 2000).

No data concerning CBD stability under basic conditions were found in the literature.

7.3.4. Light.

It has been reported that cannabinoids are photolabile compounds (Mechoulam, 1981), especially in solution, which should therefore be protected from light during analytical and phytochemical operations (Fairbairn *et al.*, 1976). In fact, UV light can accelerate Δ^9 -THC degradation (Repka *et al.*, 2006) and daylight causes appreciable decomposition of both acidic and neutral cannabinoids in solution (Smith *et al.*, 1977).

Specifically, Δ^9 -THC in solution (in ethanol) decomposes relatively rapidly under the influence of light and air (about 1% per day in THC content), resulting in formation of degradation products Δ^8 -THC and cannabinol (CBN) (Fairbairn *et al.*, 1976; Harvey, 1990; Hazekamp *et al.*, 2005).

However, van Drooge *and cols.* did not observe any changes in THC content when stored under N_2 atmosphere but exposed to daylight within at least a year (van Drooge *et al.*, 2004). Therefore, not all the authors agree about the light induced degradation of THC (Fairbairn *et al.*, 1976).

The question of CBD decomposition is more complex and controversial than that of THC (Smith *et al.*, 1977). It has been reported that irradiation of CBD in

methanol with a 450 W lamp in a Corex vessel gave a mixture from which mainly isomeric 1- methoxy dihydro CBD's were obtained (Shani and Mechoulam, 1971). These reactions indicate that CBD is photoreactive and should be guarded from light when stored (Mechoulam *et al.*, 2002a).

7.3.5. RH

It has been reported that pure Δ^9 -THC when stored at higher RH degraded to a lesser extent than when stored at lower RH (Munjal *et al.*, 2006b).

It is important to point out that several reports indicate that ethanol may exert a marked stabilizing effect on THC (Fairbairn *et al.*, 1976; Harvey, 1990; Harvey *et al.*, 1990; Razdan, 1972).

7.4. Cannabinoid pharmacokinetics.

Cannabinoid pharmacokinetic research has been especially challenging due to low analyte concentrations, rapid and extensive metabolism, and physicochemical characteristics that hinder the separation of drugs of interest from biological matrices –and from each other- and lower drug recovery due to adsorption of compounds of interest to multiple surfaces (Huestis, 2005a).

The pharmacokinetically best studied cannabinoid is Δ^9 -THC, so in this section mainly the THC pharmacokinetics are described. Several authors have reported that the pharmacokinetic profile of CBD and CBN -the THC decomposition product formed by oxidation- are similar of that of THC (Agurell *et al.*, 1986; Brenneisen, 2001; Grotenhermen, 2003). Nevertheless, it should be pointed out that the pharmacokinetics of CBD is quite complicated (Mechoulam *et al.*, 2002b; Samara *et al.*, 1988) and, to date, it is not fully described (Scuderi *et al.*, 2008).

No significant differences in the pharmacokinetics of women and men have been found.

The complexity of the pharmacokinetic properties of Δ^9 -THC influencing its pharmacodynamic characteristics is shown in figure 13.

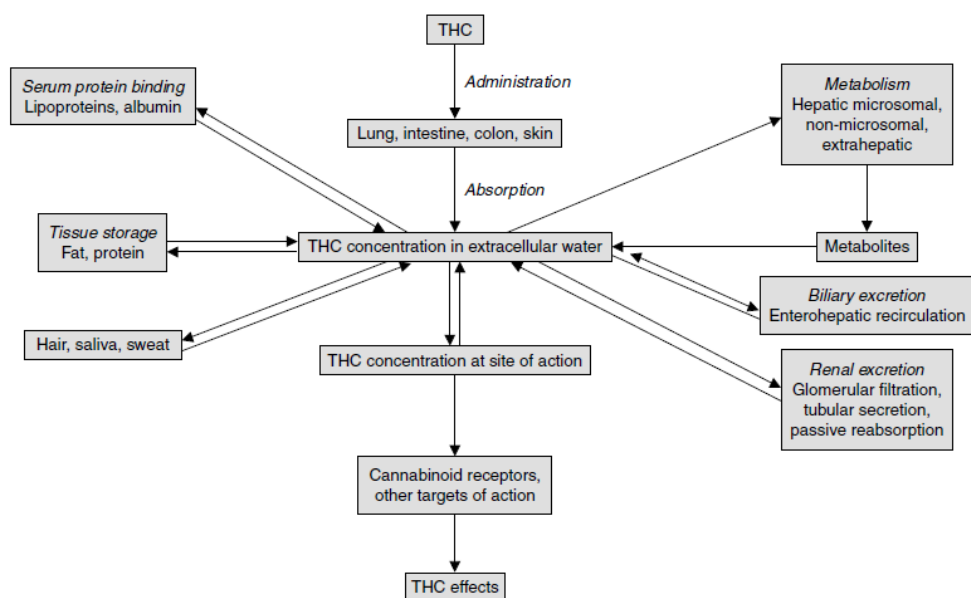


Figure 13. Pharmacokinetic properties of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (reproduced from (Brenneisen, 2001; Grotenhermen, 2003).

7.4.1. Absorption and bioavailability.

Absorption, together with first pass metabolism, is an important determinant of the pharmacokinetics of the cannabinoids (Carter *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2003) as can be observed in table 5.

Table 5. Summary of Δ^9 -THC pharmacokinetics (reproduced from Walsh *et al.*, 2003).

Route	Peak concentration	Half-life	Peak effects	Duration of action	Bioavailability
<i>Inhalation</i> (Lindgren <i>et al.</i> , 1980)	Within minutes Decreases to 10% of the peak level in 1-2 h	28-57 h	15-90 min	<2-4 h	18%
<i>Intravenous</i> (Harvey, 1984)	Within minutes	NA	30 min	NA	NA
<i>Oral</i> (Harvey, 1984; Ohlsson <i>et al.</i> , 1980)	2-4 h	36 h	30-180 min	4-6 h for psychoactive 24 h for appetite	10-20%

NA: not applicable

❖ **Pulmonary.**

Smoking is the principal route of cannabis administration. A very rapid absorption occurs after the inhalation of cannabis smoke. In fact, THC is detectable in plasma only seconds after the first puff (Brenneisen, 2001).

The number, duration, and spacing of puffs, depth of inhalation and breathhold time greatly influence the degree of drug exposure (Huestis, 2007). Bioavailability following the smoking route was reported as 10-35% (Doyle *et al.*, 1995; Grotenhermen, 2003; McGilveray, 2005; Nocerino *et al.*, 2000), due in part to intra- and inter-subject variability in smoking dynamics, which contributes to uncertainty in dose delivery (Huestis, 2005b). During smoking, the bioavailability of Δ^9 -THC is limited by pyrolysis, loss through side stream smoke, inefficient absorption in the lung, and, to a small extent, by metabolism in the lung before entering the systemic circulation (Aguirell *et al.*, 1986). In fact, only a maximum of 27% of the active ingredients can actually be absorbed by the patient (Carter *et al.*, 2004).

Pulmonary assimilation of inhaled Δ^9 -THC causes a maximum plasma concentration within 3-10 minutes, psychotropic effects start within seconds to a few minutes –due to its delivery to the brain, contributing to its abuse potential-, reach a maximum after 15–30 minutes, and taper off within 2–3 hours (Grotenhermen, 2003).

However, the advantages of cannabinoid smoking are offset by the harmful effects of cannabinoid smoke; hence smoking is generally not recommended for therapeutic applications (Huestis, 2007).

The bioavailability of inhaled CBD was reported to be 31% (range 11– 45%) (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2005a; Ohlsson *et al.*, 1986; Samara *et al.*, 1990).

❖ **Oral.**

The absorption after oral ingestion (for example, as capsules containing a solution of THC in sesame oil, marketed as Marinol®) is slow, unpredictable and erratic (Brenneisen, 2001), resulting in maximal plasma concentrations usually after 60-120 minutes and a bioavailability of 10-20% (Grotenhermen, 2003;

Huestis, 2007). Therefore, onset is delayed, peak concentrations are lower, but duration of pharmacodynamic effects is generally extended when THC is administered by the oral as compared to the smoked route (Huestis, 2007; Nocerino *et al.*, 2000).

Several factors may account for the low oral bioavailability, including variable absorption, degradation of drug in the stomach, and extensive first-pass liver metabolism to active 11- OH-THC and inactive metabolites (Brenneisen, 2001; Walsh *et al.*, 2003). Furthermore, THC oral bioavailability has been reported to depend on the vehicle and co-ingested food (Huestis, 1999; Naef *et al.*, 2004).

Regarding CBD, it is barely absorbed after oral administration. Its oral bioavailability ranges between 13% and 19%, which may be due to a first-pass effect (Mechoulam *et al.*, 2002b).

Due to the low bioavailability of oral Δ^9 -THC formulations, alternative routes of drug administration, including sublingual dosing, vaporization of product and inhalation, and rectal administration, have been developed to improve the amount of delivered cannabinoids (Huestis, 2007).

❖ **Other routes:**

• **Sublingual.**

Due to their high lipophilicity, cannabinoids are readily absorbed. Furthermore, sublingual administration avoids first-pass metabolism by the liver (Munjal *et al.*, 2006c).

• **Rectal.**

The absorption of rectal preparations is lower but more constant than with oral formulations (Brenneisen, 2001). Using THC ester (hemisuccinate) suppositories the bioavailability of the rectal route was approximately twice that of the oral route due to a lower first-pass metabolism (ElSohly *et al.*, 1991).

• **Dermal.**

Transdermal delivery would also bypass the first-pass metabolism of cannabinoids (Stinchcomb *et al.*, 2004). Although still in the early stages of research, dermal administration of THC is also being

explored as a means of improving THC bioavailability (Huestis, 2005a; Stinchcomb *et al.*, 2004). Cannabinoids are highly hydrophobic, making transport across the aqueous layer of the skin the rate-limiting step in the diffusion process (Valiveti *et al.*, 2004). To date, no pharmacokinetic data from controlled clinical studies are available for the transdermal application of THC.

7.4.2. Distribution.

Distribution of Δ^9 -THC begins immediately and rapidly after absorption. Tissue distribution of Δ^9 -THC and its metabolites is assumed to be governed only by their physicochemical properties, with no specific transport processes or barriers affecting the concentration of the drug in the tissues (Grotenhermen, 2003). Thus, as Δ^9 -THC is highly lipophilic, it is initially taken up by highly vascularized tissues. High concentrations are found at short times after drug administration in the main distribution sites such as heart, brain, lung, gut, kidney, spleen, liver, mammary gland, placenta, adrenal cortex, thyroid, and pituitary gland, resulting in a rapid decrease in plasma concentration (Brenneisen, 2001; Grotenhermen, 2003; Huestis, 2005b; McGilveray, 2005). Subsequently, intensive accumulation occurs in less vascularised tissues and finally in body fat, the major long-term storage site, resulting in concentration rates between fat and plasma of up to 10⁴:1 (Grotenhermen, 2003; McGilveray, 2005). Hence, the release of cannabinoids from fatty tissue is responsible for their prolonged terminal elimination half-life.

The time course of plasma concentrations of cannabinoids has been described to fit to open two-compartment, three-compartment or four-compartment models. Even five- and six-compartment models have been found in computer models to best fit the Δ^9 -THC plasma course in animals (Aguirell *et al.*, 1986; Grotenhermen, 2003).

It has also been reported that in animals and humans, unchanged THC rapidly crosses the placenta, and also appears in breast milk (Brenneisen, 2001; Grotenhermen, 2003).

The apparent volume of distribution of Δ^9 -THC is small for a lipophilic drug, equivalent to the plasma volume of about 2.5–3L, reflecting high protein binding

that complicates initial disposition. The steady-state volume of distribution has been estimated to be more than 100 times larger, in the range of about 10 liters per kg body weight, typical for lipophilic compounds and clearly indicates the accumulation of the drug in deeper compartments (Agurell *et al.*, 1986; Brenneisen, 2001; Grotenhermen, 2003; McGilveray, 2005). More recently, with the benefit of advanced analytical techniques, the steady state V_d value of THC was estimated to be 3.4 L/kg (Grotenhermen, 2003).

About 90% of Δ^9 -THC in the blood is distributed to the plasma, another 10% to red blood cells. 95–99% of plasma Δ^9 -THC is bound to plasma proteins, mainly to lipoproteins (about 60 percent, low-density fraction) and less to albumin, and only about 3% of free THC is found in plasma. For 11-hydroxy-THC a binding rate of 94 to 99% has been determined (Brenneisen, 2001; Carter *et al.*, 2004; Grotenhermen, 2003; McGilveray, 2005).

CBD volume distribution has been reported to be about 30 L/kg, greater than for THC (Ohlsson, 1984), and the plasma clearance similar to that of THC, ranging from 58 to 94 L/h (960-1560 mL/min), with an average $t_{1/2\beta}$ of 24 hours (18-33h) (Agurell *et al.*, 1986; Grotenhermen, 2003).

In dogs it was shown that there is a low uptake of CBD by the blood cells. It has also been reported that CBD, like Δ^9 -THC, is highly bound to serum proteins (Lodzki *et al.*, 2003).

7.4.3. Elimination.

Metabolism.

Metabolism is the primary pathway of elimination for cannabinoids.

The metabolic pathway of the cannabinoids is very complex. More than 100 metabolites, including di- and trihydroxy compounds, ketones, aldehydes, and carboxylic acids, have been identified for THC alone (Ashton, 2001; Brenneisen, 2001; Grotenhermen, 2003; Harvey, 1984). No significant differences in metabolism between men and women have been reported (Huestis, 2005a).

The main metabolizing organ is the liver, although other tissues, including brain, lung and intestine, may contribute to the metabolism of THC but to a lesser extent (Brenneisen, 2001; Huestis, 2005b).

As depicted in figure 14, THC metabolism occurs by microsomal hydroxylation and oxidation catalysed by enzymes of the cytochrome P450 (CYP) complex (Grotenhermen, 2003; McGilveray, 2005). Specifically, CYP 450 2C9, 2C19, and 3A4 are involved in the oxidation of Δ^9 -THC (Huestis, 2007).

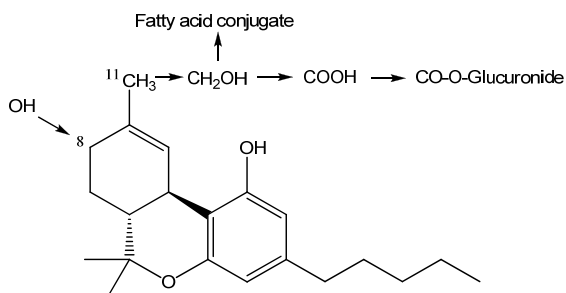


Figure 14. Main metabolic pathways of Δ^9 -THC tetrahydrocannabinol, reproduced from (Grotenhermen, 2003).

Phase-I oxidation reactions of Δ^9 -THC (figures 14 and 15) include allylic and aliphatic hydroxylations, oxidation of alcohols to ketones and acids, β -oxidation, and degradation of the pentyl side chain (Huestis, 2005b; Mechoulam, 1981). Microsomal hydroxylation by the hepatic cytochrome P-450 isoenzyme CYP2C9 at the allylic carbon atom of ring A leads to the production of 11-hydroxy-THC, which is the main pharmacologically active metabolite being possibly more potent than THC itself and being probably responsible for some other effects of cannabis (Adams *et al.*, 1996; Ashton, 2001; McGilveray, 2005). Hydroxylation of THC by the isoenzyme CYP3A leads to 8- β -hydroxy-THC, epoxy hexahydrocannabinol, and other minor metabolites (Huestis, 2005a). Subsequently, oxidation of the psychoactive 11-OH-THC by cytochrome P-450 isoenzymes produces the inactive, non-psychoactive metabolite 11-nor-9-carboxy-THC (THC-COOH) (Brenneisen, 2001; McGilveray, 2005).

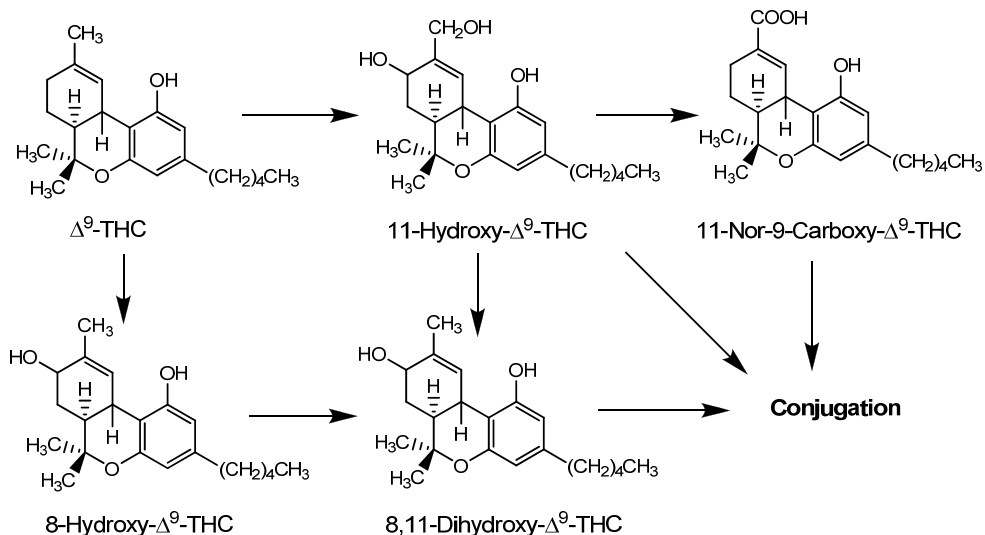


Figure 15. Major metabolic routes for Δ^9 -THC in humans (Huestis, 2005a).

Following oxidation, the phase II metabolites of the free drug or hydroxy-THC appear to be glucuronide conjugates that appear in the urine. The dominating phase-II metabolite is the O-ester glucuronide of THC-COOH (Brenneisen, 2001). Addition of sulphate, glutathione, amino acids and fatty acids via the C11 carboxyl group is less common (Huestis, 2005a).

Although addition of the glucuronide group improves water solubility facilitating excretion, renal clearance of these polar metabolites is low due to extensive protein binding (Huestis, 2005a).

Conjugated with long chain fatty acids have a more lipophilic character and are thought to be the form in which THC may be stored within tissues (Brenneisen, 2001). In fact, after the initial distribution phase, the rate-limiting step in the metabolism of THC is its redistribution from lipid depots into blood (Huestis, 2005a).

Cannabinoid metabolism is extremely rapid and appears to be even faster than chloral hydrate which has a half-life of 3 min. Nevertheless, the prolonged but lowered blood levels of administered drug must be rationalized by its slow rate-determining release from a deep compartment (Garrett *et al.*, 1974a).

Plasma clearance values (CL) of 760 to 1200 mL/min, which are quite similar to the hepatic blood flow, show that THC is eliminated rapidly from the plasma

compartment, and the liver plays a major role in the biotransformation (Brenneisen, 2001).

The metabolism of CBD is well established (Mechoulam *et al.*, 2002a). CBD and CBN are metabolized similarly to THC (Brenneisen, 2001; Harvey *et al.*, 1991a). Although CBD inhibits both CYP2C9 and CYP3A, after prolonged administration an induction of CYP3A and other subtypes has been shown (Brenneisen, 2001).

Like THC, CBD is subjected to a significant first-pass effect (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2005a; Samara *et al.*, 1988; Scuderi *et al.*, 2008). CBD undergoes multiple hydroxylations, oxidations to carboxylic acids, beta-oxidation, conjugation and epoxidation (Harvey *et al.*, 1991) As with THC, for CBD the 7-hydroxy metabolites appear to be the major phase I products (Aguirell *et al.*, 1986; Harvey *et al.*, 1990; McGilveray, 2005). In fact, in numerous species, including man, the first step is hydroxylation, mostly on C-7, leading to 7-hydroxy-CBD. Further oxidations, lead to CBD-7-oic acid, and numerous hydroxylated derivatives of this acid (Harvey *et al.*, 1991a; Harvey *et al.*, 1990). Glucuronides of these oxidized metabolites are also formed, for a review see (Aguirell *et al.*, 1986; Mechoulam *et al.*, 2002a).

Metabolic interaction between cannabinoids has been observed, but only cannabidiol seems to have a significant effect on THC by inhibiting hepatic microsomal THC metabolism through inactivation of the CYP oxidative system (Grotenhermen, 2003; Yamamoto *et al.*, 1995). However, it has been reported that there is no or minimal effect of CBD on THC plasma concentrations in humans (Grotenhermen, 2003).

Excretion.

Less than a 5% of an oral dose of THC is excreted as unchanged drug in faeces.

Unlike Δ^9 -THC, a high percentage of unmetabolized CBD is excreted in the faeces (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2005a; Scuderi *et al.*, 2008).

Regarding renal excretion, only traces of the THC dose are excreted in the urine (Huestis, 2005a). The lack of significant renal excretion of unchanged drug

is readily understandable since its high lipophilicity should result in complete tubular reabsorption (Brenneisen, 2001; Garrett *et al.*, 1974a).

If one makes a rough estimate of the elimination of Δ^9 -THC in man, one finds that about 2/3 of the dose is excreted in feces and about 1/3 the urine, mainly as metabolites (Aguirell *et al.*, 1986).

It has been reported that cannabinoid metabolites are predominantly excreted in the faeces (30–65%) due to their extensive enterohepatic recirculation and their high protein binding (Aguirell *et al.*, 1986; Brenneisen, 2001; Doyle *et al.*, 1995; Grotenhermen, 2003; Huestis, 2005b; Mechoulam, 1981). THC metabolites in the faeces are both acidic and neutral, the most abundant being 11-OH-THC and 9-carboxy-THC, which are only present in the nonconjugated form (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007; McGilveray, 2005).

About 20% of the THC metabolites are excreted in the urine (20%) (Huestis, 2005a). In contrast to fecal excretion, many of the THC metabolites in the urine are acidic and they are conjugated with glucuronic acid to increase their water solubility. Therefore, the dominant urinary metabolite is the acid-linked THC-COOH glucuronide conjugate -with 50% excreted in the first day after administration- (Brenneisen, 2001; Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007; McGilveray, 2005).

Some CBD metabolites are eliminated in the urine. Indeed, free CBD-7-oic acid and its glucuronide compound, represent the most abundant products of CBD metabolism detected in human urine (Brenneisen, 2001; Harvey *et al.*, 1991b; Samara *et al.*, 1990; Scuderi *et al.*, 2008).

Terminal elimination half-lives.

The true elimination half-life of THC from plasma is difficult to calculate, as the concentration equilibrium ratio plasma/fatty tissue is only slowly reached, resulting in very low plasma concentrations which are difficult to analyze (Brenneisen, 2001; Grotenhermen, 2003).

The slow release of THC from lipid-storage compartments and the significant enterohepatic recirculation of THC and its metabolites strongly contribute to a

long terminal half-life of THC in plasma -50 to 90% of the dose is excreted within the first 4 to 5 days- (Brenneisen, 2001; Grotenhermen, 2003).

The elimination phase of THC from plasma can be described using a two-compartment model with an initial (alpha) half-life of approximately 4h and a beta-half life of 25h to 36h (Grotenhermen, 2003; McGilveray, 2005). Thus, the terminal plasma elimination half-lives ($t_{1/2}$) listed in the literature vary between 1 and 4 days, and the complete elimination of one single dosage of THC may require up to 5 days (Brenneisen, 2001).

Like THC, CBD shows a prolonged elimination; its terminal half-life is about 7-9h (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2005a; Samara *et al.*, 1988).

7.5. Cannabinoid dosage forms.

Over the last few years, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) has been recognized as being useful in the treatment of various medical conditions such as emesis, anorexia, multiple sclerosis, pain and Parkinson's disease, among others.

However, despite the promising pharmacological profile and the increasing clinical interest in THC, no suitable dosage forms have been marketed so far. This is due to several challenging problems –described in previous sections- that can be encountered during THC dosage form development. Firstly, THC is a very sticky tar-like nature resin, which difficults its handling and processing. Secondly, THC is a labile molecule (it readily undergoes decomposition when exposed to heat, air, and light, and degrades in aqueous solutions especially at low pH). Thirdly, THC is poorly soluble in aqueous solutions, which restricts its use in most pharmaceutical preparations and some research experiments.

Hence, the main challenge for the medicinal use of cannabinoids, including THC, is the development of safer and effective dosage forms (Hall *et al.*, 2005; Mannila *et al.*, 2006).

To prepare cannabinoid administration forms either plant material or synthetic cannabinoids can be used.

However, the use of crude marihuana, or extracts from it, for therapeutic purposes has many disadvantages, the major one being the notorious variability of Cannabis preparations. The amount and ratio of the components in the plant

are a function of botanical and cultivation factors (nutrition, humidity, light levels), as well as the time of harvest, the mode of preparation of the crude drug, and the conditions (such as light, heat, and duration) of storage.

Nevertheless, several authors have claimed that Cannabis-based medicines containing whole plant extracts may offer significant advantages over those made from single synthetic cannabinoids, due to the potential synergistic pharmacological effects of the minor cannabinoid and non-cannabinoid fractions present in the plant extracts (McPartland *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2003). In addition, other compounds in cannabis may ameliorate the side effects of THC (Stott *et al.*, 2004).

The two main routes of cannabinoid administration, oral ingestion of tetrahydrocannabinol (THC) and smoking of dry cannabis plant material, both have specific advantages and disadvantages (table 6). As a result, in recent years several new modes of cannabinoid administration have been tested (Grotenhermen, 2004). Their advantages and disadvantages are summarized in table 6.

Table 6. Summary of the pharmacokinetic characteristics, advantages and disadvantages of different routes of cannabinoid administration -adapted from (Grotenhermen, 2004)-.

Route of administration	Pharmacokinetic characteristics	Advantages	Disadvantages
<i>Intravenous</i>	Onset of action within seconds, high plasma peak, then rapid decline.	Fast onset of action, high bioavailability, allows administration to unconscious patients.	Only possible with water-soluble synthetic cannabinoids, invasive mode of delivery, usually not applicable by patient.
<i>Pulmonar-smoking</i>	Onset of action within seconds, maximum effects 20–30 minutes after smoking, psychotropic effects last 2–3 hours, bioavailability of 10–35%.	Fast onset of action, easy to titrate effect, higher bioavailability than oral use.	Variable composition (cannabinoids and untested components), possibly drug interactions may occur. Exposure to harmful-by products of pyrolysis (mutagens,...) Exposure depends on user experience. Risk of pulmonary disease, cancer. Short action.
<i>Pulmonar-nebulized</i>	Similar to smoking, possibly higher bioavailability.	As with smoking. No carcinogenic combustion products. Circumvents first pass metabolism.	Short action, need of medical device Long inhalation procedure (25min). Upper-respiratory tract irritation. Chest discomfort.

Table 6. (cont.)

Route of administration	Pharmacokinetic characteristics	Advantages	Disadvantages
<i>Oral</i>	Onset of action at 30–90 minutes; maximum effects at 2–3 hours; slow decline of effects thereafter; low systemic bioavailability (5–10%).	Easy to take, long action.	Slow and erratic absorption, delayed onset of action, high chance of under- or overdosing. Cannabinoid instability in gastric pH. Extensive first-pass metabolism. Low systemic bioavailability. Not practical for nauseated patients.
<i>Sublingual</i>	Rapid onset of action.	Easy to take. Avoids the first-pass effect.	Slower onset than with inhalation. Small volume of saliva. Bad taste, dry mouth. Mucosal white lesions, and oral burning sensation.
<i>Transdermal</i>	Only preliminary data from experimental studies.	Long steady state of plasma concentration, long action.	Need of carrier.
<i>Rectal</i>	Systemic bioavailability twice as high as with oral use.	Partially circumvents first pass metabolism, higher bioavailability.	Less practical than oral use.
<i>Ophthalmic (topical)</i>		No relevant systemic action.	Need of carrier.

The most common method of cannabis consumption in the US is by **smoking marijuana**. It is derived from any part of the dried plant and generally rolled into a cigarette-type vehicle. More potent preparations, such as *hashish* (the Middle East, North Africa), *charas* (India) and *ganga* (Jamaica), are derived from the resin taken from flowering tops of the plant and are eaten, drunk or smoked. The THC content is 5% of dry weight in the case of marijuana, as against up to 10% of hashish and 20% of hashish oil (Walsh *et al.*, 2003).

Smoking requires elevated temperatures to vaporise and extract the Δ^9 -THC. This extraction is far from complete: only 68% of the initial THC is released by smoking (Ohlsson *et al.*, 1980). Besides, the burning process destroys part of the Δ^9 -THC; therefore, the dose absorbed after smoking is considerably lower (Mechoulam, 1970). In fact, it is estimated that up to 40% of the available Δ^9 -THC may be completely combusted in the process of smoking and may not be biologically available (Carter *et al.*, 2004; Doyle *et al.*, 1995; Nocerino *et al.*, 2000). Drug availability is further reduced by drug loss in the side-stream smoke and metabolism in the lung (Carter *et al.*, 2004). These factors contribute to the high variability in drug delivery by the smoked route. It is estimated that the systemic availability of smoked Δ^9 -THC is ca. 8–24%, and that bioavailability depends strongly upon the experience of the cannabis users (Adams *et al.*, 1996; Huestis, 2007; Thumma *et al.*, 2008d; Walsh *et al.*, 2003).

Another concern is that the use of cigarette as a dosage form inherently involves the exposure to various untested marijuana components –marijuana contains at least 60 cannabinoids and over 400 total chemical constituents-, increasing the likelihood that multiple drug interactions might occur (Wilson *et al.*, 2002) and making it difficult to investigate in clinical trials (Walsh *et al.*, 2003). Indeed, with the multiple substances in marijuana, particularly the cannabinoids, it is possible that these substances work synergistically, additively, or even antagonistically when consumed together by smoking. This has significant implications for the clinical usefulness of marijuana. Hence, a firm chemical basis is a prerequisite for quantitative biological work for which pure and well-defined substances are needed (Mechoulam, 1979).

Moreover, marijuana smoke also contains other harmful by-products of pyrolysis which may cause bronchial irritation and impair airway conductance

(Thumma et al., 2008b), toxicities that may have nothing to do with the cannabinoids per se. In fact, it has been reported that during smoking, more than 2,000 compounds may be produced by pyrolysis (Huestis, 2007). Furthermore, inhalation of marijuana smoke is not without risks as it exposes the user to mutagens, carcinogens, and other harmful by-products of pyrolysis (Hall *et al.*, 2005; Hiller *et al.*, 1984), such as benz[a]pyrene, making it potentially harmful in long-term use and difficult to investigate in clinical trials (Guzmán, 2003; Walsh *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 1988). In addition, although the pulmonary route of administration (investigated mostly in the form of marijuana cigarette containing the raw plant material) bypasses first pass metabolism and results in a rapid delivery of THC into the systemic blood circulation due to a large alveolar surface area and the thin epithelium (Ohlsson *et al.*, 1980), this route is not a viable option because of the potential for long-term side-effects from smoke inhalation (Baker *et al.*, 2003). Indeed, smoking cannabis is associated with significant risks of lung cancer and other respiratory dysfunction (Costa, 2007; Scully, 2007).

Besides, individual smoking behaviour during an experiment is difficult for a researcher to control. In fact, THC plasma levels after smoked marijuana depend on dose, experience of the user, method of smoking (depth of inhalation, puff duration, breath-holding after inhalation) and the individual preference/tolerance for psychoactive effect (Flora *et al.*, 1981; Walsh *et al.*, 2003).

Finally, there is reluctance in some older patients towards the use of marijuana cigarettes due to the associated social and legal implications.

However, despite the significant disadvantages of smoking, it has been the route of choice for many cannabis users because it delivers a more rapid "hit". Furthermore, some patients who are experienced smokers find that this route of administration allows them to titrate more adequately the appropriate dose to control their symptoms and stop when the desired effect is obtained (Ben Amar, 2006). Moreover, anecdotal reports indicate that in certain patients cannabis is more effective and might have fewer psychological effects when smoked than when taken orally (Guzmán, 2003).

The Institute of Medicine (IOM) of the United States recently reviewed the scientific evidence for the potential of marijuana and its cannabinoid constituents to act as therapeutic agents. This report concluded that there is a therapeutic

potential for cannabinoid drugs, mainly Δ^9 -THC, for alleviation of pain, control of nausea and vomiting, and stimulation of appetite. However, they pointed out that marijuana is a 'crude Δ^9 -THC delivery system' that delivers harmful chemicals along with the delivery of Δ^9 -THC, and recommended instead the development of a reliable and safe Δ^9 -THC delivery system. "If there is any future in cannabinoid drugs, it lies with chemically defined drugs, not with the crude plant material". Defined substances, such as purified or synthetic cannabinoid compounds, are preferable to plant products that are of variable and uncertain composition. Pure cannabinoid drugs permit a more precise evaluation of their effects, whether in combination or alone. Furthermore, it was concluded that chronic smoking of the marijuana plant exposes the user to risks of pulmonary disease, including cancer. Finally, because marijuana smoke poses health problems for patients who are severely health compromised, the Institute of Medicine (IOM) report recommended that an alternative delivery system should be developed (Watson *et al.*, 2000).

➤ **THC-containing foods**, i.e., hemp oil, beer, and other products, are commercially available for oral consumption (Huestis, 2007). Patients drink an infusion of cannabis (cannabis tea) with butter in order to increase the solubility of THC. In this floating layer of melted butter all the lipophilic THC will be present which results in a very inhomogeneous dosage form. Moreover, as mentioned above, there is an enormous variability in cannabinoid content in plant-derived preparations.

➤ The only commercially available dosage form with a constant Δ^9 -THC content is the soft gelatin **capsule for oral administration**, marketed in the USA as Marinol® (Solvay Pharmaceuticals, Inc., Marietta, GA, USA). It contains 2.5-10 mg of Δ^9 -THC in sesame seed oil. In this formulation, however, the drug has limited stability and, therefore has to be stored at low temperatures (4°C) (Thumma *et al.*, 2008c; van Drooge *et al.*, 2004).

The reduced bioavailability of orally administered THC (10-20%), due to low absorption, cannabinoid instability un acidic gastric pH (Garrett *et al.*, 1974b) and high first-pass metabolism -only 6-20% of an orally administered dose escapes hepatic first-pass metabolism-, prompts the development of more reliable administration forms (Doyle *et al.*, 1995; Grotenhermen, 2003; Hazekamp *et al.*,

2006; Mannila *et al.*, 2007; Mattes *et al.*, 1993; Ohlsson *et al.*, 1986; Ohlsson *et al.*, 1980).

In addition, one indication for Marinol® is for nausea and emesis in patients requiring chemotherapy, however, swallowing capsules when nauseated is not extremely practical because of the difficulty in swallowing or keeping a pill down (Stinchcomb *et al.*, 2004; Thumma *et al.*, 2008c; Watson *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2002).

Therefore, despite the availability of Marinol®, the demand for more effective cannabinoid medications persists (Wilson *et al.*, 2002).

➤ A **sublingual spray** (Sativex®, GW Pharmaceuticals Ltd., Wiltshire, UK), which contains THC and CBD in a close 1-to-1 ratio (27 and 25 mg/ml, respectively) dissolved in an equal mixture of ethanol and propylene glycol, with 0.05% peppermint as flavouring has recently been approved in Canada for relief of neuropathic pain associated with multiple sclerosis (Mannila *et al.*, 2007; Russo *et al.*, 2006) and as an adjunctive analgesic treatment in adult patients with advanced cancer pain. This mode is easy to administer and might enable easier dose titration than oral capsules.

Although systemic drug delivery through sublingual mucosa is a useful method to bypass hepatic first-pass metabolism, sublingual delivery of poorly water-soluble THC may be challenging: in order to deliver THC into systemic circulation through sublingual mucosa, it must first dissolve into the small volume of saliva (<1 ml) in the oral cavity (Mannila *et al.*, 2005). A major disadvantage of oral mucosal delivery, however, is the lack of retention of the dosage form at the intended site for a desirable duration resulting in drug loss due to salivary wash out, involuntary tongue movements and swallowing (Thumma *et al.*, 2008a). In addition, drawbacks, such as dryness, bad taste, and administration site irritation, may hinder the feasibility of the spray formulation (Mannila *et al.*, 2006). Furthermore, some patients developed an oral burning sensation, stinging or white lesions, which resolved on cessation of spray use, suggesting they were chemical burns (Sativex® Product Monograph). Moreover, the high alcohol concentration used orally raises concern in relation to chronic use, as alcohol itself may have carcinogenic potential, since alcohol may be metabolized by the oral flora to acetaldehyde (Scully, 2007). It would therefore be wise to move to

formulations with non-alcohol solutions, despite the lack of evidence implicating alcohol-containing mouthwashes in oral cancer.

As a result, although the sublingual spray give adequate therapeutic results, an alternative solid dosage form would confer advantages in patient compliance and higher potential doses (Munjal *et al.*, 2006c). Hence, to maximize the benefits (efficacy) and reduce the undesirable effects (toxicity), new formulations for administering and delivering cannabinoids are currently under investigation. These are smokeless oral inhalers (aerosols), transdermal patches and rectal suppositories. The intravenous route is excluded because cannabinoids are insoluble in water (Ben Amar, 2006).

➤ Alternative modes of systemic pulmonary administration include **inhalation with a vaporizer** and the use of cannabinoids in **aerosol** form. They avoid or reduce the formation of carcinogenic combustion products found in cannabis smoke.

Pulmonary administration circumvents first pass metabolism and THC is directly absorbed into the systemic blood circulation.

An aqueous THC inhalation solution containing various solubilizers has been tested *in vivo*, and a bioavailability of 28.5% (0.4–60.6%) was found (Naef *et al.*, 2004). However, the inhalation procedure took a long time (20–25 min) and a lot of irritation in the throat and upper respiratory tract was reported, most likely caused by the presence of surfactants in the solution.

A Δ^9 -THC aerosol device would provide a safe and controlled method to administer the drug. Indeed, there was some interest in the 1970s in developing aerosolized Δ^9 -THC generated from either a metered-dose inhaler or a nebulizer for its bronchodilatory properties in humans. Although inhalation of aerosolized Δ^9 -THC produced a bronchodilatory effect, it also caused some chest discomfort and coughing in some normal subjects and bronchoconstriction in some asthmatics (Lichtman *et al.*, 2000).

Furthermore, upon exposure, the drug can be deposited throughout the entire respiratory tract, including the upper respiratory tract i.e., nose, nasopharynx, oropharynx, and larynx, tracheobronchial region, and the alveoli. As a result, factors influencing the systemic dose of Δ^9 -THC upon inhalation would include

deposition and absorbance into the bloodstream from each region of the respiratory tract. Nevertheless, the body of knowledge of this information in mice is scant (Lichtman *et al.*, 2000).

➤ **Solutions or ethosomal carriers for transdermal delivery** achieve a sustained and steadier action than inhalation or oral administration of THC, and is being investigated in preclinical studies by groups in the US and Israel. This is advantageous in users of cannabinoids for control of long-term pain and other applications requiring continuous effects. Since cannabinoids are highly lipophilic molecules, they tend to accumulate within the upper skin layer (stratum corneum) and permeate slowly to lower strata. Hence, their effective subcutaneous transport requires permeation enhancement (Challapalli *et al.*, 2002; Grotenhermen, 2004; Lodzki *et al.*, 2003; Stinchcomb *et al.*, 2004).

➤ **Suppositories.** Rectal administration can be a suitable alternative as well, since it partially circumvents first pass metabolism. However, the results are ambiguous: Mattes *et al.* (Mattes *et al.*, 1993) reported a 30-fold increase in bioavailability compared to Marinol® in three females. Using the pro-drug THC-hemisuccinate ester resulted in a bioavailability of 13.5% or even 67% (ElSohly *et al.*, 1991), whereas in some cases THC was not absorbed at all (Perlin *et al.*, 1985; van Drooge *et al.*, 2005).

Nevertheless, practical problems of suppository administration should not be ignored (Grotenhermen, 2004).

Therefore, clearly there is still a need for the development of a more optimal preparation of THC (Baker *et al.*, 2003; Hazekamp *et al.*, 2006).

MICROENCAPSULATION

Parenteral controlled release delivery systems are of considerable interest for drugs, which require daily administration and have a very low oral bioavailability (Dhanaraju *et al.*, 2003), like cannabinoids.

Many of the currently approved parenteral sustained-release products are polymeric microsphere formulations that can be injected subcutaneously or intramuscularly for a systemic effect or injected into specific body site for a localized treatment (Shi *et al.*, 2005). For parenteral administration, the diameter of the microparticles should be less than 250 μm , ideally less than 125 μm , to allow injections with acceptable needle diameters (Kissel, 2006).

Polymeric microspheres have been extensively investigated as controlled release delivery systems for the past decades and a number of preparations have been commercially available for a number of years. The formulations are available as lyophilised microspheres which are re-constituted with a diluent prior to subcutaneous or intramuscular administration. After injection, drug is released from the depot over a period of weeks to months, by drug diffusion out of the polymeric matrix and/or by erosion of the matrix. However, predicting precise drug release profiles is difficult because these profiles are governed by various properties of the polymer, drug, and carrier system. Namely, polymer dependent factors include molecular weight, molecular weight distribution, copolymer composition and crystallinity. Important drug-dependent parameters are solubility of the drug in biological fluids, molecular weight, possible polymer–drug interactions, and drug distribution. Carrier system-dependent factors comprise the types of microparticle (microsphere vs. microcapsule), drug loading, physical state of the drug in the polymer matrix (dissolved vs. dispersed), particle size and particle size distribution, and porosity and internal structure of the microparticles (Deadman *et al.*, 2007; Freiberg *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2003).

A large variety of bioactive compounds have been formulated into microspheres, among them are antineoplastic drugs, narcotics, anaesthetic agents as well as therapeutic peptides and proteins, DNA, viruses and bacteria-derived compounds (Freitas *et al.*, 2005).

Microspheres have been prepared by various techniques, which feature partly competing, partly complementary characteristics. Many microencapsulation processes are modifications of the three basic techniques: solvent extraction/evaporation, phase separation (coacervation) and spray-drying (Tewes *et al.*, 2006).

- **Spray-drying** is relatively simple and of high throughput. It is useful to encapsulate either lipophilic or hydrophilic drugs, but must not be used for highly temperature-sensitive compounds. Moreover, control of the particle size is difficult, and yields for small batches are moderate.
- **Coacervation** is suitable to encapsulate both hydrophilic and hydrophobic drugs. However, this process is frequently impaired by residual solvents and coacervating agents found in the microspheres. Furthermore, it is not well suited for producing microspheres in the low micrometer size range.
- The use of **supercritical gases** as phase separating agents was intensively studied to minimize the amount of potentially harmful residues in the microspheres, resulting in processes named, e.g., Precipitation with Compressed Antisolvent (PCA), Gas or Supercritical fluid Anti-Solvent (GAS or SAS) and Aerosol Solvent Extraction System (ASES).
- **Solvent extraction/evaporation** is a useful method to prepare microparticles loaded with a lipophilic drug from an O/W emulsion, although also hydrophilic drugs can be encapsulated using the W/O/W double-emulsion method. This technique neither requires elevated temperatures nor phase separation inducing agents. Controlled particle sizes in the nano- to micrometer range can be achieved, but careful selection of encapsulation conditions and materials is needed to yield high encapsulation efficiencies and a low residual solvent content (Freitas *et al.*, 2005).

Due to the non-retrievable nature of the microspheres after administration, carriers used in the formulation of parenteral microspheres should be biodegradable.

Among the most useful biodegradable polymers for controlled drug delivery are aliphatic polyesters such as poly(lactide), poly(glycolide), **poly(ϵ -caprolactone) (PCL)**, and their copolymers (Sinha *et al.*, 2004). These polymers have Food Drug Administration (FDA) approval for human application (Dhanaraju *et al.*, 2006; Durán *et al.*, 2006). They degrade by hydrolysis in aqueous media and their products are metabolized by the organism (Chen *et al.*, 2000; Pitt, 1990).

In fact, PCL is one of the most widely used biodegradable polymers for controlled drug delivery due to its good drug permeability and biocompatibility as it can be decomposed into non-toxic and low molecular weight species which are subsequently metabolized or absorbed by the organism producing no harmful effects (Chen *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2004). Unlike polymers and copolymers based on lactides (PLA) and glycolides (PGA), PCL degradation does not generate an acidic environment which could adversely affect the stability of the encapsulated drug (Shi *et al.*, 2005b; Sinha *et al.*, 2004). Therefore, as cannabinoids degrade in acidic medium (see section 7.3.3.) PCL was chosen to prepare the microparticles and nanoparticles.

Other advantages of PCL include hydrophobicity, *in vitro* stability and low cost (Blanco *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

PCL is a semi-crystalline polymer having a glass transition temperature of -60 °C and a melting point ranging between 59 and 64 °C, depending upon its crystalline nature. The number average molecular weight (M_n) of PCL samples may vary from 10,000 to 42,500 (Sinha *et al.*, 2004).

PCL is soluble in chloroform, dichloromethane, carbon tetrachloride, benzene, toluene, cyclohexanone and 2-nitropropane at room temperature. It has a low solubility in acetone, 2-butanone, ethyl acetate, dimethylformamide and acetonitrile and it is insoluble in alcohol, petroleum ether and diethyl ether (Sinha *et al.*, 2004).

PCL has an exceptional ability to form blends with other polymers (Dhanaraju *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2004). It can be blended with other polymers to improve stress crack resistance, dyeability and adhesion. Polycaprolactone is used in combination with polymers such as cellulose propionate, cellulose acetate

butyrate, polylactic acid and polylactic acid-co-glycolic acid for manipulating the rate of drug release from microcapsules (Sinha *et al.*, 2004).

Degradation of PCL in comparison to polyglycolic acid and other polymers is slow. PCL degradation is a bulk process that can be divided into two phases (Sinha *et al.*, 2004):

- (1) M_n loss up to 5,000 due to chain scission.
- (2) Onset of weight loss.

The first stage of the biodegradation process involves non-enzymatic random chain scission by hydrolytic cleavage of ester groups (Ali *et al.*, 1993; Pitt *et al.*, 1981a; Pitt *et al.*, 1981b). This phase is an autocatalytic process in which the liberated carboxylic acid end groups catalyze the hydrolysis (Pitt, 1990). Its duration is determined by the initial molecular weight of the polymer as well as its chemical structure (Pitt *et al.*, 1981).

No weight loss is observed during the initial phase of the biodegradation process, which covers a molecular weight (M_n) range of 200,000 to 5,000.

The second phase of polymer degradation is characterized by a decrease in the rate of chain scission and the onset of weight loss. Weight loss has been attributed to an increased probability that chain scission of a low molecular weight polymer will produce a fragment small enough to diffuse out of the polymer bulk and the break up of the polymer mass to produce smaller particles with an increased probability of phagocytosis. The decrease in the rate of chain scission is associated with an increase in crystallinity, since cleavage takes place in the amorphous region of the polymer.

Therefore, degradation of PCL is very slow in an aqueous medium because of its semi-crystallinity –which difficults water to penetrate into the crystalline part of the polymer matrix- and hydrophobicity (Hombreiro Pérez *et al.*, 2000). This indicates that drug release is a result of diffusion and not of the degradation of the polymer (Durán *et al.*, 2006; Hombreiro Pérez *et al.*, 2000). Furthermore, release of cannabinoids from PCL microspheres due to degradation or erosion of PCL was thought to be unlikely because studies have shown that under *in vitro* conditions

in water, there was no significant weight loss or surface erosion of PCL over a 7.5-week period (Dordunoo *et al.*, 1995; Pitt *et al.*, 1984).

However, *in vivo* the release from this biodegradable polymer could still be increased since there is also an enzymatic contribution to PCL degradation (Blanco *et al.*, 2003; Hombreiro Pérez *et al.*, 2000; Persenaire *et al.*, 2001).

The background features three overlapping circles of varying sizes, each composed of concentric rings in shades of gray. Two thin, light gray lines intersect to form an 'X' shape across the page. The text is positioned in the center-left area, between the lines.

**II. OBJETIVOS Y
PLANTEAMIENTO
EXPERIMENTAL**

**II. OBJECTIVES AND
PLANNING**

En los últimos años la investigación sobre los cannabinoides ha experimentado un gran auge, fundamentalmente derivado de las expectativas que se han creado en torno a la posible aplicación de estas sustancias para el tratamiento de diversas patologías como las náuseas y vómitos asociados a la quimioterapia, la anorexia en pacientes con SIDA, el dolor neuropático, la esclerosis múltiple, el cáncer, el glaucoma, etc.

Sin embargo, a pesar del prometedor potencial terapéutico de los cannabinoides, hasta la fecha no se dispone de un sistema eficaz para su administración. Esto es debido a diversos problemas que pueden plantearse durante el desarrollo de una formulación para estas sustancias. En primer lugar, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol, el cannabidiol y otros cannabinoides poseen una elevada lipofilia, lo que dificulta su incorporación en preparaciones líquidas. En segundo lugar, el Δ^9 -THC y el CBD son moléculas muy inestables que se degradan por acción del oxígeno, la luz, el calor o pH ácidos. En tercer lugar, el Δ^9 -THC materia prima se presenta como una resina pegajosa y viscosa a temperatura ambiente, lo que dificulta su manipulación.

Aunque fumar marihuana es una opción utilizada para la administración de cannabinoides, plantea importantes problemas: el contenido en cannabinoides de la planta no es constante, el humo contiene otros compuestos cancerígenos y mutágenos producidos por combustión y, además, debido a las altas temperaturas alcanzadas, tiene lugar una importante degradación de los cannabinoides.

En la actualidad el THC está disponible en EEUU formulado en cápsulas de administración oral (Marinol®, Unimed Pharmaceuticals) para el tratamiento de las náuseas y los vómitos secundarios a la quimioterapia en pacientes con cáncer, así como para estimular el apetito en pacientes con SIDA. Sin embargo, la absorción oral del THC es baja y errática debido a su baja solubilidad acuosa y a su extenso metabolismo de primer paso. Asimismo, la dificultad de ingerir una formulación de administración oral en caso de sufrir náuseas y vómitos es un inconveniente adicional de este preparado.

Recientemente se ha aprobado en Canadá un aerosol de administración sublingual (Sativex®, GW Pharmaceuticals) que contiene CBD y THC, para el tratamiento del dolor neuropático. No obstante, este preparado contiene etanol y propilenglicol como agentes solubilizantes, lo que origina una frecuente irritación del lugar de administración.

La dificultad para la dosificación y administración de los cannabinoides de una manera eficaz también es un problema para la investigación de nuevos usos terapéuticos de estas sustancias.

Así, tanto desde el punto de vista de la investigación como de su uso en clínica, resulta importante desarrollar nuevos sistemas para la administración de los cannabinoides.

El objetivo del presente trabajo de investigación ha sido el desarrollo de una suspensión de microesferas biodegradables para la administración subcutánea de cannabinoides. Dicha formulación se presentaría como un sólido de flujo libre fácil de dosificar y de administrar, previa reconstitución con agua. La vía subcutánea evitaría el metabolismo de primer paso. El cannabinoide se liberaría a partir de estos sistemas de forma prolongada, lo que permitiría incrementar el intervalo posológico. Esto sería interesante no sólo para la realización de estudios farmacológicos sino también para

facilitar la adherencia al tratamiento de los pacientes de cara a su aplicación en clínica.

En el presente estudio se trabaja con cannabidiol (CBD) y Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), dos de los cannabinoides más importantes presentes en *Cannabis sativa*. El THC es el principal componente psicoactivo de la planta, y de mayor potencia, por lo que es al que se le han atribuido tradicionalmente las propiedades terapéuticas de la planta, y por tanto, el que ha sido estudiado en mayor profundidad. No obstante, en los últimos años el CBD ha despertado un gran interés en la comunidad científica, pues se trata de un cannabinoide no psicoactivo con un interesante potencial terapéutico.

El trabajo experimental se divide en 4 apartados, cada uno de ellos planteado en función de los resultados obtenidos en el apartado anterior:

- 1) Definición, puesta a punto y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) que permita cuantificar el cannabidiol y el Δ^9 -tetrahidrocannabinol materias primas, encapsulados en micropartículas o liberados a partir de los sistemas en los ensayos de cesión *in vitro*.
- 2) Desarrollo de microesferas de CBD y microesferas de Δ^9 -THC: optimización del procedimiento de microencapsulación y caracterización *in vitro* de las formulaciones obtenidas en cuanto a morfología, tamaño, carga de principio activo, compatibilidad y solubilidad principio activo-polímero, disposición del principio activo en las microesferas y perfiles de cesión *in vitro*.
- 3) Evaluación de la eficacia de las formulaciones en cultivos celulares: aprovechando el potencial antitumoral de los cannabinoides se utilizan las líneas celulares MDA-MB-231, RBL-2H3 y Caco-2.

Esta parte del trabajo se ha realizado, gracias a una estancia breve FPU, en el Istituto di Chimica Biomolecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche-CNR (Nápoles, Italia) bajo la supervisión del Dr. Vincenzo Di Marzo, responsable del Endocannabinoid Research Group.

- 4) Evaluación de la eficacia *in vivo* de las formulaciones. Se utiliza un modelo ectópico de glioma humano en ratones atímicos, en el que se evalúa la capacidad de las formulaciones desarrolladas de inhibir el crecimiento tumoral.

Esta parte del trabajo se ha realizado en colaboración con los Dres. Guillermo Velasco y Manuel Guzmán del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Además de estos estudios, que forman parte de la presente memoria, durante una estancia breve FPU en el Departamento de Farmacología y Toxicología-Facultad de Medicina de Virginia Commonwealth University (VCU), bajo la supervisión de los doctores Billy R. Martin y Aron H. Lichtman, se realizó un estudio de la farmacocinética del CBD en solución y microencapsulado administrado por vía subcutánea en ratones. Este estudio se incluye como anexo a la presente memoria y está proyectado complementarlo con el estudio de la farmacocinética del THC.

Over the last few years the pace of cannabinoid research has been steadily increasing, mainly due to the promising therapeutic potential of these compounds for the treatment of a long and growing list of medical disorders. These include nausea and vomiting associated with cancer chemotherapy in patients who have failed to respond to conventional antiemetics, anorexia associated with weight loss in patients with AIDS, neuropathic pain, multiple sclerosis, cancer, glaucoma, etc.

However, despite the promising clinical potential of cannabinoids, an effective method of administration has not been developed to date. This is due to several problems that can be encountered during the development of a formulation for cannabinoids. Firstly, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and other cannabinoids have a very low aqueous solubility which difficults their incorporation into liquid preparations. Secondly, it is well established that Δ^9 -THC and CBD are highly unstable molecules which are readily oxidised upon contact with air or visible light, and degrade in aqueous solutions especially at low pH or

under heat. Thirdly, THC is an oily and sticky resin that is highly viscous at ambient temperatures, making it very difficult to process.

Over the last years, smoked marijuana has been presented as a possible way to administer cannabinoids in some countries. However, this strategy poses very important problems: the cannabinoid content in the plant is not consistent; marijuana smoke contains hundreds of other chemicals such as mutagens, carcinogens, and other harmful by-products of pyrolysis; and during smoking, owing to the extremely high temperatures severe cannabinoid degradation occurs.

Currently, synthetic THC is available in the USA as an orally administered capsule formulation (Marinol®, Unimed Pharmaceuticals), for nausea and emesis in patients requiring chemotherapy for cancer as well as for anorexia associated with weight loss in AIDS patients. Nevertheless, due to its poor aqueous solubility and significant first-pass metabolism, the oral absorption of THC is slow and erratic, resulting in a low and inconsistent bioavailability. Moreover, the difficulty of taking an oral medication during nausea and vomiting should not be ignored.

Recently, a sublingual spray (Sativex®, GW Pharmaceuticals), which contains CBD and Δ^9 -THC was approved in Canada for the relief of neuropathic pain. However, it contains ethanol and propylene glycol as solubilizing agents, resulting in a frequent irritation of the administration site. So, clearly there is still a need for alternative preparations.

This difficulty in administering cannabinoids in an efficient way is also an important problem for the investigation of new therapeutic uses of these compounds. In fact, for administration to animals, it is always necessary to use a non-aqueous solvent or to add a dispersing agent. Furthermore, the suspensions prepared by incorporating the cannabinoid in a dispersing agent and diluting with water are not stable and should be used shortly after preparation.

In conclusion, it would be important both from a research and a clinical perspective to develop a new system for the administration of cannabinoids.

Hence, the aim of this study was to develop a suspension of biodegradable microspheres for the subcutaneous administration of cannabinoids. The resulting formulation would be a free-flowing solid, easy to weigh and to handle, which

should be reconstituted prior to administration. The subcutaneous route would avoid the first-pass metabolism and the lack of effectiveness of the oral route in patients with nausea and vomiting. In addition, the release of the drug from the microspheres would be sustained, thus facilitating not only the *in vivo* experiments carried out to study the pharmacological activity of these substances, but also the patient compliance in a further clinical application.

The present work will focus on cannabidiol (CBD) and Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), which are the two most abundant naturally occurring cannabinoids. Traditionally, studies focused more on THC because of its clear psychotropic activity. However, although THC is commonly accepted as the main compound responsible for the effects of cannabis, it has been demonstrated that other components of the plant may have therapeutic value too. One of these components is CBD, an abundant but nonpsychotropic constituent of the *Cannabis* plant, which has recently attracted renewed interest as a therapeutic molecule.

The experimental work will be divided into 4 sections, each section planned on the basis of results of previous sections.

- 1) Validation of a high pressure liquid chromatography method for CBD and Δ^9 -THC quantification either as raw material, encapsulated into microparticles or released during the *in vitro* release experiments.
- 2) Development of CBD and Δ^9 -THC microspheres: microencapsulation process optimization, *in vitro* characterization of the formulations in terms of morphology, size, drug loading, drug-polymer solubility and compatibility, drug disposition within the microspheres, and *in vitro* drug release.
- 3) Evaluation of formulations efficacy in cell cultures: taking advantage of the antitumoral potential of the cannabinoids different cancer cell lines were employed (MDA-MB-231, RBL-2H3 y Caco-2).

These studies were carried out, thanks to a FPU short-term stay, at the Institute of Biomolecular Chemistry from the National Research Council (CNR) (Naples, Italy) under Dr Vincenzo Di Marzo (Endocannabinoid Research Group coordinator) supervision.

- 4) *In vivo* evaluation of cannabinoid microspheres antitumoral efficacy. An ectopic xenograft model of human glioma in nude mice was used.

These studies were carried out in collaboration with Dr Guillermo Velasco and Dr Manuel Guzmán from the Department of Biochemistry and Molecular Biology I-School of Biology-Complutense University.

In addition to these studies, which constitute this thesis, during a FPU short-term stay at the Department of Pharmacology and Toxicology-Virginia Commonwealth University (VCU) under Dr Billy R. Martin and Aron H. Lichtman direct supervision, the pharmacokinetics of subcutaneously administered CBD (either in solution or encapsulated) was evaluated in ICR mice. This study is included as an appendix, and it is planned to complement it with the study of THC pharmacokinetics.

The background features a decorative graphic consisting of three overlapping circles of varying sizes and shades of gray. Two thin, light gray lines intersect to form an 'X' shape across the page. The text is centered in the middle of the page.

**III. VALIDACIÓN DEL
MÉTODO ANALÍTICO**

**III. ANALYTICAL
METHOD VALIDATION**

El objetivo del presente capítulo fue la puesta a punto y validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que permitiera la cuantificación del cannabidiol, así como de un método analítico de HPLC para cuantificar el Δ^9 -tetrahidrocannabinol. Con estos métodos analíticos se pretende determinar las concentraciones de cannabinoide en las muestras de los siguientes ensayos: carga de las microesferas y eficacia de encapsulación, ensayo de cesión “in vitro” y fármaco remanente en las microesferas tras los ensayos de eficacia “in vivo”.

A) ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE.

La espectrofotometría ultravioleta-visible no suele resultar útil para la cuantificación del principio activo encapsulado ya que es poco específica, pudiendo interferir otros componentes de la formulación, tales como polímero, surfactante, productos de degradación del principio activo y del polímero, en la cuantificación del principio activo. Así, por ejemplo, el cannabidiol (CBD) y el cannabigerol (CBG), o el Δ^9 -THC y el Δ^8 -THC –uno de sus productos de degradación- poseen igual espectro UV (Hazekamp *et al.*, 2005).

No obstante, se utilizó esta técnica para definir la longitud de onda de análisis por HPLC. La mayoría de los cannabinoides, incluidos el CBD y el Δ^9 -THC, poseen un anillo fenólico con capacidad de absorción en el ultravioleta, y por tanto presentan diversos picos de absorción en el ultravioleta, por lo que pueden seleccionarse varias longitudes de onda para su cuantificación (Hazekamp *et al.*, 2005).

1 | MÉTODO

Se realizaron varios barridos del CBD y del Δ^9 -THC disueltos en metanol a una concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (espectrofotómetro UV-Vis Beckman DU[®]-7, USA) con el fin de determinar los picos de máxima absorción de los mismos.

2 | RESULTADOS

En la figura 16 se presentan los espectros de absorción obtenidos a partir de una solución de CBD en metanol (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y una solución de THC en metanol (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

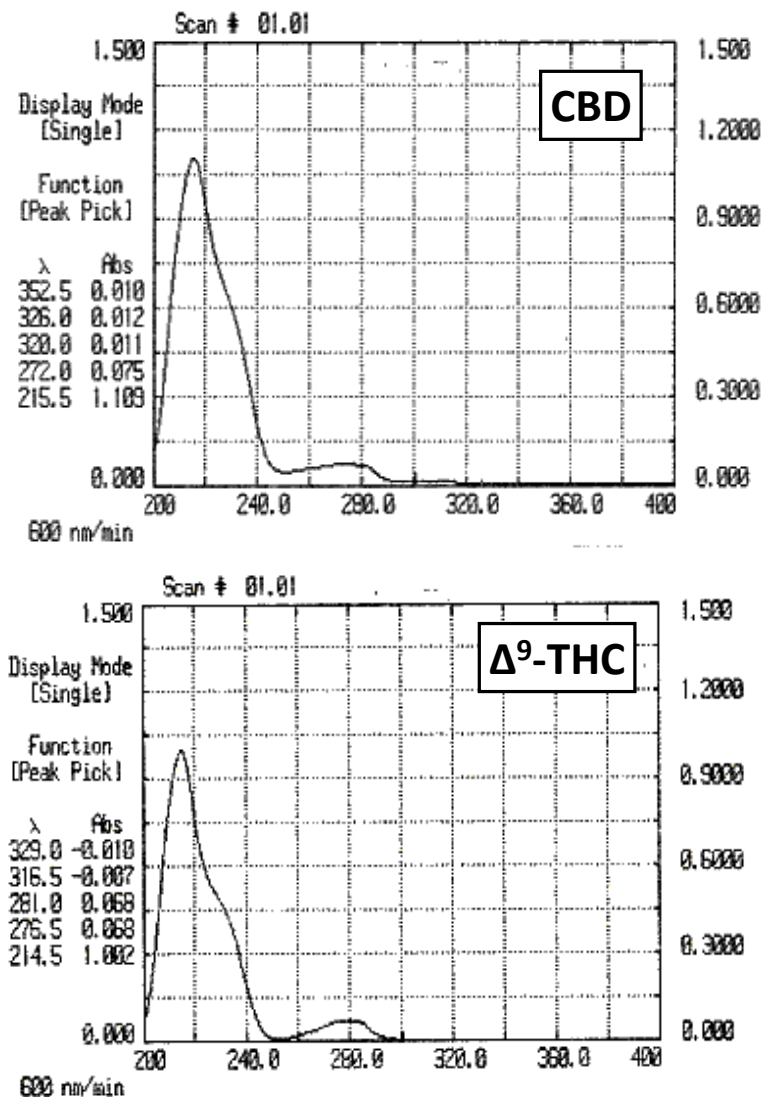


Figura 16. Espectro de absorción de (a) una solución de CBD en metanol 15 μ g/mL o (b) Δ^9 -THC en metanol 15 μ g/mL en el espectrofotómetro UV-Vis.

Como podemos observar, tanto el CBD como el Δ^9 -THC presentan espectros de absorción UV similares, presentando 2 picos de máxima absorción, uno a 214 nm y otro menor a 280 nm, lo que concuerda con los datos encontrados en la bibliografía (De Backer *et al.*, 2009; Hazekamp *et al.*, 2005; Mercolini *et al.*, 2008).

B) CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Esta técnica resulta especialmente útil para separar y cuantificar el principio activo inalterado presente en la formulación de sus productos de degradación y los demás componentes de la misma (polímero, posibles restos de tensioactivo,...). En nuestro caso el método desarrollado ha de ser válido para:

- i. Cuantificar el principio activo microencapsulado, y así determinar:
 - a. La carga de las microesferas,
 - b. El principio activo remanente en las microesferas tras los estudios de cesión “in vitro”, y
 - c. El principio activo remanente en las microesferas tras los estudios de eficacia “in vivo”.
- ii. Cuantificar el principio activo cedido a partir de los sistemas en los estudios de cesión “in vitro”.

El método ha de demostrar su especificidad, cuantificando el principio activo en presencia del polímero, posibles restos de tensioactivo y otros residuos de la microencapsulación, y, además, en presencia de los productos de degradación que se puedan generar durante los ensayos de cesión “in vitro” e “in vivo”.

1 | MÉTODO

1.1. Definición y puesta a punto.

Definición del método de preparación de las muestras.

- ◆ Para cuantificar el principio activo microencapsulado se propone el siguiente procedimiento:
 - I. Se pesarán 10 mg de micropartículas y se procederá a su ruptura mediante su disolución en 1 mL de diclorometano (disolvente del polímero y del principio activo).
 - II. Precipitación del polímero mediante la adición de fase móvil (9mL).

- III. Separación del sobrenadante mediante filtración (filtros de jeringa PTFE de 0,45 μ m, 25mm de diámetro, PK/100, Tracer, Teknokroma[®], Barcelona, España).
 - IV. Dilución del sobrenadante utilizando fase móvil, de forma que el área obtenida en el HPLC se encuentre dentro del intervalo comprendido en la recta de calibrado.
 - V. Análisis de las muestras mediante RP-HPLC.
- ◆ Para cuantificar el fármaco cedido a partir de los sistemas en los estudios de cesión *in vitro*, las muestras a analizar por HPLC serán alícuotas del medio de cesión extraído a cada punto de muestreo. Estas muestras serán filtradas por filtros de de jeringa de Nylon 0,45 μ m Tracer (Teknokroma[®], Barcelona, España) y, en caso de ser necesario, serán diluidas con fase móvil.

Definición de las condiciones analíticas.

Se ha utilizado un cromatógrafo Hewlett Packard HP1050 que consta de los módulos que se indican a continuación:

- Desgasificador
- Bomba cuaternaria
- Inyector manual
- Detector: UV-Vis
- Integrador HP 3396 series II u ordenador con software Chemstation versión B.03.01.

Para la definición de las condiciones analíticas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó una revisión bibliográfica de los métodos analíticos de cuantificación de los cannabinoides por esta técnica descritos en la bibliografía (tabla 7).

Tabla 7. Métodos de HPLC con detección UV-Visible seleccionados de la bibliografía.

Método	Columna	Fase móvil	Volumen de inyección	Flujo	λ	t_R	Límite de detección
Repka MA-1 (Munjal <i>et al.</i> , 2006b; Munjal <i>et al.</i> , 2006c; Thumma <i>et al.</i> , 2008a)	Luna C-18 5 μ m 150x4,60 mm i.d.	52:30:18 Metanol:acetonitrilo:agua ajustado a pH 4,5 (con ácido acético).	20 μ L	1,8mL/min	228nm		
Repka MA-2 (Repka <i>et al.</i> , 2006)	Partisil ODS-3 C18 5 μ m 250x4,60mm i.d.	80:20:0,01 Metanol:agua:ácido acético (pH \approx 5).	20 μ L	1,0mL/min	228nm	CBN \approx 17min THC \approx 20min	THC:0,3 μ g/mL CBN:0,1 μ g/mL Límite de cuantificación: THC:0,9 μ g/mL CBN:0,3 μ g/mL
Mannila J. (Mannila <i>et al.</i> , 2007; Mannila <i>et al.</i> , 2005)	Kromasil C8 5 μ m 250x4,6mm i.d.	85:15 Acetonitrilo:agua.	20 μ L	1,0mL/min	205nm		THC:0,3- 50 μ g/mL (0,9-200 μ M) CBD:0,1 μ g/mL (0,2-200 μ M)

Tabla 7 (cont.). Métodos de HPLC con detección UV-Visible seleccionados de la bibliografía.

Método	Columna	Fase móvil	Volumen de inyección	Flujo	λ	t_R	Límite de detección
Van Drooge (van Drooge <i>et al.</i> , 2004)	Chrompack Nucleosil 100 C18 4,6x250mm	86:14 Metanol:agua	20 μ L	1,5mL/min	214nm	7,5min	
Van Drooge (van Drooge <i>et al.</i> , 2005)	Nucleosil 100 C18 4,6x250mm	92:8 Metanol:agua y 0,25ml H ₂ SO ₄ por cada litro de eluente.	50 μ L	1,0mL/min	214nm	7,5min	
De Meijer (de Meijer <i>et al.</i> , 2009)	Columna C ₁₈ -5 μ m 150x4,6 mm	75:20:5 Acetonitrilo:ácido acético 0,25%:metanol.		1,0mL/min	220nm		

Para comenzar a trabajar se buscaron métodos que no utilizaran sales y que fueran isocráticos con el fin simplificar las condiciones de análisis. Así, se seleccionaron dos métodos: método A y método B descritos por Repka M.A. (Munjal *et al.*, 2006b; Munjal *et al.*, 2006c; Thumma *et al.*, 2008c) y Mannila J. (Mannila *et al.*, 2007; Mannila *et al.*, 2005), respectivamente. Estos métodos fueron puestos a punto y se evaluó si eran válidos para cuantificar el cannabidiol y el Δ^9 -tetrahidrocannabinol en nuestras condiciones de trabajo.

❖ Ambos métodos tienen en común:

- La **fase estacionaria**: En todos los casos se ha elegido como fase estacionaria una columna de fase reversa C18, con partículas de relleno de 5 μm de diámetro, y dimensiones de 150 mmx4,6 mm i.d. (Teknokroma®, Barcelona, España).
- El **volumen de inyección**: el equipo empleado dispone de un loop de inyección de 20 μL .
- La **temperatura**: ambiente.

❖ Se diferencian en:

- La **fase móvil**:
 - ✓ Método A: se ha utilizado una fase móvil compuesta por metanol:acetonitrilo:agua (52:30:18) ajustada con ácido acético a un pH de 4,5.
 - ✓ Método B: la fase móvil empleada estaba compuesta por acetonitrilo:agua (85:15).
- El **flujo**:
 - ✓ Método A: 1,8 mL/min.
 - ✓ Método B: 1,0 mL/min.
- La **longitud de onda de análisis (λ)**:
 - ✓ Método A: 228 nm.
 - ✓ Método B: 205 nm.

Ambas longitudes de onda están próximas al máximo principal de absorción del CBD y del Δ^9 -THC identificado por espectrofotometría UV-Vis

(214 nm) (figura 16).

Estas condiciones analíticas se encuentran recogidas en la tabla 8.

Antes de ser empleada la fase móvil se hace pasar por filtros de membrana Durapore®, PVDF (fluoruro de polivinilideno) Millipore® de 0,45 µm y se desgasifica.

Los reactivos empleados para preparar las fases móviles fueron:

- Acetonitrilo grado HPLC. Lab-Scan, Dublín (Irlanda).
- Metanol grado HPLC. Lab-Scan, Dublín (Irlanda).
- Agua destilada desionizada obtenida a partir de un sistema de filtración de agua Milli-Q, Millipore®.

Tabla 8. Métodos de HPLC empleados.

	Método A	Método B
Columna	Mediterranea® Sea C18 5µm 150x4,6mm i.d.	
Fase móvil	metanol:acetonitrilo:agua (52:30:18) ajustada con ácido acético a un pH de 4,5	acetonitrilo: agua (85:15)
Volumen de inyección	20 µL	
Flujo	1,8 mL/min	1 mL/min
λ	228 nm	205 nm

Preparación de las muestras

Para poner a punto ambos métodos analíticos se prepararon una solución patrón de CBD disuelto en metanol (15µg/mL), y una solución patrón de Δ⁹-THC disuelto en metanol (15µg/mL), las cuales fueron analizadas en las condiciones descritas en la tabla 8.

1.2. Validación.

La validación del método analítico se llevó a cabo conforme a las directrices de la ICH Q2 (R1). Así fueron evaluados la especificidad, la linealidad, el límite de

cuantificación, la exactitud y la precisión (repetibilidad y precisión intermedia) del método analítico para cada uno de los cannabinoides.

1.2.1. Estudio de especificidad.

Se dice que un método analítico es específico cuando es capaz de determinar cualitativamente el analito sin interferencias de ningún otro compuesto.

Las muestras a analizar contienen, junto con el analito, otros componentes que potencialmente pueden interactuar en el análisis cuantitativo del principio activo, tales como polímero, productos de degradación del fármaco y del polímero, etc. Por ello es necesario comprobar que estos componentes no interfieran en el análisis.

Se ha realizado un estudio de selectividad de los cannabinoides respecto a:

- el polímero empleado para la elaboración de las micropartículas, poli- ϵ -caprolactona;
- los productos de degradación del cannabinoide, empleando muestras de CBD o Δ^9 -THC que han sido sometidas a condiciones de estrés: luz, calor, oxidación, medio ácido y medio básico;
- el medio de cesión empleado para los estudios de cesión *in vitro*.

Preparación de las muestras

Para determinar la especificidad frente a productos de degradación se prepararon diferentes ampollas con una solución de CBD o Δ^9 -THC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol y se expusieron a distintas condiciones con el fin de provocar la degradación del principio activo:

- Temperatura: 60°C.
- Luz solar directa.
- Oxígeno: una solución madre metanólica se diluyó con peróxido de hidrógeno al 3%, de manera que la concentración final de cannabinoide fuera de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estas muestras fueron mantenidas a 25°C.
- Medio ácido: una solución madre metanólica se diluyó con ácido clorhídrico 0,1 N, de manera que la concentración final de cannabinoide fuera de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estas muestras fueron mantenidas a 25°C.

- Medio básico: una solución madre metanólica se diluyó con NaOH 0,1 N, de manera que la concentración final de cannabinoide fuera de 50 µg/mL. Estas muestras fueron mantenidas a 25°C.

Las muestras se mantuvieron en las condiciones indicadas para forzar su degradación. A diferentes tiempos fueron analizadas empleando las condiciones analíticas previamente descritas (tabla 8).

Para evaluar la capacidad del método analítico de cuantificar el cannabinoide en presencia del polímero se analizaron muestras de micropartículas placebo y muestras de micropartículas cargadas de cannabinoide preparadas según el protocolo descrito para la cuantificación del principio activo microencapsulado (apartado 1.1.).

Asimismo, se analizaron el medio de cesión empleado en los ensayo de cesión *in vitro* (PBS pH 7,4-Tween®80 0,1%) y muestras de los ensayos de cesión para comprobar que éste no interfería en la cuantificación del cannabinoide.

Evaluación de los resultados

Se analizaron los cromatogramas obtenidos con el fin de identificar el pico del principio activo, y evaluar si éste estaba bien diferenciado de los otros picos.

1.2.2. Estudio de linealidad, proporcionalidad y sensibilidad.

La linealidad de un método analítico es su capacidad (dentro de un intervalo establecido) de obtener resultados directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra.

Preparación de las muestras

Se disolvieron 10 mg de CBD o Δ^9 -THC en 10 mL de metanol, teniendo la disolución madre patrón una concentración de 1mg/mL. A partir de ésta se prepararon, mediante dilución con fase móvil, cinco muestras, con concentraciones de 0,7; 1; 5; 10 y 15 µg/mL, siendo la muestra de 10 µg/mL la dilución de referencia. Las demás muestras presentan concentraciones entre el 7 y el 150% de la de referencia.

Para evaluar la linealidad del método analítico se prepararon tres curvas de calibración a partir de tres soluciones madre patrón.

Análisis de las muestras

Las tres curvas de calibrado fueron analizadas un mismo día.

Evaluación de los resultados

A partir de los resultados obtenidos se calcularon mediante el programa informático *Statgraphics Plus 5,0 (Manugistics, USA)* los siguientes parámetros:

- Los coeficientes de correlación (r) y de determinación (r^2) para confirmar la correlación entre las dos variables (área y concentración de fármaco) en el intervalo de trabajo.
- Mediante el cálculo del estadístico χ^2 (test de Bartlett) se determina si las varianzas de las respuestas obtenidas (áreas) para cada concentración de analito son homogéneas o heterogéneas para proceder a calcular los parámetros de la recta de regresión por mínimos cuadrados ordinarios o ponderados, respectivamente.
- Se determinan los parámetros de la recta de regresión por mínimos cuadrados para obtener la curva de calibración que relaciona respuestas (áreas) con la concentración de analito.
- Se verifica el modelo lineal propuesto mediante un ANOVA.
- Asimismo se determina, mediante el estadístico "t" de Student, si la ordenada en el origen difiere significativamente de cero, esto es, si el método es proporcional.

La sensibilidad es la capacidad de un método analítico de detectar pequeñas variaciones en la concentración. En el estudio de sensibilidad se determinan:

-La sensibilidad de calibrado o la pendiente de la recta de calibrado; a mayor pendiente, mayor sensibilidad.

-La sensibilidad analítica o aleatoriedad de las respuestas debida a diferencias en la concentración. La sensibilidad analítica es la pendiente de la recta de calibrado, o sensibilidad de calibrado, dividida por la desviación estándar de la respuesta. La unidad de medida de la sensibilidad analítica es, pues, el

inverso de la concentración, por ello se prefiere, por lo general, conocer la llamada capacidad discriminante.

-La capacidad discriminante, o menor diferencia de concentración de analito que puede ponerse de manifiesto con una probabilidad dada. Se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{c.d.} = \text{SD}_y * t_{(i-1)} / b \quad (\text{Ec. 1})$$

donde “SD_y” es la desviación estándar combinada, t_(i-1) el valor de t-Student correspondiente a un umbral de probabilidad de 0,05 y a los grados de libertad de la muestra estudiada, “i” el número de concentraciones distintas empleadas, y “b” la pendiente de la recta de calibrado.

1.2.3. Determinación de la precisión.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una misma muestra homogénea. Estadísticamente se puede definir como la distribución de los valores analíticos individuales alrededor de un valor medio.

La determinación de la precisión del método analítico se ha realizado mediante los estudios de *repetibilidad* y de *precisión intermedia*. En el ensayo de repetibilidad comprobamos la variabilidad del método en el mismo día del análisis, mientras que en el análisis de precisión intermedia vamos a evaluar la variabilidad existente entre diferentes días.

Preparación de las muestras

Se utilizaron dos tipos de muestras problema:

a) Mezclas artificiales: se prepararon mezclas de microesferas placebo y cannabinoide a diferente concentración.

Se partió de un único lote de micropartículas placebo y de una disolución madre de CBD o Δ⁹-THC en metanol (25μg/mL).

De este lote de micropartículas se tomó una fracción (10 mg) sobre la que se adicionó 1 mL de diclorometano con el fin de romper las micropartículas. Sobre la disolución anterior se añadió CBD o Δ⁹-THC disuelto en metanol, y se diluyó con fase móvil hasta obtener una concentración final de cannabinoide de 0,7;

10 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estas muestras fueron preparadas por triplicado, y fueron analizadas el mismo día.

Estas muestras fueron empleadas para evaluar la repetibilidad del método analítico.

b) Muestras reales: micropartículas cargadas de CBD o Δ^9 -THC.

Se partió de 100 mg de micropartículas de CBD o Δ^9 -THC preparadas a partir de una relación inicial p.a.:polímero 15/150. Se pesaron fracciones de 15 mg de micropartículas, se rompieron mediante agitación en vórtex tras la adición de 1 mL de diclorometano, y posteriormente se realizó una dilución con fase móvil para obtener una concentración teórica de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Estas muestras fueron empleadas para el estudio de repetibilidad (se analizó seis veces un mismo día un mismo lote de microesferas), y para el estudio de precisión intermedia (se evaluó por triplicado, tres días consecutivos, un mismo lote de micropartículas).

Análisis de las muestras y evaluación de los resultados

Antes de inyectar las muestras en el cromatógrafo éstas fueron filtradas mediante filtros de jeringa de PTFE de 0,45 μm (Teknokroma®, Barcelona, España).

i. Repetibilidad.

A partir de los valores de área obtenidos se calcularon la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV). El CV refleja la repetibilidad del método, y a partir de él se fijaron el número mínimo de réplicas necesarias para obtener un resultado fiable con un nivel de aceptación del 0,02. Asimismo, mediante el test de Bartlett se evaluó si la concentración de analito influía en la varianza de la respuesta.

ii. Precisión intermedia.

Para estudiar la precisión intermedia en función del día de análisis, se calcularon la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados obtenidos al valorar por triplicado, tres días consecutivos, las micropartículas cargadas.

Con el fin de evaluar si el factor tiempo influía en la precisión de los resultados se compararon el CV del estudio de precisión intermedia con el CV obtenido en el estudio de repetibilidad.

1.2.4. Determinación de la exactitud.

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor verdadero. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores que deben corregirse.

Preparación de las muestras

Se utilizaron las muestras de micropartículas placebo a las que se añadió fármaco en solución a tres niveles de concentración diferentes: 0,7; 10 y 15 µg/mL, por triplicado, empleadas para el estudio de repetibilidad.

Evaluación de los resultados

El contenido en CBD y Δ^9 -THC en las muestras se expresó como porcentaje recuperado respecto al contenido real. Se calculó, a cada concentración, la media del porcentaje de recuperación, su desviación estándar (SD), coeficiente de variación (CV) y los límites de confianza al 95 %. El porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 98-102%, lo cual es equivalente a un $\pm 2\%$ de error relativo. También se realizó un test "t" de Student para comprobar que el valor medio de recuperación no difiere del 100%.

Además, también se evaluó, según recomendaciones de la USP (*The United States Pharmacopeia 31 NF26*, 2008), si al representar gráficamente la cantidad de cannabinoide recuperada frente a la cantidad adicionada se obtenía una línea recta, y el intervalo de confianza de la pendiente de dicha recta contenía el valor teórico 1.

1.2.5. Determinación del límite de cuantificación.

El límite de cuantificación es la menor concentración o cantidad de analito en una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación se determinó a partir de la pendiente (b) y la desviación estándar (SD) de la ordenada en el origen de la recta de calibración, mediante la ecuación establecida en la guía ICHQ 2 (R1):

$$\text{Límite de cuantificación} = \left(\frac{10 \times \text{SD}}{b} \right) \quad (\text{Ec. 2})$$

1.3. Determinación de la idoneidad del sistema.

Para evaluar la idoneidad del sistema cromatográfico se emplean diferentes parámetros:

- Tiempo de retención: es el tiempo al cual eluye el analito. Se utiliza para caracterizar e identificar todos los picos que aparecen en el cromatograma.
- El factor de asimetría (T) es una medida de la simetría del pico (fig. 17). Se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$T = \left(\frac{W_{0,05}}{2f} \right) \quad (\text{Ec. 3})$$

donde f es la distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del pico, y $W_{0,05}$ es la anchura del pico al 5% de la altura del pico.

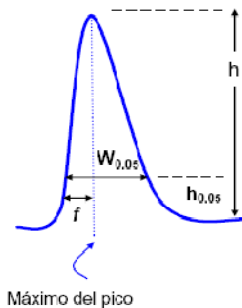


Figura 17. Pico cromatográfico asimétrico

(*The United States Pharmacopeia 31 NF26*, 2008).

Los picos perfectamente simétricos tienen un valor de 1, y a medida que la asimetría se ve pronunciada el valor de T también va en aumento. La importancia de tener picos simétricos en los cromatogramas está relacionada con la resolución del método para poder integrar áreas.

- El **número de platos teóricos (N)** es una medida de la eficiencia de la

columna. Para picos gaussianos se calcula a partir de la siguiente ecuación (*The United States Pharmacopeia 31 NF26, 2008*):

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \quad (\text{Ec. 4})$$

donde t_R es el tiempo de retención de la sustancia a estudiar y $W_{h/2}$ es el ancho del pico a mitad de altura.

Una columna con un alto número de platos teóricos presentará un pico más estrecho a un determinado tiempo de retención que una columna con un menor valor de "N". Así, cuanto mayor sea el valor de "N", mayor será la eficiencia de la columna.

Para realizar estos estudios se empleó una solución stock de CBD o Δ^9 -THC (10 $\mu\text{g/mL}$).

2

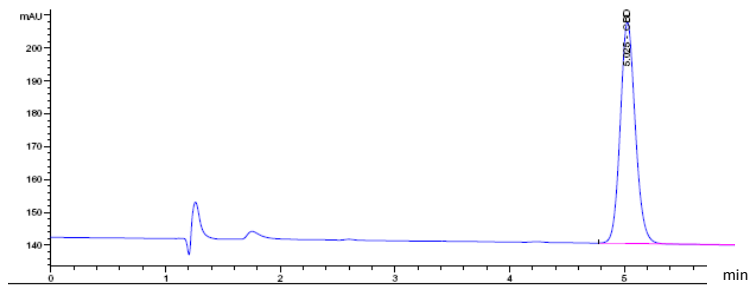
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

2.1. Definición y puesta a punto.

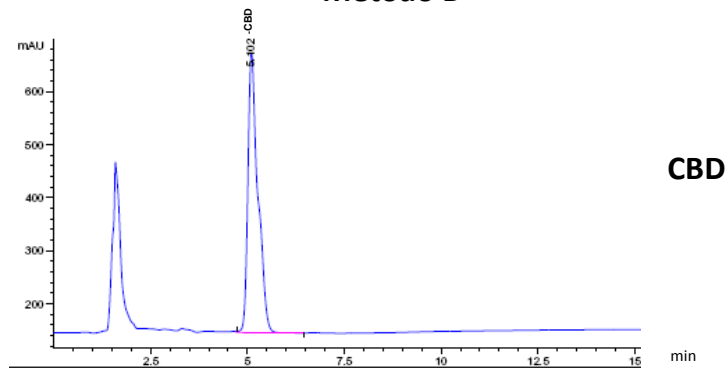
En la figura 18 aparecen los cromatogramas obtenidos a partir de las muestras patrón (CBD o Δ^9 -THC disueltos en metanol 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por ambos métodos analíticos. Con los dos métodos analíticos el principio activo mostró un pico estrecho, separado del frente del solvente, a un tiempo de retención aceptable (unos 5 minutos el CBD y unos 7-10 minutos el Δ^9 -THC). Estos resultados sugieren que, en principio, parece que ambos métodos cromatográficos podrían ser usados para cuantificar el CBD y el Δ^9 -THC en muestras separadas.

No obstante, si ambos cannabinoides estuvieran presentes en la misma muestra (de hecho existe una formulación comercializada que contiene ambos cannabinoides, Sativex[®]), el método cromatográfico A ofrecería una mejor separación de los picos. Esto es debido a que, aunque con los dos métodos el CBD eluye a un tiempo de retención de unos 4-5 minutos, el Δ^9 -THC eluye a unos 11 minutos con el método A y a unos 7 minutos con el método B (figura 18).

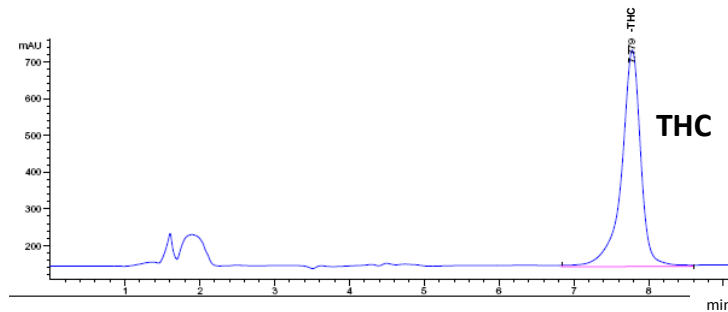
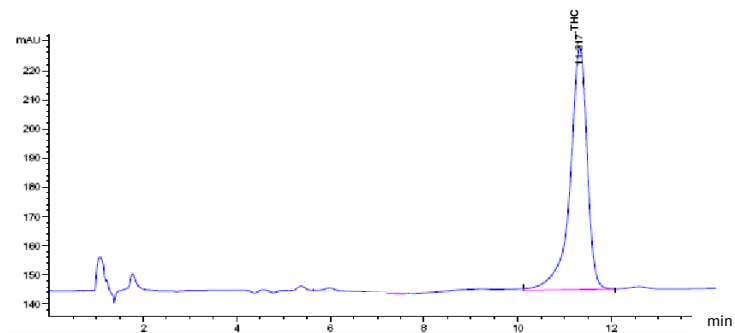
Método A



Método B



CBD



THC

Figura 18. Cromatogramas obtenidos al analizar una solución patrón de CBD o THC 15 µg/mL mediante los métodos de HPLC A y B.

2.2. Validación.

2.2.1. Estudio de especificidad.

a. Cannabidiol.

Los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras de CBD sometidas a degradación ácida, básica, la acción del oxígeno, la temperatura o la luz por ambos métodos cromatográficos aparecen recogidos en las figuras 19 (método A) y 20 (método B).

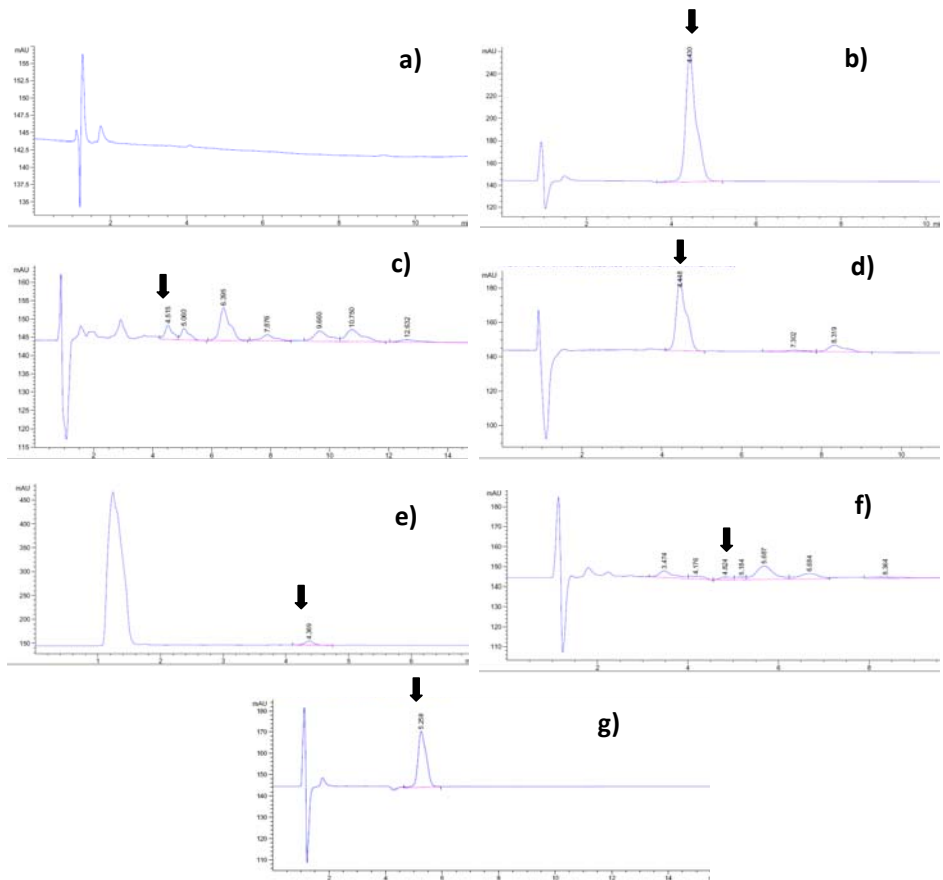


Figura 19. Cromatogramas correspondientes al estudio de especificidad del método cromatográfico A para el cannabidiol: (a) fase móvil, (b) CBD 50 µg/mL, (c) degradación ácida, (d) degradación básica, (e) oxidación, (f) temperatura y (g) luz.

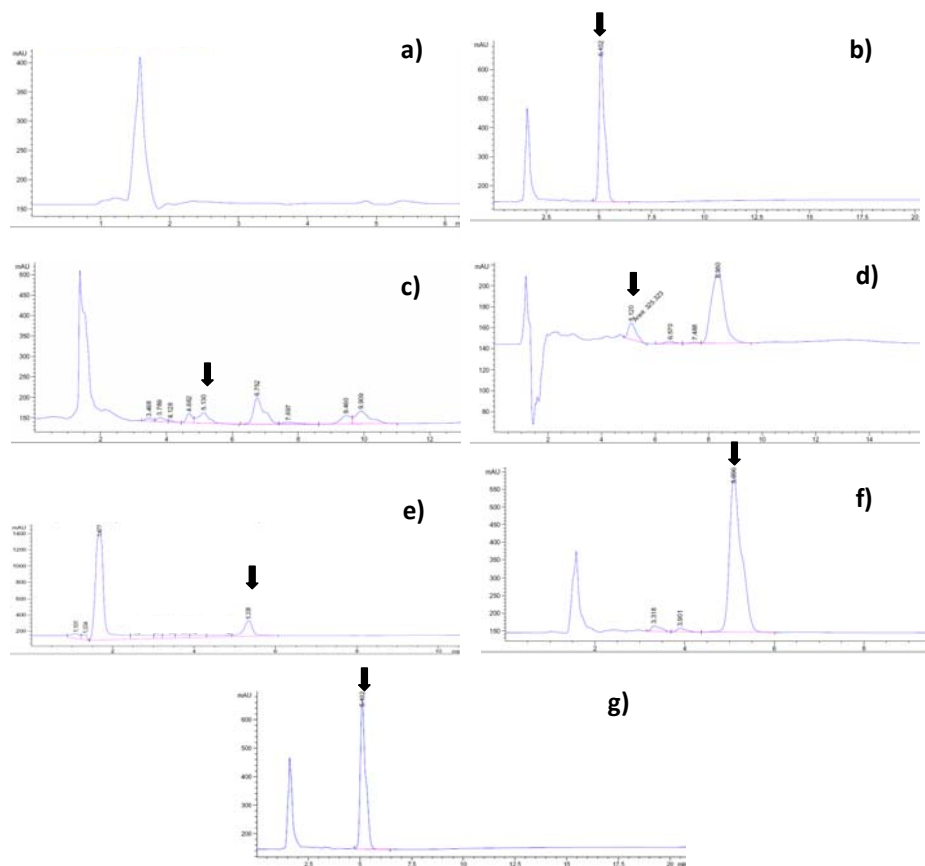


Figura 20. Cromatogramas correspondientes al estudio de especificidad del método cromatográfico B para el cannabidiol: (a) MeOH, (b) CBD 50 µg/mL, (c) degradación ácida, (d) degradación básica, (e) oxidación, (f) temperatura y (g) luz.

A la vista de los resultados obtenidos podemos afirmar que al analizar el principio activo inalterado aparece un único pico en los cromatogramas, correspondiente al mismo. Sin embargo, al analizar las muestras correspondientes a una degradación forzada del CBD –principalmente degradación ácida y oxidación-, ese pico presenta un área menor, y/o aparecen picos adicionales en los cromatogramas –correspondientes a los productos de degradación originados-, bien separados del pico del CBD inalterado. Estos resultados nos indican que, en principio, ambos métodos cromatográficos serían capaces de cuantificar el CBD inalterado en presencia de sus principales productos de degradación.

b. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol.

Las figuras 21 y 22 recogen los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras de Δ^9 -THC sometidas a degradación ácida, básica, la acción del oxígeno, la temperatura o la luz por los métodos cromatográficos A y B, respectivamente.

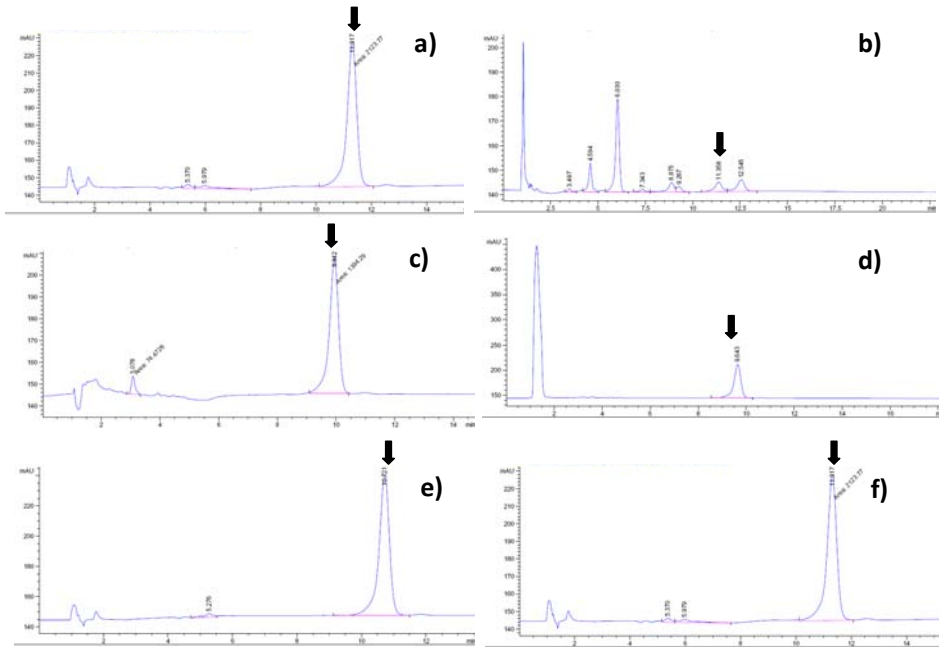


Figura 21. Cromatogramas correspondientes al estudio de especificidad del método cromatográfico A para el Δ^9 -tetrahydrocannabinol: (a) Δ^9 -THC 50 $\mu\text{g/mL}$, (b) degradación ácida, (c) degradación básica, (d) oxidación, (e) temperatura y (f) luz.

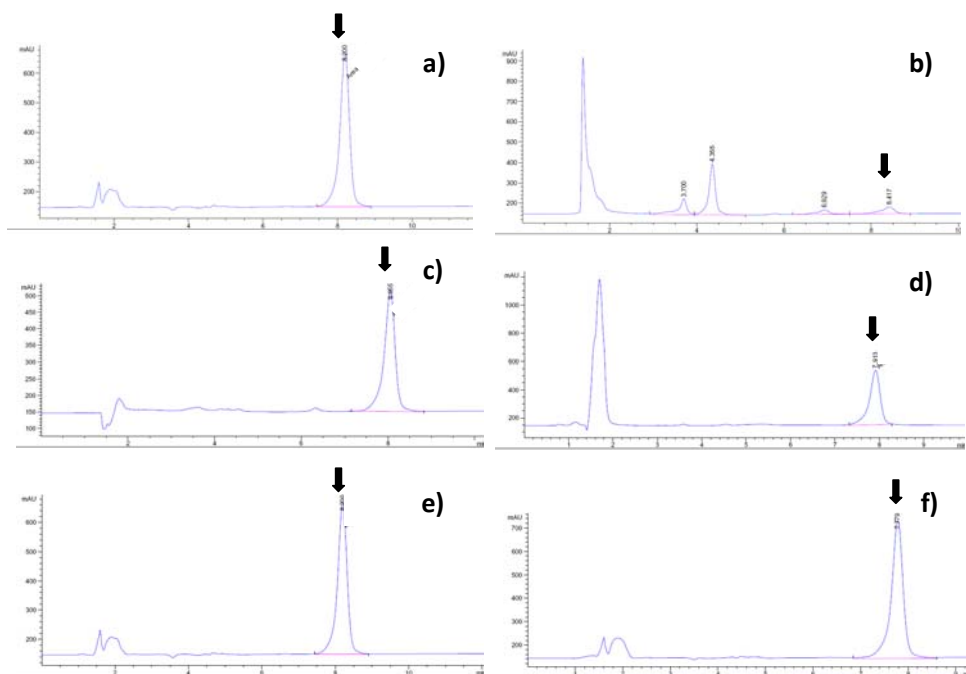


Figura 22. Cromatogramas correspondientes al estudio de especificidad del método cromatográfico B para el Δ^9 -tetrahidrocannabinol: (a) Δ^9 -THC 50 $\mu\text{g/mL}$, (b) degradación ácida, (c) degradación básica, (d) oxidación, (e) temperatura y (f) luz.

Al igual que ocurría con el CBD, al analizar las muestras correspondientes a una degradación forzada del Δ^9 -THC, disminuye el área correspondiente al Δ^9 -THC inalterado, y aparecen picos adicionales en los cromatogramas, bien separados del pico correspondiente al p.a. inalterado (figuras 21b, d y 22b, d). Por ello, aparentemente ambos métodos también podrían ser válidos para cuantificar el Δ^9 -THC en presencia de sus principales productos de degradación.

Respecto a la selectividad de ambos métodos cromatográficos, tanto el método A como el B fueron capaces de separar el CBD y el Δ^9 -THC inalterados de sus principales productos de degradación. Sin embargo, debido a que el método cromatográfico A presenta una mayor separación entre los picos de CBD y Δ^9 -THC, y debido a la escasez mundial de acetonitrilo, se seleccionó el método A para proseguir con su validación y su empleo en el presente trabajo.

La figura 23 muestra los cromatogramas obtenidos al valorar micropartículas placebo, micropartículas cargadas, medio de cesión y muestras de los ensayos de cesión *in vitro* con el método A.

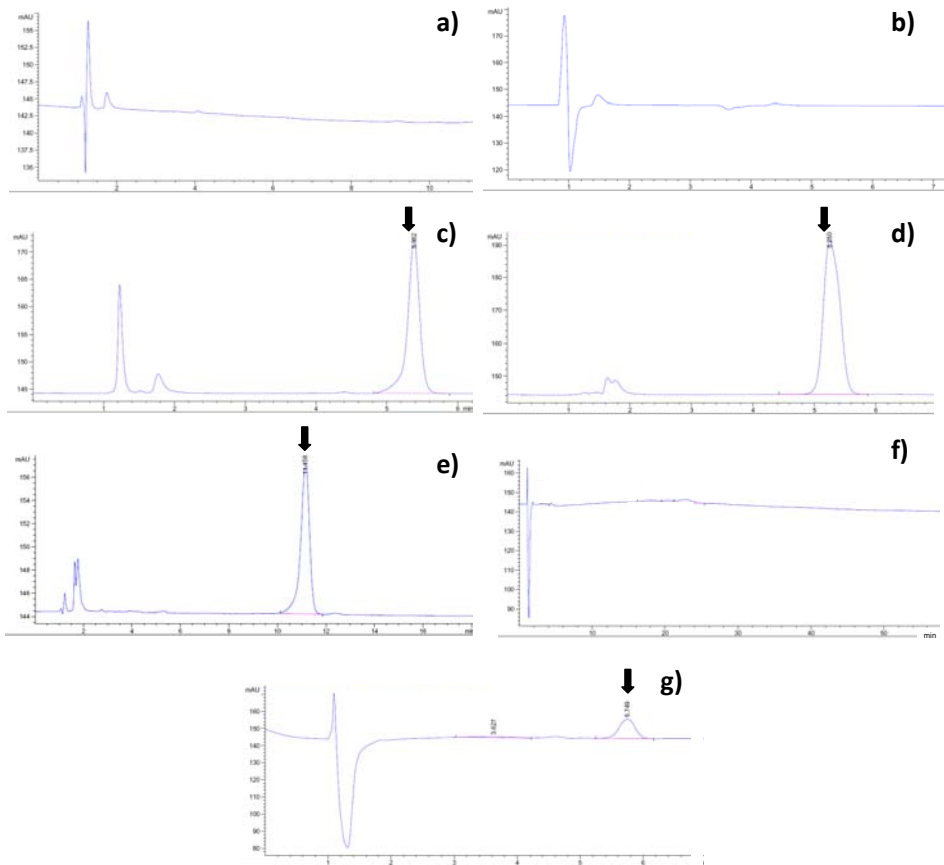


Figura 23. Método A. Cromatogramas correspondientes al estudio de especificidad del método cromatográfico A: (a) fase móvil, (b) micropartículas de PCL placebo, (c) CBD disuelto en fase móvil, (d) micropartículas de CBD 15/150, (e) micropartículas de THC 15/150-5% antioxidante, (f) medio de cesión y (g) muestra del ensayo de cesión de las micropartículas de CBD.

A la vista de estos cromatogramas se concluyó que ni los excipientes ni los aditivos de nuestra formulación, ni el medio de cesión interferían con el pico del principio activo. Por lo tanto podemos considerar que el método cromatográfico A es

específico para la determinación de CBD y Δ^9 -THC en los estudios en los que será empleado.

2.2.2. Estudio de linealidad, proporcionalidad y sensibilidad.

En las tablas 9 y 10 se recogen los resultados (en áreas) del estudio de linealidad para el CBD y el Δ^9 -THC, respectivamente.

Tabla 9. Áreas obtenidas por HPLC en el estudio de linealidad del CBD.

Concentración CBD ($\mu\text{g/mL}$)	Solución 1	Solución 2	Solución 3
0,7	27,518	28,512	29,402
1	38,606	38,914	39,714
5	180,801	181,215	188,391
10	345,675	356,964	365,520
15	538,320	538,602	540,822

Tabla 10. Áreas obtenidas por HPLC en el estudio de linealidad del Δ^9 -THC.

Concentración Δ^9 -THC ($\mu\text{g/mL}$)	Solución 1	Solución 2	Solución 3
0,7	21,261	22,351	20,979
1	30,600	35,867	32,556
5	165,652	163,052	172,614
10	332,470	333,429	339,531
15	509,572	512,837	525,239

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos tras el análisis estadístico de los resultados del estudio de linealidad.

Tabla 11. Linealidad. Parámetros estadísticos.

Parámetro	Resultados CBD	Resultados THC
Número de datos	15	15
Intervalo de linealidad ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,7-15	0,7-15
Coefficiente de correlación (r)	0,9988	0,9996
Coefficiente de determinación (r^2)	99,7794	99,9303
Homogeneidad de varianzas (χ^2)	2,939 ($p=0,062$)	2,3438 ($p=0,130$)
Suma de cuadrados residuales	1312,03	371,807
Pendiente "b" ($\text{UA}\cdot\text{mL}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	36,2543	34,3664
SD de la pendiente ($\text{UA}\cdot\text{mL}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	0,4727	0,2516
Ordenada en el origen "a" (UA)	2,0799	-3,3485
SD de la ordenada en el origen (UA)	2,4637	2,1101
CV Residual (%)	6,2441	5,3479
F ANOVA de la regresión	5880,46 ($p=0,0000$)	18646,03 ($p=0,0000$)
F ANOVA modelo lineal	0,34 ($p=0,7983$)	2,05 ($p=0,1704$)
Test "t" de proporcionalidad	0,524 ($p=0,6086$)	1,586 ($p=0,136$)

Los coeficientes de correlación (r) fueron próximos a 1, lo que indica una elevada correlación entre las dos variables analizadas (concentración de analito y área del pico cromatográfico). En efecto, como indican los coeficientes de determinación (r^2), en el caso del CBD el 99,78% de la variación del área del pico es debida a una variación en la concentración de analito, y en el caso del Δ^9 -THC el 99,93% de la variación del área del pico es debida a una variación en la concentración de fármaco.

El test de homocedasticidad (χ^2) confirmó que el factor concentración de analito no influyó en la varianza de la respuesta, por lo que se trabajó con mínimos cuadrados ordinarios para llevar a cabo el análisis de regresión.

En la tabla 11 se recogen los valores de pendiente y ordenada en el origen de las

curvas de calibrado, con sus desviaciones estándar correspondientes, así como el coeficiente de variación residual de cada ajuste.

Puesto que el valor de p del análisis de varianza con falta de ajuste al modelo lineal para el CBD y el Δ^9 -THC fue superior a 0,10 en ambos casos, se puede concluir que, para los dos cannabinoides, existe una relación lineal estadísticamente significativa entre el área bajo la curva (y) y la concentración de analito (x), con un nivel de confianza del 99 %.

El estadístico t-Student calculado para la ordenada en el origen nos indicó que en ninguno de los dos casos ésta difería estadísticamente de cero, lo que indica que ambos métodos son proporcionales.

En la figura 24 aparecen representadas las curvas de calibrado definidas en el estudio de linealidad para ambos cannabinoides.

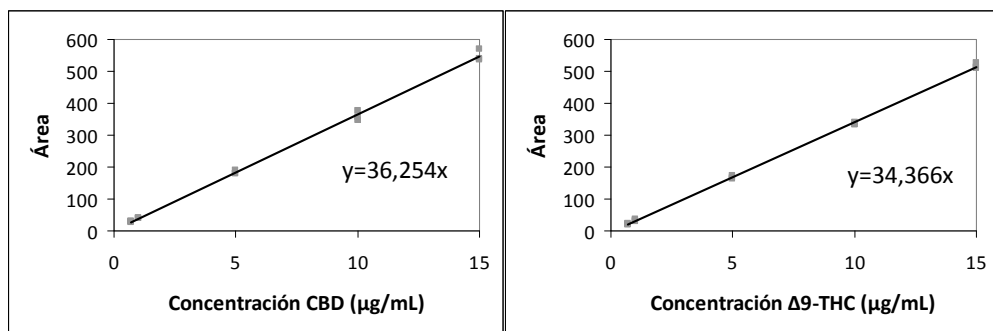


Figura 24. Curvas de calibrado definidas en el estudio de linealidad del método analítico para el CBD y el Δ^9 -THC.

La tabla 12 recoge los resultados obtenidos en el estudio de sensibilidad. La sensibilidad del método analítico se determina a partir de la pendiente de la recta de regresión (sensibilidad de calibrado). Al haber observado un error homocedástico -a través del test de Bartlett-, se calcularon la sensibilidad analítica así como la capacidad discriminante media.

Aunque la sensibilidad de calibrado fue similar para ambos cannabinoides, la sensibilidad analítica media fue superior para el Δ^9 -THC, lo que indica que el método es más sensible para este compuesto. En efecto, la capacidad discriminante, o menor diferencia de concentración de analito que puede ponerse de manifiesto con una probabilidad del 95% fue de 0,87 μg/mL para el CBD y 0,43 μg/mL para el Δ^9 -THC.

Tabla 12. Sensibilidad del método cromatográfico para el CBD y el Δ^9 -THC.

	CBD	Δ^9 -THC
Sensibilidad de calibrado ($\text{UA}\cdot\text{mL}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	36,2543	34,3664
Sensibilidad analítica media ($\text{mL}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	3,1674	6,3722
Capacidad discriminante ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0,8764	0,4356

2.2.3. Estudio de precisión.

La determinación de la precisión del método analítico se realizó mediante los estudios de *repetibilidad* y de *precisión intermedia*.

2.2.2.a. Repetibilidad.

Los análisis estadísticos de los datos del estudio de repetibilidad para el CBD aparecen recogidos en las tablas 13 y 14 para los estudios con muestras artificiales y muestras reales, respectivamente.

Tabla 13. Análisis estadístico de la repetibilidad y de la exactitud del método para el cannabidiol (muestras artificiales).

Concentración CBD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Recuperación	Recuperación media (%)	SD	CV (%)	$\bar{x}\pm t\times\text{SD}$
0,7	100,449	98,968	1,301	1,315	95,277-102,428
0,7	98,006				
0,7	98,450				
10	100,003	99,334	0,947	0,953	96,988-101,688
10	98,250				
10	99,750				
15	99,140	100,355	1,568	1,563	96,458-104,253
15	99,800				
15	102,26				

$\chi^2=1,0848$ ($p=0,8188$)

F ANOVA=0,92 ($p=0,4481$)

$\bar{R}=99,5531$

CV (%)=1,29%

$\bar{x} \pm t \times SD : 98,565-100,541$

$b \pm t \times SD_b : 0,983-1,022$

“t”_{R=100%} = 1,044 ($p=0,326$)

A la vista de los resultados reflejados en la tabla 13, podemos afirmar que debido a que el valor de p del test de Bartlett fue superior a 0,05, el nivel de analito no influyó en la precisión del método.

El CV en todos los casos fue inferior al 2%, lo que se considera una precisión aceptable.

Tabla 14. Análisis estadístico de la repetibilidad del método para el cannabidiol (muestras reales).

$\mu\text{g CBD}/10\text{mg MPs}$	Media	SD	CV (%)
982,136	981,699	7,011	0,714
982,095			
973,508			
975,907			
993,675			
982,874			
N=0,848 ($\alpha=0,02$)			

Cuando se utilizaron muestras reales se obtuvo incluso un resultado mejor. En efecto, al analizar un mismo día un mismo lote de micropartículas de CBD-PCL seis veces el CV fue inferior al 1% (tabla 14). Como se observa en dicha tabla, el número de réplicas necesarias para obtener un resultado preciso con una probabilidad del 98% es de 1.

En las tablas 15 y 16 aparecen recogidos los resultados correspondientes al estudio de repetibilidad para el Δ^9 -THC con muestras artificiales y muestras reales, respectivamente.

Tabla 15. Análisis estadístico de la repetibilidad y de la exactitud del método para el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (muestras artificiales).

Concentración Δ^9 -THC ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperación	Recuperación media (%)	SD	CV (%)	$\bar{x} \pm t \times \text{SD}$
0,7	102,283	100,638	2,035	2,022	95,423-106,054
0,7	98,296				
0,7	101,636				
10	101,793	99,749	1,770	1,774	95,352-104,147
10	98,741				
10	98,713				
15	101,964	100,287	1,454	1,450	96,675-103,9
15	99,515				
15	99,381				

$$\chi^2=1,0377 \text{ (p=0,9130)}$$

$$F \text{ ANOVA}=0,22 \text{ (p=0,8053)}$$

$$\bar{R}=100,259$$

$$\text{CV (\%)}=1,620\%$$

$$\bar{x} \pm t \times \text{SD} : 99,009-101,508$$

$$b \pm t \times \text{SD}_b : 0,981-1,022$$

$$"t"_{R=100\%}=0,478 \text{ (p=0,645)}$$

Debido a que el valor de p del test de Bartlett fue superior a 0,05, podemos afirmar que el nivel de analito no influyó en la precisión del método analítico.

El CV global fue inferior al 2%. Sin embargo, el coeficiente de variación a la concentración de 0,7 $\mu\text{g/mL}$ (límite inferior del intervalo) fue ligeramente superior a dicho valor.

Tabla 16. Análisis estadístico de la repetibilidad del método para el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (muestras reales).

$\mu\text{g } \Delta^9\text{-THC /10mg MPs}$	Media	SD	CV (%)
930,089	941,421	8,659	0,919
931,651			
941,586			
948,479			
946,790			
949,933			
N=1,405 ($\alpha=0,02$)			

No obstante, cuando se utilizaron muestras reales el valor del CV fue mejor, siendo incluso inferior al 1% (tabla 16).

El número de réplicas necesarias para obtener un resultado preciso para el Δ^9 -THC con una probabilidad del 98% fue de 2.

Al haberse obtenido coeficientes de variación inferiores al 2% con ambos cannabinoides podemos afirmar que ambos métodos analíticos son precisos. Además, como se deduce del estudio de repetibilidad, una sola determinación es necesaria para cuantificar con una precisión del 98% el contenido en CBD en las microesferas, y dos para el Δ^9 -THC.

2.2.3.b. Precisión intermedia.

Los resultados relativos al estudio de precisión intermedia para el CBD y el Δ^9 -THC se encuentran recogidos en las tablas 17 y 18, respectivamente.

Tabla 17. Evaluación de los resultados correspondientes al estudio de la precisión intermedia para el CBD.

Día	$\mu\text{g CBD/10mg MPs}$	Media	SD	CV (%)
1	982,136	981,699	7,011	0,714
	982,095			
	973,508			
	975,907			
	993,675			
	982,874			

2	994,104	994,723	1,421	0,142
	996,349			
	993,717			
3	1019,076	1005,314	14,276	1,420
	990,574			
	1006,293			

$$CV_{\text{interdía}}=1,190$$

$$F\text{-Snedecor}=2,8481 \text{ (} F_{\text{tabulado (0,05;2;5)}}=5,7861\text{)}$$

Tabla 18. Evaluación de los resultados correspondientes al estudio de la precisión intermedia para el Δ^9 -THC.

Día	$\mu\text{g THC}/10\text{mg MPs}$	Media	SD	CV (%)
1	930,089	941,421	8,659	0,919
	931,651			
	941,586			
	948,479			
	946,790			
	949,933			
2	963,733	952,835	9,701	1,018
	945,139			
	949,634			
3	937,727	944,259	6,292	0,666
	944,768			
	950,282			

$$CV_{\text{interdía}}=0,628$$

Según los resultados de la tabla 17, para el CBD el CV del estudio de precisión intermedia fue superior al CV obtenido en el estudio de repetibilidad. Por tanto, con el fin de evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de los resultados de los estudios de precisión intermedia y de repetibilidad

se utilizó la prueba F de Snedecor. Los resultados obtenidos indican que al ser la F experimental (2,8481) inferior a la F tabulada (5,7861) podemos aceptar la hipótesis nula de igualdad de varianzas, y por tanto afirmar que el factor tiempo no influyó en la precisión de los resultados.

En el caso del Δ^9 -THC, tal y como podemos apreciar en la tabla 18, el CV en el estudio de precisión intermedia fue inferior al CV obtenido en el estudio de repetibilidad, por lo que podemos concluir que el factor tiempo tampoco influyó en la precisión del método analítico.

2.2.4. Estudio de exactitud.

Los resultados referentes al estudio de exactitud para el CBD y el Δ^9 -THC se muestran en las tablas 13 y 15, respectivamente. El contenido en CBD y Δ^9 -THC en las muestras se expresó como porcentaje recuperado respecto al contenido real.

Para ninguno de los cannabinoides la concentración de analito influyó en la exactitud del método, como demuestra el análisis de varianza realizado.

La recuperación media obtenida difirió del 100% en menos de un 2%, y el 100% se encontró dentro de los límites de confianza de la recuperación media. Además, a través de un test "t" de Student, se comprobó que el valor medio de recuperación no difirió estadísticamente del 100%.

A continuación aparece representada gráficamente la concentración de analito recuperada frente a la concentración real.

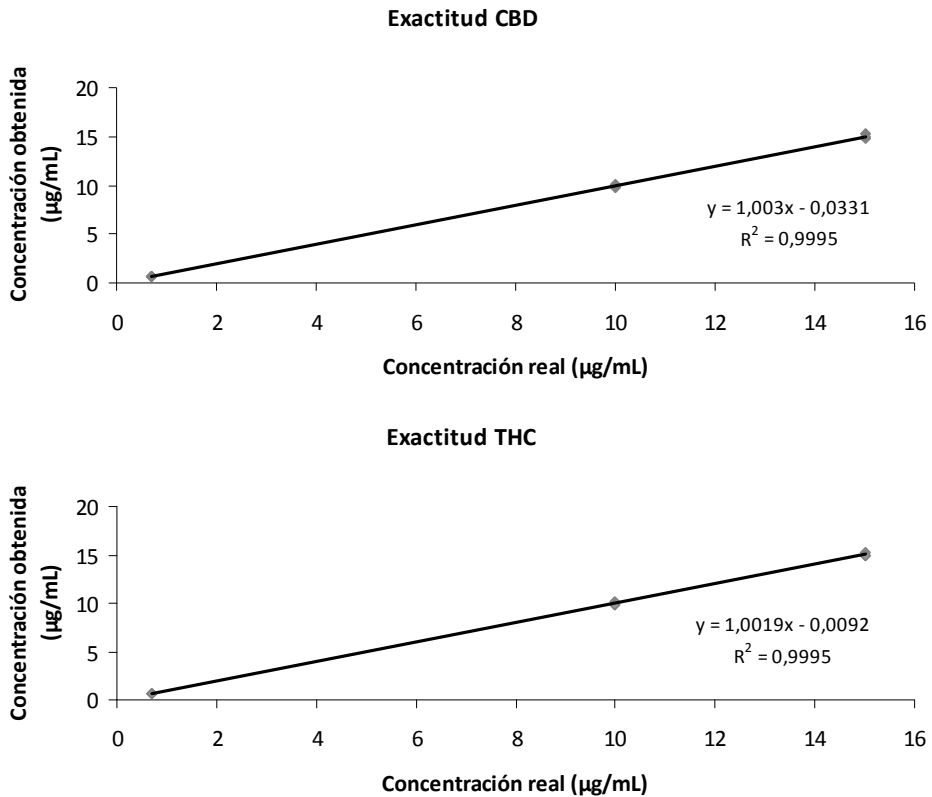


Figura 25. Representación gráfica de los resultados de exactitud del método analítico.

Para ambos cannabinoides se ha obtenido un coeficiente de correlación elevado ($r > 0,999$). Tal y como reflejan las tablas 13 y 15, el intervalo de confianza de la pendiente de la recta concentración real/concentración obtenida, para ambos cannabinoides comprendió el valor teórico 1.

Por todo ello, podemos concluir que para ambos compuestos el método analítico cumple la condición de exactitud.

2.2.5. Determinación del límite de cuantificación.

Los límites de cuantificación calculados para el método cromatográfico A para cada uno de los cannabinoides estudiados se encuentran recogidos en la tabla 19. En ambos casos dicho límite fue próximo al nivel mínimo de concentración empleado para los estudios de linealidad (0,7 µg/mL). Como ya se ha demostrado en apartados anteriores, el método analítico ha demostrado ser preciso y exacto a ese nivel de

concentración y, por tanto, este nivel de concentración se fijó como límite de cuantificación del método analítico.

Tabla 19. Límites de cuantificación para el CBD y el Δ^9 -THC.

	CBD	Δ^9 -THC
Límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)	0,6742	0,6139

2.3. Determinación de la idoneidad del sistema.

Para la cualificación del aparato se calculan los parámetros recogidos en la tabla 20.

Tabla 20. Cualificación del HPLC.

Parámetro	CBD	Δ^9 -THC
Tiempo muerto (min)	1	1
Eficacia de la columna: número de platos teóricos (N)	7312	9618
Tiempo de retención (t_R) (min)	5,380	10,760
Factor de asimetría (T)	0,87	0,93

La FDA (*FDA. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*, 1994) recomienda utilizar columnas con $N \geq 2000$ platos teóricos, valor ampliamente superado en nuestro método analítico.

El tiempo de retención obtenido fue considerado adecuado, ni demasiado breve, ni demasiado prolongado, lo que reduciría considerablemente la capacidad de análisis de muestras y, como ya se comentó en el apartado 2.1, este método cromatográfico ofrece una buena separación del CBD y del THC si se encontraran presentes en la misma muestra.

El factor de simetría del pico del analito en ambos casos estuvo comprendido entre 0,8 y 1,5; cumpliendo así las especificaciones de la USP (*The United States Pharmacopeia 31 NF26*, 2008).

3

CONCLUSIONES

De los dos métodos analíticos inicialmente propuestos se seleccionó el método cromatográfico A puesto que el cannabidiol y el Δ^9 -tetrahidrocannabinol eluían a tiempos de retención más separados, y por tanto, en el caso de muestras que contengan ambos cannabinoides dicho método ofrecería una mejor resolución de los picos. Además, el hecho de que en el momento de realizar estos estudios existía una escasez mundial de acetonitrilo y el porcentaje de este solvente en la fase móvil del método A era inferior, apoyó esta elección.

En este capítulo se ha demostrado la capacidad de este método analítico por cromatografía líquida de alta resolución, para el análisis cuantitativo de CBD y Δ^9 -THC. El método A propuesto resulta válido para la cuantificación de cada uno de los cannabinoides al ser específico, lineal, preciso y exacto.



**IV. DESARROLLO Y
CARACTERIZACIÓN DE
LAS MICROESFERAS**

**IV. MICROSPHERES
DEVELOPMENT AND
CHARACTERIZATION**

1 | MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. ELABORACIÓN DE LAS MICROESFERAS.

La preparación de microesferas por el método de emulsión-evaporación comprende cuatro pasos fundamentales representados en la figura 26:

- i. Disolución o dispersión del principio activo en un solvente orgánico volátil, inmiscible en agua, que contiene el polímero disuelto;
- ii. Emulsificación por agitación de esta fase orgánica en la fase continua (generalmente acuosa que contiene un surfactante) inmiscible con la primera (solvente orgánico) con la consiguiente formación de pequeñas gotículas;
- iii. Eliminación del solvente orgánico de la fase dispersa por dos mecanismos:

- a. extracción del solvente orgánico de la fase dispersa mediante su difusión a través de la fase continua, y
 - b. evaporación del solvente en la interfaz líquido/aire. Conforme tiene lugar la evaporación del solvente orgánico las microesferas “maduran”: se forma una estructura de tipo matricial constituida por el polímero en la que queda “atrapado” el principio activo.
- iv. Aislamiento mediante filtración, y lavado de las microesferas para eliminar las posibles sustancias que hayan podido quedar adheridas a su superficie (emulgente, fármaco no encapsulado). La adición de agua destilada, además del lavado, favorece la eliminación del solvente orgánico residual de las microesferas (Sinha *et al.*, 2004). Por último, el proceso de secado elimina los restos de fase continua y líquido de lavado adsorbidos en la superficie de las microesferas (Freitas *et al.*, 2005).

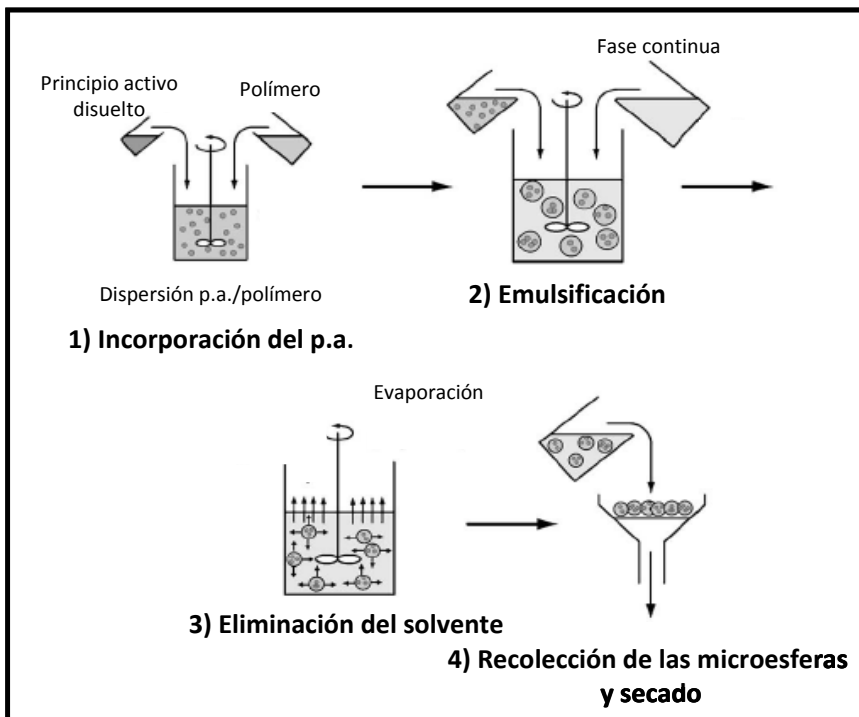


Figura 26. Esquema de los principales pasos a seguir en la elaboración de microesferas por emulsión-evaporación (Freitas *et al.*, 2005).

El disolvente orgánico más usado en la técnica de microencapsulación por evaporación del solvente basada en la formación de emulsiones O/A es el **diclorometano** por su elevada volatilidad (punto de ebullición a presión atmosférica de 38,5°C) que facilita su eliminación por evaporación (Watts *et al.*, 1990), por su limitada solubilidad en agua (2%), y por presentar muy buenas propiedades como disolvente de muchos polímeros, incluida la poli- ϵ -caprolactona.

Como fase externa se empleó una disolución acuosa de alcohol polivinílico. La función del emulsificante en la producción de las microesferas por evaporación de solvente es la estabilización de las gotículas de la fase interna de la emulsión.

Protocolo inicial de microencapsulación:

- 1) Preparar una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA, peso molecular \approx 30.000-70.000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) al 0,5% y dejar en agitación magnética durante 8 horas. Ésta es la fase acuosa de la emulsión.
- 2) Pesar 500 mg de poli- ϵ -caprolactona (PCL, peso molecular \approx 42.500, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- 3) Disolver la cantidad de cannabinoide a encapsular (THC Pharm GmbH, Frankfurt, Alemania) en 5mL de diclorometano (Panreac Química S.A., Barcelona, España) agitando en vórtex, y cuando esté bien disuelto añadir la PCL agitando de nuevo en vórtex hasta su completa disolución. Ésta constituye la fase orgánica de la emulsión.
- 4) Añadir la fase orgánica sobre 250 mL de fase acuosa.
- 5) Agitar 6 minutos a 3000 rpm en homogeneizador de alta velocidad (Polytron PT 3000 Kinematica® AG, Lucerna, Suiza) para formar la emulsión.
- 6) Evaporar el solvente orgánico agitando con un agitador de turbina (JK Eurostar IKA® Labor Technik, Alemania) durante 3 horas a 200 rpm.
- 7) Tomar una muestra para verificar al microscopio óptico que se han formado las microesferas y verificar su estado de agregación.
- 8) Filtrar las microesferas (equipo de filtración Büchi Vac® V-500, Suiza) con filtro Millipore® PTFE 5,0 μ m y lavar la torta con 50 mL de agua destilada por

triplicado.

- 9) Recolectar la torta, resuspender en agua destilada las micropartículas y liofilizarlas (Flexi-Dry MP™, FTS® Systems, NY, USA).
- 10) Calcular el rendimiento del proceso.

En la figura 27 se muestra un esquema del proceso:

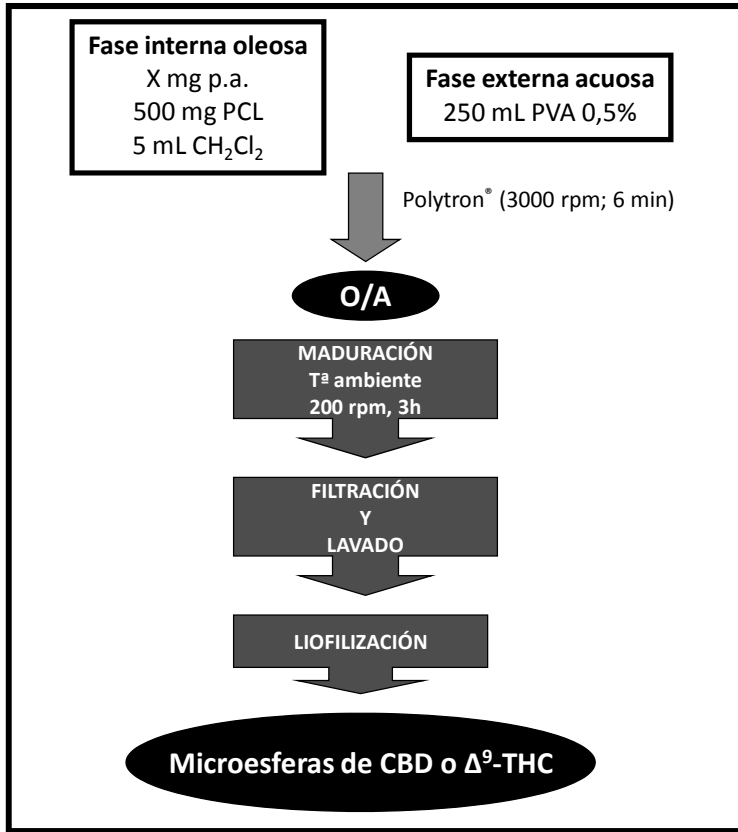


Figura 27. Esquema ilustrativo del protocolo de elaboración de microesferas de CBD o Δ^9 -THC mediante la técnica de emulsión- evaporación.

A partir de este protocolo inicial se evaluó la influencia de dos variables:

a) Efecto de la velocidad de agitación en el tamaño de las microesferas.

Ya que el tamaño de las microesferas es crítico para su administración parenteral, se evaluó el efecto de la velocidad de agitación del homogeneizador

al formar la emulsión en el tamaño de las microesferas. Para ello se elaboraron microesferas placebo siguiendo el protocolo descrito modificando únicamente la velocidad de agitación: 3000 rpm ó 5000 rpm.

A continuación se determinó la distribución de tamaños de los dos tipos de micropartículas mediante difracción de rayos láser utilizando el equipo Microtrac® SRA 150 Particle Size Analyzer (Leeds & Northrup Instruments, Irlanda).

b) Elaboración de microesferas con distinta carga en principio activo.

Con el objetivo de lograr un contenido en principio activo en las microesferas lo más elevado posible, para administrar la mayor cantidad de fármaco y la mínima de polímero, se estudió la posibilidad de microencapsular distintas cantidades de fármaco. Para ello se elaboraron distintos lotes de microesferas utilizando el protocolo de microencapsulación por emulsión O/A-evaporación descrito, variando únicamente la relación inicial principio activo:polímero.

Durante el proceso de elaboración de las microesferas, como control de rutina, se toma una muestra de líquido y se coloca en un portaobjetos con el fin de verificar al microscopio óptico que se han formado micropartículas. De esta manera también se puede evaluar su forma, su tamaño y su estado de agregación.

El rendimiento de producción refleja el porcentaje de microesferas obtenidas con respecto a la cantidad total de material empleado (principio activo y polímero). El rendimiento del proceso se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{mg microesferas obtenidas}}{(\text{mg p.a.} + \text{mg polímero})} \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

❖ Elaboración de micropartículas de cannabidiol.

Las proporciones teóricas principio activo:polímero empleadas fueron:

- ✓ 5:150
- ✓ 10:150
- ✓ 15:150
- ✓ 30:150
- ✓ 50:150

❖ Elaboración de micropartículas de Δ^9 -tetrahidrocannabinol.

Las micropartículas de Δ^9 -THC se prepararon siguiendo el protocolo desarrollado para la elaboración de micropartículas de CBD. Sin embargo, debido a que el THC se oxida muy fácilmente por acción del oxígeno atmosférico y la luz UV (Mechoulam, 1981), las microesferas fueron elaboradas saturando previamente la fase acuosa con gas nitrógeno, y preparando la emulsión O/A bajo atmósfera de nitrógeno.

Además se adicionó un antioxidante a la formulación, vitamina E acetato (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), a distintas proporciones (0,05 ó 5%) evaluándose también la influencia del mismo sobre la cesión *in vitro* del THC a partir de los sistemas.

Se emplearon distintas relaciones iniciales principio activo:polímero para la elaboración de las microesferas, con el fin de determinar la carga máxima de fármaco. Las proporciones iniciales THC:PCL utilizadas fueron:

- ✓ 15:150
- ✓ 30:150
- ✓ 50:150

1.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS.

1.2.1. Tamaño, forma y estado de agregación.

a. Microscopio electrónico (SEM).

Se analizaron la superficie, la morfología y el estado de agregación de las partículas de cannabidiol materia prima (el THC materia prima es una resina) y de todas las formulaciones de micropartículas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Microscopio Jeol- JSM-6400, Tokyo, Japón). Para ello, es necesario preparar las muestras de la siguiente manera: en primer lugar, se deposita una pequeña cantidad de microesferas liofilizadas sobre cinta adhesiva de grafito en un soporte de aluminio. Posteriormente, se introducen las muestras en un evaporador de grafito (MED 010, Balzers Union, Liechtenstein) durante media hora. Finalmente se someten a un proceso de recubrimiento con oro (Emitech K550X, Emitech Ltd., Reino Unido) durante 4 minutos. Una vez preparadas las muestras, se introducen en el

microscopio electrónico de barrido, se observan diferentes campos a distintos aumentos y se toman las fotografías.

Además, con el objetivo de evaluar la morfología interna de las micropartículas (si la matriz es continua o, si por el contrario, aparecen cavidades o cristales de fármaco), se embebieron las micropartículas de CBD en una resina líquida (Spurr Resin embedding kit, TAAB Laboratories Equipment Ltd, Berkshire, UK) que posteriormente se polimerizó a 40°C (temperatura inferior al punto de fusión del CBD y de la poli-ε-caprolactona) durante 3 días. A continuación se realizaron microcortes transversales del bloque de resina bajo la lupa con el fin de cortar también las micropartículas. Finalmente los bloques preparados se introdujeron en el evaporador de grafito y se recubrieron con oro para su posterior observación con el microscopio electrónico.

b. Difracción de rayos láser.

Se determinó la distribución de tamaños en volumen de las diferentes formulaciones de micropartículas mediante difracción de rayos láser utilizando el equipo Microtrac® SRA 150 Particle Size Analyzer (Leeds & Northrup Instruments, Irlanda), que permite la medición de partículas con tamaños comprendidos entre 0,69 y 704 μm. Para ello se preparó una suspensión de cada formulación de microesferas en agua desionizada, agitándose en el ultrasonidos para facilitar la dispersión de las mismas. A continuación, se añadieron unas gotas de la suspensión recién preparada en la celda del equipo, semillena con agua desionizada, y se introdujo la celda en el equipo para proceder a su análisis.

El diámetro estadístico medio que caracteriza la población se expresó como diámetro volumen momento (μm), el cual representa el centro de gravedad de la distribución y tiene un significado similar al promedio aritmético ponderado sobre la distribución de volumen.

Además se calculó la polidispersión o anchura de la distribución de tamaño de partícula (también conocida como “span”) mediante la fórmula:

$$\text{Polidispersión} = \frac{D_{0,9} - D_{0,1}}{D_{0,5}} \quad (\text{Ec. 6})$$

donde $D_{0,9}$, $D_{0,5}$ (o mediana) y $D_{0,1}$ son los diámetros de partícula determinados al percentil 90, 50 y 10 respectivamente (Mathew *et al.*, 2009) (figura 28).

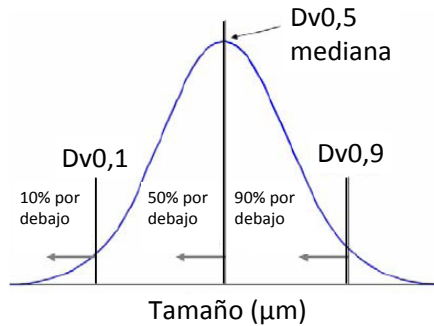


Figura 28. Valores $D_{0,1}$, $D_{0,5}$ y $D_{0,9}$.

Así, cuanto más estrecha sea la distribución, tanto más pequeño será su valor de span.

1.2.2. Contenido de principio activo en las microesferas y eficacia de encapsulación.

El contenido en principio activo o capacidad de encapsulación hace referencia a la cantidad de sustancia activa encapsulada por masa de microesferas. Se expresa como mg p.a./100 mg de microesferas.

La eficacia de encapsulación (EE) se calcula a partir de la relación entre el principio activo que realmente ha sido encapsulado y aquel en disposición de ser encapsulado, a partir de la expresión:

$$EE (\%) = \frac{\left(\frac{\text{p.a.}}{\text{polímero}} \right)_{\text{experimental}}}{\left(\frac{\text{p.a.}}{\text{polímero}} \right)_{\text{teórico}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

Interesa que tanto el contenido en principio activo como la eficacia de encapsulación sean lo más elevados posibles. Es decir, es importante incorporar la mayor cantidad posible de principio activo por peso de microesferas con el objeto de que el peso final de la formulación no sea excesivo. Además, desde un punto de vista económico conviene que todo o prácticamente todo el principio activo utilizado en el

proceso sea encapsulado, para evitar pérdidas.

Para la cuantificación del CBD y el THC encapsulado se utilizaron los métodos analíticos por HPLC previamente descritos. Se rompieron las microesferas con diclorometano, y se realizaron diluciones con la fase móvil. A continuación las muestras fueron filtradas por filtros de PTFE de 0,45µm (Teknokroma®; Barcelona, España) y se analizaron por HPLC, utilizando las condiciones descritas anteriormente. Además, también se cuantificó por HPLC el fármaco presente en el sobrenadante obtenido tras la filtración de las microesferas. Cada lote fue analizado por duplicado.

1.2.3. Compatibilidad y solubilidad principio activo:polímero, estado físico del cannabinoide en las microesferas y efecto del contenido en cannabinoide sobre el grado de cristalinidad de la PCL.

Antes de proceder a la formulación de un medicamento es importante conocer la estabilidad física del principio activo y su compatibilidad con los excipientes que formarán parte de la formulación. Los cambios de estado físico y la degradación de una sustancia van acompañados de cambios en el flujo de calor o en la capacidad calorífica, por lo que el análisis térmico juega un papel importante en el desarrollo de nuevas formulaciones (Dubernet, 1995; Gramaglia *et al.*, 2005; Graves *et al.*, 2004; Hausberger *et al.*, 1995).

La **calorimetría diferencial de barrido (DSC)** es una herramienta útil para evaluar las propiedades térmicas de las micropartículas, pues es capaz de suministrar información tanto cualitativa como cuantitativa sobre la naturaleza del fármaco encapsulado en las microesferas, permitiendo determinar el estado físico del fármaco en la matriz polimérica (Dubernet, 1995). El fármaco puede encontrarse en solución sólida, dispersión molecular metaestable o cristalizado, y la disposición del fármaco en las microesferas puede influenciar la liberación del mismo a partir de los sistemas (Dubernet, 1995).

Además esta técnica también es capaz de indicarnos si existen interacciones entre el fármaco y el polímero empleado en la encapsulación (Dhanaraju *et al.*, 2003; Dubernet, 1995; Espuelas *et al.*, 1997).

La calorimetría diferencial de barrido también permite determinar la solubilidad principio activo:polímero a partir de mezclas físicas de ambos componentes, pues la concentración de fármaco correspondiente a calor de fusión cero (ausencia de

cristales) corresponderá a la solubilidad del fármaco en el polímero (Dubernet, 1995; Gramaglia *et al.*, 2005; Theeuwes *et al.*, 1974).

Igualmente, mediante DSC puede determinarse el grado de cristalinidad del polímero que forma las microesferas, ya que el área del punto de fusión está relacionada con el calor de fusión, el cual a su vez está relacionado con el grado de cristalinidad de la muestra (Mundargi *et al.*, 2007).

En este trabajo se investigó la compatibilidad principio activo-polímero, la solubilidad del CBD en el polímero, el estado físico del fármaco en las micropartículas, y la cristalinidad del polímero en todas las formulaciones de micropartículas desarrolladas.

Los barridos de DSC se llevaron a cabo en un calorímetro diferencial de barrido DSC 820 (Mettler-Toledo) con un intracooler Huber TC100, utilizando nitrógeno como gas de purga. El equipo fue calibrado con indio. Las muestras (3-5 mg) se colocaron sobre cápsulas de aluminio de 40 μ L con pin (ME-27331, Mettler Toledo) y fueron sometidas a un ciclo de calentamiento de 0 a 100 $^{\circ}$ C a una velocidad de 10 $^{\circ}$ C/min bajo una atmósfera inerte de nitrógeno (flujo de 70 mL/min), utilizando una cápsula de aluminio vacía como referencia.

Se realizaron estudios sobre el fármaco en estado puro, el polímero puro, mezclas físicas CBD:PCL, microesferas placebo y microesferas conteniendo CBD o THC. Debido a la imposibilidad de pesar cantidades exactas de poli- ϵ -caprolactona materia prima (se presenta en forma de pellets de \approx 9 mg), las mezclas físicas CBD:PCL se prepararon utilizando microesferas de PCL placebo.

Debido a que el Δ^9 -THC materia prima se presenta como una resina oleosa difícil de pesar no se pudieron preparar mezclas físicas THC:PCL, lo que impidió realizar los estudios de solubilidad de THC:PCL y de compatibilidad.

Se tomó como punto de fusión el punto en el cual comenzaba la fusión, tal y como es convención en DSC (Li *et al.*, 2007). El calor de fusión fue calculado a partir del área bajo la curva del pico de fusión (Stinchcomb *et al.*, 2004), y el grado de cristalinidad del polímero en las microesferas se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\lambda_m (\%) = (\Delta H_m / \Delta H_{cm}) * 100 \quad (\text{Ec. 8})$$

donde λ_m representa el grado de cristalinidad, ΔH_m es la entalpía de fusión de la muestra, y ΔH_{cm} es la entalpía de fusión del polímero 100% cristalino ($\Delta H_{cm} = 139,5 \text{ J/g}$ para la PCL) (Ali *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 1999)

Todos los análisis se realizaron por triplicado.

1.2.4. Ensayos de cesión *in vitro*.

La liberación del principio activo a partir de las microesferas está gobernada por una serie de factores que son dependientes del polímero, del principio activo y de la propia microesfera. Entre los dependientes del polímero, se puede citar su estructura química, su hidrofobia, su viscosidad, su peso molecular y su estado cristalino. Entre los parámetros relacionados con el principio activo, destaca la solubilidad del mismo en el polímero y en el medio de cesión, y su peso molecular. Por último, factores dependientes de la propia micropartícula son, por ejemplo, el tipo de estructura interna (reservorio o matricial), la porosidad y el contenido teórico de principio activo con respecto al polímero. De estos factores va a depender fundamentalmente la velocidad de bioerosión de la micropartícula y la capacidad de difusión del principio activo a través de la estructura polimérica. Bioerosión y difusión son los dos principales mecanismos implicados en la liberación de un principio activo a partir de sistemas poliméricos biodegradables.

Los medios de cesión utilizados para realizar estos ensayos simulan los fluidos del organismo: son medios acuosos de pH 7,2-7,4 obtenidos a partir de soluciones amortiguadoras fosfato.

Como el CBD y el Δ^9 -THC son moléculas muy lipídicas -su coeficiente de solubilidad en medio acuoso es muy bajo, el CBD: 1-2 $\mu\text{g/mL}$ en solución acuosa de NaCl 0,9% (Jarho *et al.*, 1998), y el THC: 2,8 mg/L en agua y 0,77 mg/L en NaCl 0,15 M a 23°C (Garrett *et al.*, 1974a)-, dificulta el mantenimiento de las condiciones *sink* durante el ensayo de cesión; lo cual puede dar lugar a falsos resultados aparentándose una velocidad de cesión constante del principio activo desde las microesferas, cuando, en realidad, lo que ocurre es que se ha alcanzado el coeficiente de solubilidad (C_s) en el medio de cesión.

Resulta, por lo tanto, muy importante diseñar el ensayo de cesión de manera que se garantice que durante todo el ensayo la concentración del principio activo disuelto

está por debajo del C_s .

Para buscar las condiciones *sink* se puede actuar a nivel de tres variables:

- a. Intervalo de toma de muestras: tomar muestras a cortos intervalos de tiempo impediría la saturación del medio de cesión ya que al tomar muestra se repone el líquido extraído con nuevo líquido sin principio activo.
- b. Aumentar el volumen de medio de cesión. Así la cantidad de principio activo quedaría más diluida, disminuyendo la probabilidad de alcanzar la saturación.
- c. Incorporar en el medio de cesión sustancias que aumenten el C_s del principio activo en el medio (D'Souza *et al.*, 2006). Con tal fin se suelen utilizar tensioactivos como el Tween® 80 (Hombreiro Pérez *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Marinina *et al.*, 2000; Vivek *et al.*, 2007) o proteínas.

Se realizó un estudio preliminar para determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo los ensayos de cesión a partir de las micropartículas cargadas de CBD. En este estudio preliminar se modificaron las variables (b) y (c) (Hernán, 2007). Como consecuencia de dicho estudio se fijaron las siguientes condiciones experimentales para los ensayos de cesión *in vitro*:

- Medio de cesión: Solución reguladora fosfato (PBS) pH 7,4 que se preparó a partir de dos soluciones madre:

- Solución de fosfato monopotásico 1/15 Molar (por litro 9.073 g de KH_2PO_4) (Panreac Química SA, Barcelona, España).

- Solución de fosfato disódico dihidrato 1/15 Molar (por litro 11,87 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Alemania).

a la que se añadió Tween® 80 (Panreac Química SA, Barcelona, España) al 0,1% peso/volumen para aumentar el C_s del cannabinoide en el tampón (Hombreiro Pérez *et al.*, 2000). El medio de disolución se atempera a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

- Volumen de medio:

- 15mL para las formulaciones 5/150, 10/150 y 15/150, y
- 30mL para las formulaciones 30/150 y 50/150.

La selección del volumen de medio de cesión depende de dos factores:

- i. el volumen de medio ha de ser lo suficientemente elevado como para que la concentración del principio activo permanezca alejada de su C_s (D'Souza *et al.*, 2006), pero
- ii. si el volumen de medio es muy alto puede ocurrir que la disolución esté demasiado diluida y la concentración esté por debajo del límite de cuantificación del método analítico.

Se estudió la cinética de cesión *in vitro* a partir de cada una de las formulaciones elaboradas, siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Se colocaron 15 mg de micropartículas de cada una de las formulaciones en tubos de vidrio previamente recubiertos con Sigmacote® (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) para evitar la adherencia de los cannabinoides al vidrio, y se adicionaron 15 ó 30 mL de medio de cesión (PBS pH 7.4-Tween® 80 0,1%). Los tubos se introdujeron en el baño de agitación (Clifton® NE 5-28, Reino Unido) a 37°C con agitación de vaivén 100 rpm y un recorrido de 2 cm, y a los diferentes tiempos de muestreo (3h, 1, 2, 3, 5, 7 10, 13, 16 y 20 días) se retiraron 14 mL (formulaciones 5/150, 10/150 y 15/150) ó 28 mL (formulaciones 30/150 y 50/150) de medio de cesión con una aguja acoplada a una jeringa con el fin de no retirar las micropartículas, reponiendo el volumen extraído con medio nuevo atemperado. Las muestras extraídas fueron filtradas (filtros de nylon 0,45 μm , Teknokroma®, Barcelona, España) y el contenido de cannabinoide fue cuantificado por HPLC. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

Finalmente, tras los ensayos de cesión, las micropartículas remanentes fueron liofilizadas y observadas por microscopía electrónica para evaluar el grado de degradación de la poli- ϵ -caprolactona. Asimismo estas micropartículas fueron analizadas por HPLC para cuantificar el porcentaje de fármaco remanente en las mismas tras los ensayos de cesión.

El porcentaje de fármaco disuelto a los distintos tiempos se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Cantidad disuelta} = (\text{Concentración} * \text{Volumen total}) + \text{Cantidad extraída acumulada a tiempo anterior}$$

$$\% \text{ disuelto} = \frac{\text{cantidad disuelta}}{\text{mg p.a. iniciales}} \times 100 \quad (\text{Ec. 10})$$

A partir de los perfiles de disolución obtenidos para cada formulación, se calcularon los siguientes parámetros:

A) Parámetros modelo independientes.

- $t_{10\%}$, $t_{60\%}$ y $t_{90\%}$: tiempo que tarda en disolverse un 10%, 60% ó 90% de fármaco encapsulado.
- Eficacia de disolución (ED): se define como el área bajo la curva de disolución hasta un tiempo t , expresado como porcentaje del área del rectángulo descrito por el 100% de disolución a dicho tiempo, y se calcula a partir de la ecuación:

$$ED (\%) = \frac{AUC_0^T}{Q_{100} \times T} \times 100 \quad (\text{Ec. 11})$$

La eficacia de disolución se calculó a los 13 días de iniciar los ensayos de cesión.

- En el caso de las micropartículas de THC, con el fin de determinar si la incorporación de antioxidante en la formulación modificaba la cinética de liberación del THC a partir de las microesferas, se empleó el modelo independiente del proceso de disolución para la comparación de los perfiles de disolución (formulación con antioxidante *versus* formulación similar sin antioxidante). Este modelo establece dos factores de comparación: el factor de diferencia (f_1) y el factor de similitud (f_2) (Costa *et al.*, 2001b; Moore *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2008).

El factor de diferencia f_1 es la diferencia porcentual entre dos curvas a cada tiempo de toma de muestra; es decir, equivale a una medida del error relativo entre las dos curvas y su expresión matemática tiene la siguiente ecuación (Shah *et al.*, 1998):

$$f_1 = \left[\frac{\sum_{t=1}^{t=n} (|R_t - T_t|)}{\sum_{t=1}^{t=n} R_t} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 12})$$

en la que:

n = número de puntos de muestreo

R_t = porcentaje de fármaco disuelto acumulado a cada tiempo t a partir de la formulación de referencia

T_t = porcentaje de fármaco disuelto a cada tiempo t a partir de la formulación problema.

La FDA y la EMEA recomiendan el cálculo del factor de similitud f_2 para evaluar si dos formulaciones presentan perfiles de disolución *in vitro* similares. El factor de similitud f_2 se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$f_2 = 50 \times \log \left[\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} (R_t - T_t)^2}{n}}} \times 100 \right] \quad (\text{Ec. 13})$$

en la que:

n = número de puntos experimentales, y R_t y T_t , equivalen al porcentaje de fármaco disuelto, a cada tiempo considerado, correspondiente a la formulación de referencia y a la formulación problema, respectivamente.

Tabla 21. Diferencia media entre dos perfiles de disolución.

	2%	5%	10%	15%	20%
Límite f_2	83	65	50	41	36

Para considerar que dos perfiles de disolución son similares, el valor de f_1 debe ser próximo a 0, y el valor de f_2 cercano a 100. En general, valores de f_1 entre 0 y 15, y valores de f_2 entre 50 y 100 son indicativos de similitud de los perfiles de disolución (Costa et al., 2001).

B) Parámetros modelo dependientes.

Entre los modelos matemáticos más utilizados para analizar y describir el/los mecanismos implicados en la liberación del fármaco a partir de los sistemas se encuentran los propuestos por *Higuchi* en 1963 (Higuchi, 1963) y *Korsmeyer y Peppas* en 1983 (Korsmeyer et al., 1983), siendo el más adecuado aquel que mejor

se ajusta a los resultados experimentales.

- *Higuchi* desarrolló varios modelos teóricos para estudiar la liberación de fármacos a partir de matrices sólidas. De acuerdo a este modelo, la cesión del fármaco es descrita como un fenómeno de difusión basado en la ley de Fick, dependiente de la raíz cuadrada del tiempo, tal y como refleja la ecuación 14.

$$Q_t = K_H \cdot t^{1/2} \quad (\text{Ec. 14})$$

donde Q_t es la cantidad de fármaco cedida a tiempo t , y K_H es la constante de disolución de Higuchi.

Así, si la representación de la raíz cuadrada del tiempo frente a la cantidad de fármaco cedida acumulada es una línea recta, la cesión del fármaco a partir de esa forma farmacéutica se considera que sigue la cinética de Higuchi (Higuchi, 1961).

- No obstante, en algunos casos, el mecanismo de liberación se desvía de la ecuación de Fick, y sigue un comportamiento anómalo (liberación no-Fickiana). En esos casos, se puede emplear una ecuación más general. Korsmeyer *et al.* desarrollaron un modelo semi-empírico que relaciona exponencialmente la fracción de fármaco cedido con el tiempo transcurrido (Korsmeyer *et al.*, 1983):

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = k_d \times t^n \quad (\text{Ec. 15})$$

donde Q_t/Q_∞ es la fracción de principio activo liberada a un tiempo t ; K_d es la constante de la cinética de disolución y comprende características estructurales y geométricas de las microesferas; t es el tiempo transcurrido; y n es el exponente de cesión siendo un parámetro que depende del mecanismo de liberación y que sirve para caracterizar el mismo.

Este modelo es utilizado para analizar la cesión a partir de formas farmacéuticas poliméricas cuando el mecanismo de liberación no es conocido o cuando está implicado más de un fenómeno de cesión (Costa *et al.*, 2001b; Huang *et al.*, 2006; Mathew *et al.*, 2007). Peppas utilizó el valor del exponente n para caracterizar los diferentes mecanismos de liberación implicados (tabla 22). El valor de n se obtiene de la pendiente de la curva obtenida al representar el $\log Q_t/Q_\infty$ versus \log tiempo. No obstante, para determinar el exponente n , sólo debe usarse la porción de la curva de liberación donde $Q_t/Q_\infty < 0,6$.

Así, si el valor de n es igual o inferior a 0,5 indica que el mecanismo principal de la liberación del fármaco es a través de un fenómeno de difusión de tipo fickiano (modelo matemático de Higuchi), si toma valores $0,5 < n < 1$ indica que la difusión es una combinación de tipo fickiana y transporte caso II –relajación polimérica-, que se denomina difusión anómala; y, cuando el valor de n es 1, la cesión del fármaco sigue una cinética de orden cero (difusión no fickiana denominada transporte caso II). Para valores de n superiores a 1, el mecanismo de liberación es un proceso de difusión no fickiano denominado transporte super caso II.

Tabla 22. Interpretación de los mecanismos de difusión a través de los datos de cesión del fármaco a partir de películas poliméricas (Korsmeyer-Peppas, 1983).

Exponente de difusión (n)	Mecanismo de transporte
0,5	Difusión Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	Transporte anómalo, no fickiano
1,0	Transporte caso II
$n > 1,0$	Transporte super caso II

- Por último también se ajustaron los resultados experimentales a la *cinética de orden uno*, según la ecuación 16.

$$\ln\left(\frac{Q_t}{Q_0}\right) = K \times t \quad (\text{Ec. 16})$$

donde Q_t es la cantidad de fármaco cedido a un tiempo t ; Q_0 es la cantidad de fármaco cedido a tiempo cero; k es la constante de cesión de orden uno (Costa et al., 2001).

Según este modelo la liberación de un fármaco a partir de una forma farmacéutica es proporcional a la cantidad de principio activo remanente en la misma, de manera que la cantidad de fármaco liberado por unidad de tiempo disminuye.

2 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

2.1. ELABORACIÓN DE LAS MICROESFERAS.

a) Efecto de la velocidad de agitación en el tamaño de las microesferas.

Las distribuciones de tamaño de las micropartículas placebo obtenidas a 5000 rpm y 3000 rpm se encuentran representadas en la figura 29:

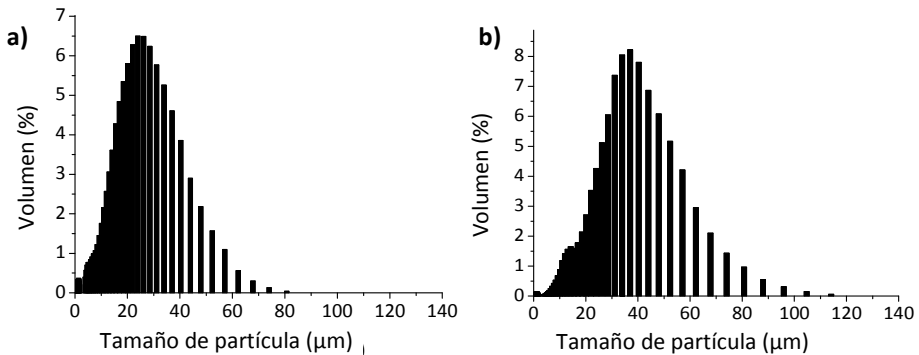


Figura 29. Distribuciones de tamaño en volumen de las microesferas obtenidas mediante agitación a (a) 5000 rpm o (b) 3000rpm.

Tal y como podemos apreciar en dicha figura, al disminuir la velocidad de agitación, conseguimos desplazar ligeramente hacia la derecha la distribución de tamaños, es decir, incrementamos el tamaño de partícula. Además, es importante destacar, que en ambos casos obtuvimos una distribución de tamaños unimodal, bastante simétrica, y ligeramente leptocúrtica.

Con respecto al tamaño medio de partícula podemos decir que a 5000 rpm éste fue de $24,74\mu\text{m}\pm 13,09\mu\text{m}$, mientras que al disminuir la velocidad de agitación a 3000 rpm éste aumentó a $36,78\mu\text{m}\pm 16,12\mu\text{m}$. Estos resultados se encuentran recogidos en la tabla 23.

Tabla 23. Resumen de los resultados de análisis del tamaño de partícula en volumen por difracción de rayos láser.

Parámetro	Velocidad de agitación	
	5000 rpm	3000 rpm
media±SD (µm)	24,74±13,09	36,78±16,12
Percentil 10	9,44±1,46	15,29±0,22
Percentil 50 (mediana)	24,01±1,16	35,67±0,16
Percentil 90	45,76±4,24	59,48±1,10

En ambos casos los tamaños de partícula obtenidos son adecuados para su administración parenteral, con percentiles 90 inferiores incluso a los 60 µm. Teóricamente a mayor tamaño de partícula, menor superficie específica y la liberación del fármaco a partir de las micropartículas sería más lenta. Dado que nuestro objetivo con las micropartículas era obtener sistemas de liberación prolongada de administración por vía parenteral, y a 3000 rpm se obtuvieron micropartículas con un tamaño adecuado para su posterior administración, se seleccionó dicha velocidad de trabajo para la elaboración de las micropartículas.

b) Elaboración de microesferas con distinta carga en principio activo.

El proceso se desarrolló con normalidad en todos los casos. Se obtuvieron microesferas para todas las relaciones iniciales p.a.:polímero (5/150, 10/150, 15/150, 30/150 y 50/150), aunque al emplear la proporción 50:150 (CBD:PCL o THC:PCL) la filtración fue muy lenta, formándose una torta difícil de despegar del filtro.

La figura 30, a modo de ejemplo, corresponde a una fotografía al microscopio óptico de las micropartículas elaboradas a partir de una relación CBD:PCL 15:150. Tal y como podemos observar, las micropartículas obtenidas fueron esféricas, de superficie lisa, no apareciendo agregados.

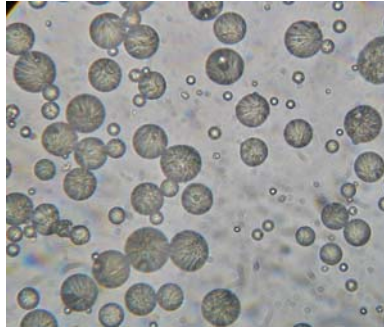


Figura 30. Fotografía de microsferas elaboradas a partir de 15 mg CBD/150 mg PCL durante la etapa de evaporación del solvente orgánico.

El rendimiento del proceso de microencapsulación fue elevado (70-90%), salvo cuando se empleó una relación p.a.:polímero de 50/150 (tabla 25). Tal y como hemos comentado anteriormente, el rendimiento del proceso disminuyó de forma drástica cuando se empleó una proporción p.a.:polímero 50:150, debido a la adhesión de las micropartículas al filtro.

2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS DE CANNABIDIOL.

2.2.1. Tamaño, forma y estado de agregación.

a. Microscopio electrónico (SEM).

La figura 31 muestra las características morfológicas del cannabidiol materia prima, y de diferentes formulaciones de microesferas de CBD. El cannabidiol es un fármaco de naturaleza cristalina (fotografía *a* de la figura 31) (Mechoulam *et al.*, 2002a); sin embargo, es importante destacar, que no se observaron cristales de fármaco en la superficie de las micropartículas (fotografías *c-f* de la figura 31). Además, no se apreciaron diferencias morfológicas entre las microesferas placebo (*b*) y aquellas cargadas de CBD (*c-f*). En todos los casos las microesferas presentaron una morfología esférica, superficie no porosa y uniforme, sin presentar deformaciones, no apareciendo en ningún caso micropartículas rotas. Asimismo, si se compara la fotografía *b* (micropartículas sin liofilizar) con las fotografías *c-f*, se puede concluir que el proceso de liofilización no influyó en la superficie de las micropartículas, no apareciendo poros en las mismas.

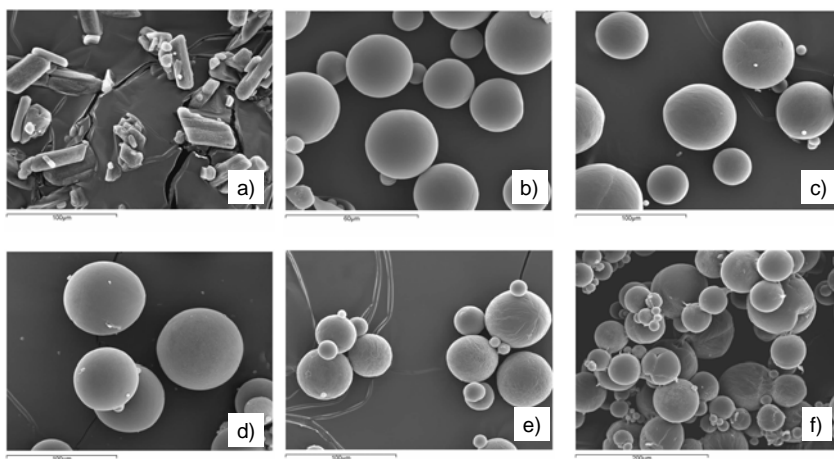


Figura 31. Fotografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido (SEM) de (a) cannabidiol materia prima; (b) microesferas placebo sin liofilizar; microesferas de cannabidiol (c) 10/150, (d) 15/150; (e) 30/150 y (f) 50/150 liofilizadas.

Cabe destacar, que al incrementar la relación principio activo:polímero, las micropartículas formadas mostraron una tendencia a la aglomeración. Así, con

relaciones iniciales 5:150, 10:150 y 15:150 (fotografías *c-d*) se obtuvieron micropartículas individualizadas, con una relación 30:150 (foto *e*) aparecieron dobletes o tripletes, pero con la relación más alta, 50:150 (foto *f*), la aglomeración fue elevada, aunque las micropartículas mantuvieron su forma esférica en todos los casos. Esta tendencia a la aglomeración fue lo que limitó el proceso, ya que con proporciones 50:150 se obtuvieron micropartículas aglomeradas, no obteniéndose un sólido pulverulento de flujo libre, fácil de pesar y manipular, y lo que es más importante, no era posible su administración mediante una aguja hipodérmica. Por ello no se probó la microencapsulación con relaciones p.a.:polímero superiores.

Las fotografías de los cortes transversales de las micropartículas cargadas de CBD (figura 32) pusieron de manifiesto la continuidad de la matriz polimérica, así como la ausencia de cristales de CBD en el interior de las microesferas.

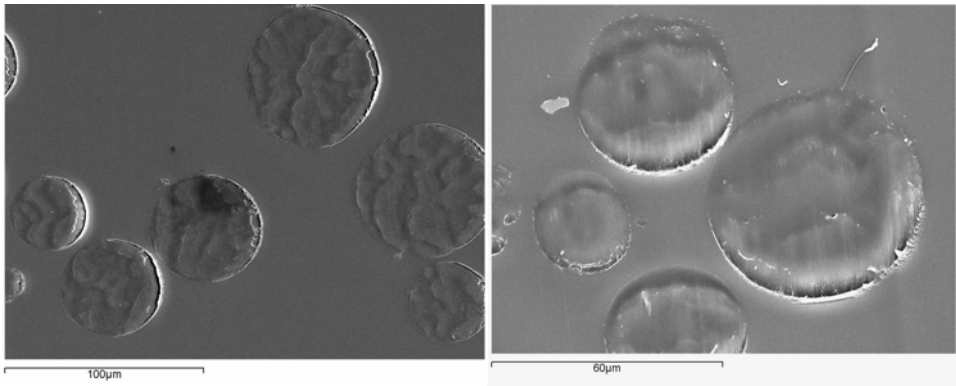


Figura 32. Corte transversal de las micropartículas de CBD-PCL 15/150.

b. Difracción de rayos láser.

La figura 33 recoge las distribuciones de tamaño de partícula de todas las formulaciones de microesferas de CBD desarrolladas.

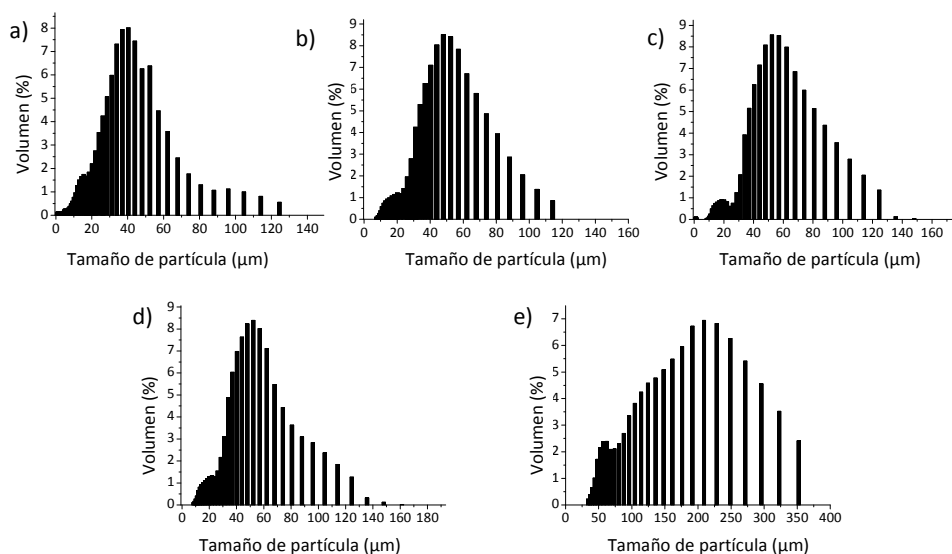


Figura 33. Distribución de tamaño de partícula en volumen de las formulaciones de microesferas de CBD-PCL (a) 5/150; (b) 10/150; (c) 15/150; (d) 30/150 y (e) 50/150.

En todos los casos, salvo en la formulación 50/150, se obtuvo una distribución unimodal, ligeramente leptocúrtica, con un hombro a valores bajos de tamaño de partícula.

Tabla 24. Parámetros relativos a la distribución de tamaños de las formulaciones de micropartículas de CBD (μm).

Formulación	Tamaño ($\text{mv} \pm \text{SD}$)	Percentil 10	Percentil 50 (mediana)	Percentil 90	Polidispersión
Placebo	36,78 \pm 16,12	15,29	35,67	59,48	1,24
5/150	37,73 \pm 17,87	13,86	35,12	62,33	1,38
10/150	38,57 \pm 16,55	14,49	35,74	58,42	1,23
15/150	54,81 \pm 22,21	28,53	51,72	92,42	1,24
30/150	51,10 \pm 21,60	23,14	47,44	84,89	1,51
50/150	163,4 \pm 85,91	60,28	158	273,8	-

Tal y como muestra la tabla 24, las formulaciones de microesferas placebo, 5/150 y 10/150 presentan una distribución de tamaños similar, con un tamaño medio de partícula de unos 37 μm , y al incrementar la relación p.a.:polímero a

15/150 y 30/150 el tamaño de partícula se incrementó considerablemente hasta unos 52 μm . En todos los casos –excepto en la formulación 50/150– se obtuvieron distribuciones de tamaño estrechas con un valor de span inferior a 2, y el percentil 90 fue inferior a 100 μm , es decir, el 90% de las partículas presentaron un tamaño inferior a 100 μm , lo que es de gran importancia para su administración por vía parenteral.

Es importante destacar, que en el caso de las micropartículas obtenidas a partir de una relación de CBD:PCL 50/150, los datos obtenidos por difracción de rayos láser son sólo orientativos debido a la aglomeración de las partículas entre sí.

2.2.2. Contenido en principio activo y eficacia de encapsulación.

En la tabla 25 se muestran, junto con los rendimientos del proceso de microencapsulación, el contenido en principio activo y eficacias de encapsulación de cada una de las formulaciones de microesferas de cannabidiol desarrolladas.

Tabla 25. Rendimiento, riqueza y eficacia de encapsulación de las formulaciones de micropartículas de cannabidiol (* $n=1$).

Formulación	Rendimiento (%) (media \pm SD; $n=10$)	mg CBD/100mg MPs (media \pm SD; $n=10$)	EE (%) (media \pm SD; $n=10$)
<i>Placebo</i>	86,18 \pm 4,04	-	-
<i>5/150</i>	89,87 \pm 0,27	3,21 \pm 0,009	102,07 \pm 8,52
<i>10/150</i>	86,13 \pm 4,99	6,07 \pm 0,34	98,01 \pm 6,46
<i>15/150</i>	84,91 \pm 3,21	8,99 \pm 0,31	99,09 \pm 5,14
<i>30/150</i>	82,84 \pm 4,29	17,08 \pm 1,61	104,41 \pm 5,20
<i>50/150*</i>	58,68	26,41	107,7

Con respecto al contenido en principio activo, en la figura 34 podemos ver como al incrementar la relación inicial principio activo:polímero, se incrementó de manera proporcional el contenido de fármaco en las microesferas. Así, con la relación inicial 15/150 se obtuvieron micropartículas con un 9% de CBD, y con las relaciones iniciales 30/150 y 50/150 la carga fue del 17% y del 26% respectivamente.

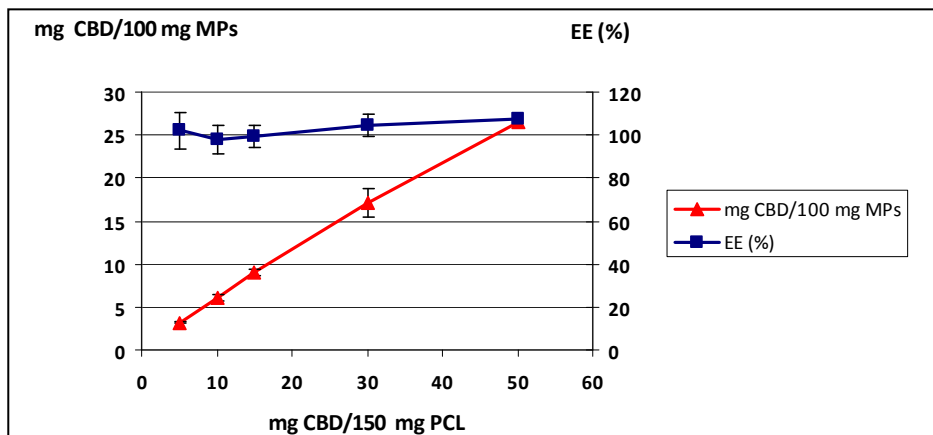


Figura 34. Evolución del contenido en cannabidiol en las microesferas y la eficacia de encapsulación al variar la relación inicial principio activo:polímero.

Las eficacias de encapsulación (EE) de las formulaciones de micropartículas de CBD preparadas utilizando diferentes ratios fármaco:polímero también aparecen recogidas en la tabla 25. No hubo diferencias en las eficacias de encapsulación del CBD al incrementar el contenido en principio activo, ya que la carga de las microesferas incrementó de manera proporcional al incremento de la relación inicial principio activo:polímero. Cabe destacar que las eficacias de encapsulación han sido en todos los casos próximas al 100% e incluso ligeramente superiores a dicho valor. Esto puede ser debido a que, como el rendimiento del proceso no es del 100%, las pérdidas sean debidas fundamentalmente al polímero, y no a pérdidas de CBD, de manera que la relación principio activo:polímero en las microesferas llega a ser mayor que la relación principio activo:polímero inicial. Además, debemos destacar que en ningún caso se detectó CBD en el sobrenadante resultante de la filtración de las microesferas -dada la naturaleza lipofílica del cannabinoide, éste tiende a permanecer atrapado en las microesferas y apenas se disolvería en la fase externa acuosa-.

2.2.3. Compatibilidad y solubilidad cannabidiol-poli- ϵ -caprolactona.

Para evaluar la compatibilidad principio activo-polímero y la solubilidad del fármaco en el polímero se comparó por calorimetría diferencial de barrido el comportamiento térmico del CBD materia prima, micropartículas placebo de poli- ϵ -caprolactona y diversas mezclas físicas CBD:PCL.

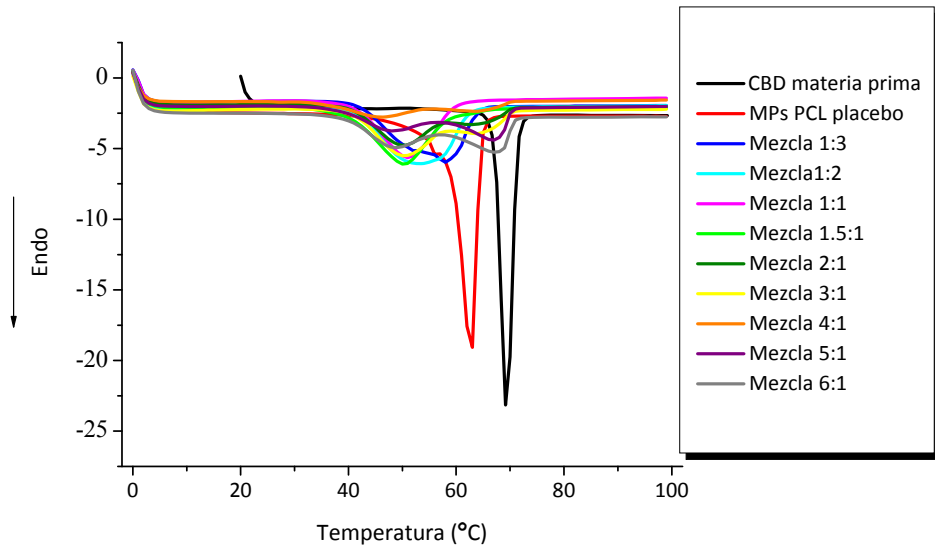


Figura 35. Termogramas correspondientes a CBD y PCL materias primas y sus mezclas físicas.

En la figura 35 se recogen los termogramas obtenidos. El termograma del CBD materia prima presenta un único pico a 68,56°C, correspondiente a su punto de fusión con una entalpía de 70,64 J/g, lo que concuerda con datos publicados previamente por otros autores (Lodzki *et al.*, 2003; Stinchcomb *et al.*, 2004). La poli- ϵ -caprolactona también presentó un único pico endotérmico, a 62°C. Los barridos de las mezclas físicas correspondieron a la suma de los termogramas individuales del polímero y el fármaco, presentando dos únicos picos endotérmicos, uno entorno a 45-60°C, correspondiente al polímero, y otro alrededor de 65-70°C correspondiente al CBD, demostrando así la compatibilidad del cannabinoide y la poli- ϵ -caprolactona.

En presencia del fármaco se produjo un descenso de la temperatura de fusión de la poli- ϵ -caprolactona y un ensanchamiento de dicho pico debido al “envenenamiento” del polímero, que se explicará posteriormente.

Como se esperaba, a medida que incrementó la proporción de CBD en las mezclas físicas, el pico correspondiente al CBD fue más pronunciado. Sin embargo, el pico de fusión del CBD no fue detectado cuando el ratio CBD:PCL fue inferior a 1,5:1.

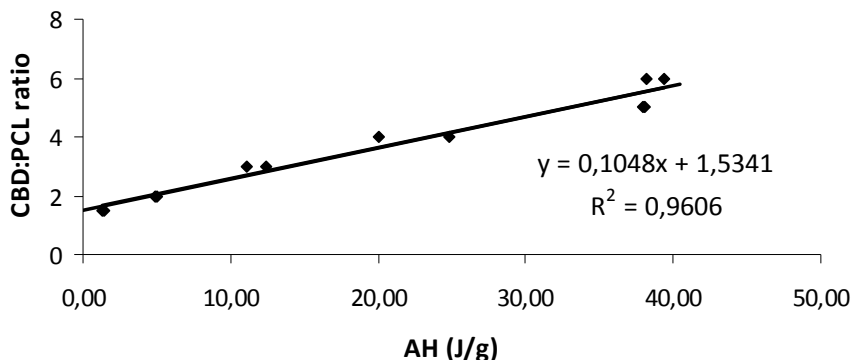


Figura 36. Estudio de solubilidad CBD:PCL por DSC. Calores de fusión de diferentes mezclas físicas CBD:MPs de PCL placebo.

La figura 36 muestra los calores de fusión de las mezclas físicas CBD:MPs PCL placebo, donde se observa una relación lineal entre la entalpía de fusión del CBD y los ratios CBD:PCL. La recta obtenida corta al eje de ordenadas (valor cero de entalpía de fusión del fármaco, es decir ausencia de cristales) en el valor 1,53 mg CBD/mg PCL; que corresponde a la solubilidad del CBD en el polímero. Por tanto, con todas las relaciones iniciales CBD:PCL empleadas para preparar las diversas formulaciones de microesferas, el CBD era soluble en el polímero.

2.2.4. Estado físico del CBD en las microesferas y efecto del CBD sobre el grado de cristalinidad de la poli-ε-caprolactona.

La figura 37 muestra los termogramas correspondientes al cannabidiol y la poli-ε-caprolactona materias primas, micropartículas de PCL placebo, y las diferentes formulaciones de micropartículas de PCL cargadas de CBD.

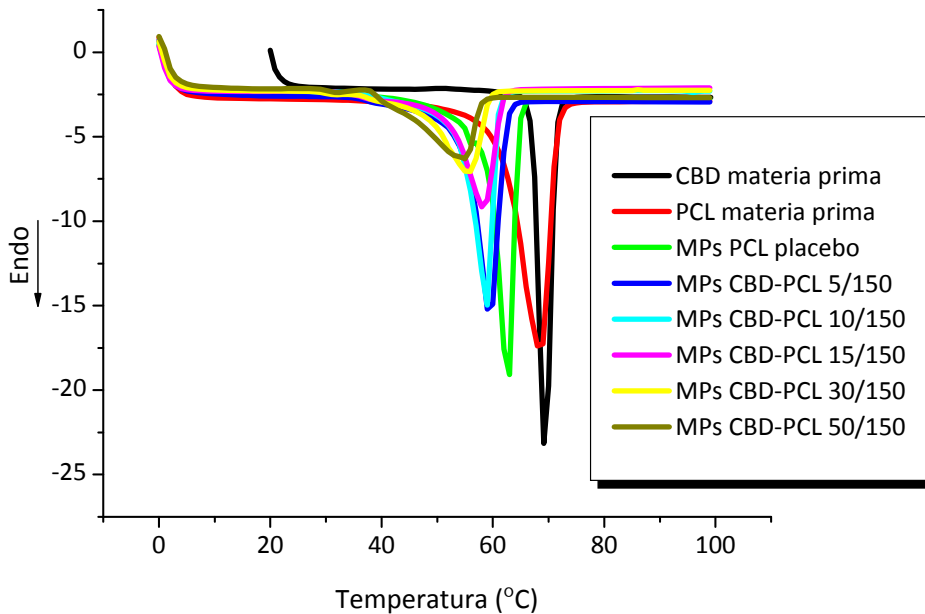


Figura 37. Termogramas del CBD y la PCL materias primas, micropartículas placebo, y las diferentes formulaciones de micropartículas de CBD-PCL.

En el termograma del CBD puro puede apreciarse a 68,5°C un pico endotérmico estrecho de gran magnitud que corresponde a su punto de fusión, con una entalpía de fusión de $\Delta H_f=70,64$ J/g (lo que está en consonancia con los resultados publicados por (Durst *et al.*, 2007; Stinchcomb *et al.*, 2004) para el CBD). Este evento térmico en la curva de DSC demuestra la naturaleza cristalina del cannabidiol. Cabe destacar, que por microscopía electrónica también se observaron cristales de CBD materia prima (figura 31a).

La Tg de la poli- ϵ -caprolactona materia prima fue de -63°C. La poli- ϵ -caprolactona materia prima, y las micropartículas placebo mostraron un pico endotérmico a 67 y 62°C (figura 37) con un calor de fusión de $102,09 \pm 2,36$ J/g y $98,84 \pm 4,17$ J/g respectivamente (tabla 26), lo que está en consonancia con los datos publicados previamente para la PCL (Durán *et al.*, 2006; Hombreiro Pérez *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2004). Por tanto, podemos concluir que la PCL mantuvo sus características semicristalinas en las microesferas preparadas mediante la técnica de emulsión O/A-evaporación, y por tanto, el proceso de microencapsulación no afectó a la cristalinidad del polímero (t-Student=-1,872 p-valor=0,090).

Considerando que el calor de fusión de la PCL 100% cristalina es de 139,5 J/g (Ali *et al.*, 1993; Pitt *et al.*, 1979b), se calculó la cristalinidad del polímero empleado en la presente tesis doctoral, siendo ésta del 73,18% (tabla 26).

En los termogramas de las microesferas de PCL cargadas de CBD, no aparece el pico correspondiente al punto de fusión del CBD, lo cual sugiere que el CBD se encuentra completamente disuelto en la matriz polimérica, en estado amorfo, y que no tiene lugar una cristalización del CBD durante la preparación de las micropartículas (Jeong *et al.*, 2003). De hecho, está descrito en la bibliografía que los cannabinoides son difíciles de cristalizar (Mechoulam, 1981). Estos resultados confirman las observaciones realizadas por microscopía electrónica (figuras 31 y 32), donde vimos la ausencia de cristales de CBD tanto en la superficie como en el interior de las microesferas.

Además, el contenido en CBD en las microesferas parece afectar al punto de fusión del polímero. En efecto, a medida que se incrementó la carga de fármaco en las microesferas, el pico de fusión del polímero se hizo más ancho y se desplazó a valores más bajos de temperatura, de 62°C a 54°C (tabla 26), lo que sugiere que existe una miscibilidad entre el CBD y la PCL. Esta disminución del punto de fusión de la PCL es especialmente importante, ya que influye en sus características físicas, pues a medida que incrementó la carga de principio activo, la agregación de las micropartículas fue mayor. Este efecto plastificante del CBD sobre la poli- ϵ -caprolactona también fue observado por microscopía electrónica (figura 31).

Este aumento de la plasticidad de la poli- ϵ -caprolactona al incrementar el contenido de CBD en las microesferas es reflejo, como cabría esperar, de un descenso en la cristalinidad del polímero (λ_m), y así queda demostrado en la figura 38 y en la tabla 27 mediante el análisis realizado sobre los datos de cristalinidad del polímero recogidos en la tabla 26.

Tabla 26. Parámetros calorimétricos de la poli- ϵ -caprolactona en las diferentes formulaciones de microesferas de cannabidiol (* ΔH_m normalizada respecto al peso de polímero).

Muestra	T_m (°C)	ΔH_m^* (J/g)	λ_m (%)
<i>PCL material prima</i>	66,95±1,24	102,09±2,36	73,18±1,69
<i>MPs PCL placebo</i>	62,28±0,38	98,84±4,17	70,85±2,99
<i>MPs CBD-PCL 5/150</i>	59,26±0,17	90,97±5,44	65,21±3,90
<i>MPs CBD-PCL 10/150</i>	59,16±0,91	88,55±10,15	63,48±7,28
<i>MPs CBD-PCL 15/150</i>	58,44±1,08	76,09±6,65	54,55±4,77
<i>MPs CBD-PCL 30/150</i>	55,79±0,70	57,32±2,75	46,24±6,90
<i>MPs CBD-PCL 50/150</i>	53,81±0,97	68,24±3,35	48,92±2,40
<i>F</i>			26,30
<i>p-valor</i>			0,00

Tabla 27. Test de Rangos Múltiples relativo a los datos de cristalinidad de la poli- ϵ -caprolactona en las diferentes formulaciones.

Muestra	Grupos homogéneos
<i>PCL material prima</i>	X
<i>MPs PCL placebo</i>	X
<i>MPs CBD-PCL 5/150</i>	X
<i>MPs CBD-PCL 10/150</i>	X
<i>MPs CBD-PCL 15/150</i>	X
<i>MPs CBD-PCL 30/150</i>	X
<i>MPs CBD-PCL 50/150</i>	XX

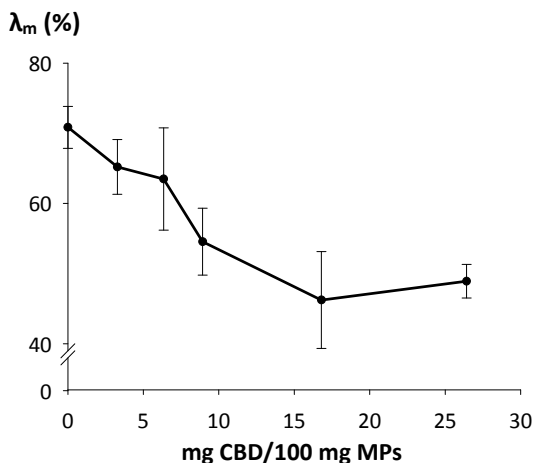


Figura 38. Evolución del grado de cristalinidad (λ_m) de la poli- ϵ -caprolactona en las microesferas al incrementar el contenido en cannabidiol.

Al comparar los valores de cristalinidad de la poli- ϵ -caprolactona en las diferentes formulaciones podemos observar que el polímero materia prima mostró una cristalinidad similar al polímero formulado en micropartículas placebo (tablas 26 y 27). Por tanto, la técnica de microencapsulación “per sé” no afectó a la cristalinidad del polímero.

No obstante, al incorporar CBD en las micropartículas se produjo un descenso estadísticamente significativo de la cristalinidad del polímero. Asimismo, al incrementar la carga de CBD de 5/150 (p.a.:polímero) a 10/150 se produjo un descenso de la cristalinidad de la PCL, aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa. Posteriormente, al aumentar la carga de CBD a 15/150 y 30/150 disminuyó aún más la cristalinidad del polímero, esta vez de forma significativa, pareciendo que la cristalinidad alcanza un valor límite, ya que al pasar de 30/150 a 50/150 no se produjo una variación significativa en la cristalinidad del polímero. Esta evolución de la cristalinidad de la PCL con el contenido en CBD de las microesferas aparece representada en la figura 38.

Por tanto, podemos concluir que al incrementar el contenido en CBD en las micropartículas, la cristalinidad de la PCL disminuye, pero tiende a estabilizarse hasta un valor de un 50% aproximadamente.

2.2.5. Ensayos de cesión *in vitro*.

En los ensayos de cesión “*in vitro*” de las formulaciones de microesferas, se calculó el porcentaje de cannabidiol disuelto en el medio de cesión a los diferentes tiempos de muestreo establecidos en el protocolo descrito anteriormente. En la tabla 28, se muestran la media y desviación estándar de estos valores para cada una de las formulaciones de microesferas.

Tabla 28. Resultados de los ensayos de cesión *in vitro* de las formulaciones de microesferas de cannabidiol desarrolladas (% cedido acumulado) $n=3$.

Tiempo (días)	Formulación de MS de CBD (% cedido acumulado, media \pm SD; $n=3$)				
	5/150	10/150	15/150	30/150	50/150
3h	5,354 \pm 0,353	3,583 \pm 0,614	3,583 \pm 0,246	7,003 \pm 0,077	ND
1	15,641 \pm 0,353	15,716 \pm 1,124	15,716 \pm 1,228	15,733 \pm 1,278	21,151 \pm 1,112
2	25,133 \pm 2,216	24,987 \pm 1,193	24,987 \pm 1,778	32,471 \pm 5,150	37,475 \pm 2,465
3	33,000 \pm 4,385	32,671 \pm 2,070	32,671 \pm 1,686	43,008 \pm 5,925	49,258 \pm 3,328
5	44,059 \pm 5,875	46,445 \pm 1,480	46,445 \pm 3,535	58,857 \pm 7,071	56,9027 \pm 4,285
7	56,434 \pm 7,523	60,288 \pm 2,646	60,288 \pm 3,227	64,560 \pm 7,315	59,276 \pm 6,077
10	66,684 \pm 8,173	68,353 \pm 3,307	68,353 \pm 3,717	74,692 \pm 7,025	66,245 \pm 6,563
13	71,657 \pm 8,837	74,424 \pm 4,068	74,424 \pm 3,606	77,125 \pm 7,718	74,427 \pm 6,732
16	71,856 \pm 8,789	74,933 \pm 3,769	74,933 \pm 3,845	79,679 \pm 6,854	81,550 \pm 6,826
20	72,300 \pm 8,341	74,893 \pm 3,778	74,893 \pm 4,053	84,554 \pm 4,709	83,750 \pm 7,027

Los perfiles de cesión del CBD a partir de cada una de las formulaciones aparecen representados en la figura 39.

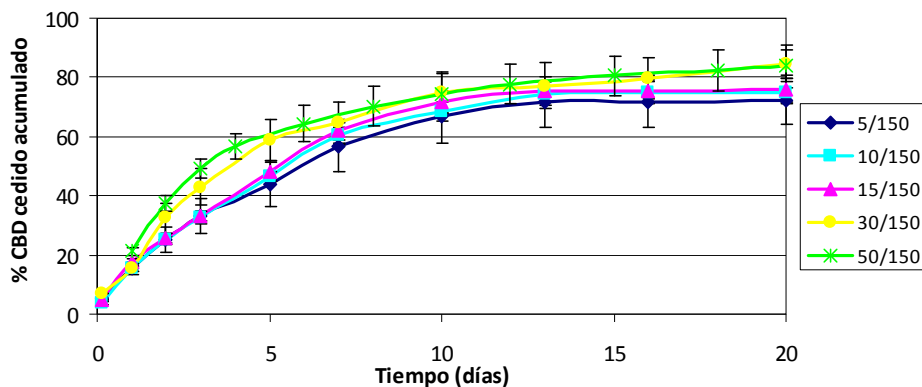


Figura 39. Perfiles de liberación *in vitro* de las formulaciones de microesferas de cannabidiol desarrolladas (% cedido acumulado) $n=3$.

En todos los casos se observó un pequeño efecto *burst* (un 3-7% del contenido en CBD cedido durante las tres primeras horas). Tal y como se puede observar en la tabla 28, no se determinó el porcentaje de CBD cedido a las 3 horas a partir de la formulación 50/150, pero a las 24 horas el fármaco cedido a partir de esta formulación fue del 21%, valor ligeramente superior al 15% obtenido a partir de las otras formulaciones. Esta mayor cesión inicial a partir de la formulación de microesferas CBD:PCL 50/150 puede ser debida al mayor contenido en CBD de la misma, encontrándose un mayor porcentaje de CBD adherido a la superficie de las micropartículas y no encapsulado en su interior, el cual se liberaría más rápidamente al no tener que difundir a través de la matriz polimérica.

Como podemos observar en la tabla 28 y en la figura 39, el porcentaje cedido acumulado experimental nunca fue del 100%, debido por una parte a que al retirar el medio de cesión a cada tiempo de muestreo, a pesar de realizarse con precaución, es posible extraer accidentalmente una pequeña fracción de micropartículas, y por otra parte, a la degradación del principio activo durante el ensayo. De hecho al finalizar los ensayos de cesión *in vitro*, se analizó por HPLC el contenido de CBD en las micropartículas remanentes, el cual en todas las formulaciones fue inferior al 1%, por lo que se descartó que el porcentaje no cedido fuera debido a cannabidiol no liberado a partir de los sistemas. Por ello, se normalizaron los datos experimentales respecto al 100% cedido, tal y como aparece reflejado en la tabla 29 y en la figura 40.

Tabla 29. Resultados normalizados de los ensayos de cesión *in vitro* de las formulaciones de microesferas de cannabidiol desarrolladas (% cedido acumulado) $n=3$.

Tiempo (días)	Formulación de MS de CBD (% cedido acumulado normalizado, media \pm SD; $n=3$)				
	5/150	10/150	15/150	30/150	50/150
3h	7,404 \pm 0,353	4,784 \pm 0,614	6,182 \pm 0,246	8,281 \pm 0,077	ND
1	21,633 \pm 0,353	20,984 \pm 1,124	23,079 \pm 1,228	18,606 \pm 1,278	25,255 \pm 1,112
2	34,762 \pm 2,216	33,362 \pm 1,193	33,898 \pm 1,778	38,403 \pm 5,150	44,747 \pm 2,465
3	45,642 \pm 4,385	43,623 \pm 2,070	43,912 \pm 1,686	50,863 \pm 5,925	58,815 \pm 3,328
5	60,939 \pm 5,875	62,014 \pm 1,480	63,878 \pm 3,535	69,608 \pm 7,071	72,943 \pm 4,285
7	78,055 \pm 7,523	80,499 \pm 2,646	82,303 \pm 3,227	76,353 \pm 7,315	79,747 \pm 6,077
10	92,232 \pm 8,173	91,267 \pm 3,307	94,578 \pm 3,717	88,336 \pm 7,025	88,868 \pm 6,563
13	99,110 \pm 8,837	99,373 \pm 4,068	99,384 \pm 3,606	91,213 \pm 7,718	93,898 \pm 6,732
16	99,385 \pm 8,789	100,053 \pm 3,769	99,674 \pm 3,845	94,234 \pm 6,854	96,779 \pm 6,826
20	100 \pm 8,341	100 \pm 3,778	100 \pm 4,053	99,999 \pm 4,709	100 \pm 7,027

Según se puede apreciar en la figura 40, existe un comportamiento de cesión parecido entre las formulaciones 5/150, 10/150 y 15/150 en las que la velocidad de cesión del CBD a partir de estos sistemas durante la primera etapa es más lenta que en el caso de las formulaciones 30/150 y 50/150. De hecho, las formulaciones 30/150 y 50/150 mostraron perfiles de liberación bifásicos, en los que se observa una primera etapa de liberación más rápida hasta el día 5-7 de ensayo, seguida de una segunda etapa a partir del día 7 en el que el CBD se libera más lentamente.

Así, a la vista de estos resultados, podemos afirmar que las formulaciones 5/150, 10/150 y 15/150 presentaron perfiles de cesión similares. La cesión inicial del cannabidiol a partir de dichas formulaciones fue más lenta que a partir de las formulaciones 30/150 y 50/150, pero al día 13 todo el fármaco encapsulado había sido cedido. En cambio, en el caso de las formulaciones 30/150 y 50/150 la cesión inicial del CBD fue más rápida –probablemente debido a la presencia de un mayor porcentaje de fármaco en la superficie de las microesferas, o próximo a la misma-, pero la cesión del fármaco se prolongó hasta el día 20.

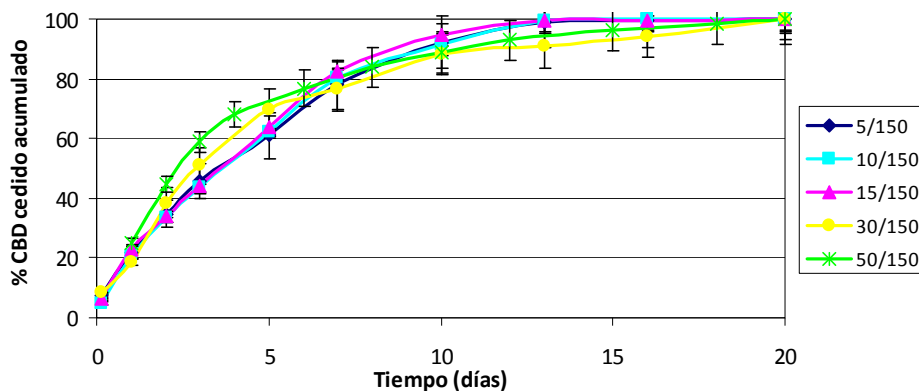


Figura 40. Perfiles de liberación *in vitro* de las formulaciones de microesferas de cannabidiol desarrolladas (% cedido acumulado) $n=3$ (valores normalizados).

A) Parámetros modelo independientes.

A continuación se muestran los parámetros modelo-independientes obtenidos a partir de los resultados de cesión *in vitro* de las diferentes formulaciones de micropartículas de cannabidiol (tabla 30).

Tabla 30. Parámetros modelo independientes correspondientes a los resultados ensayos de cesión *in vitro* de las formulaciones de microesferas de CBD desarrolladas ($n=3$)

Formulación	$t_{10\%}$	$t_{50\%}$	$t_{90\%}$	ED _{5 días} (%)	ED _{13 días} (%)
MPs CBD-PCL 5/150	6,83 h	4 días	10 días	37,63	66,89
MPs CBD-PCL 10/150	9,76 h	4 días	10 días	36,57	66,85
MPs CBD-PCL 15/150	7,74 h	4 días	10 días	37,67	68,52
MPs CBD-PCL 30/150	6,49 h	3 días	10 días	41,17	66,78
MPs CBD-PCL 50/150	ND	2,5 días	10 días	44,91	66,87

Los valores obtenidos de $t_{50\%}$ y eficacia de disolución a los 5 días ponen de manifiesto que durante los primeros días de ensayo existe una ligera diferencia en la cesión del CBD encapsulado a partir de los sistemas 5/150, 10/150 y 15/150 –en los cuales el valor de $t_{50\%}$ es de 4 días y la ED_{5 días} de un 37%- , y la liberación del CBD a partir de las formulaciones 30/150 y 50/150 –con valores de $t_{50\%}$ de 2,5-3 días y ED_{5 días} de un 41-44%- . Por tanto, estos datos confirman matemáticamente la pequeña

diferencia observada en las figuras 39 y 40. Sin embargo, a los 13 días los valores de eficacia de disolución de todas las formulaciones de micropartículas de CBD se igualan alcanzando valores del 66-67% (tabla 30).

B) Parámetros modelo dependientes.

Los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales a las diferentes cinéticas se encuentran resumidos en las tablas 31 y 32.

Tabla 31. Ajustes a las modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas de los datos de cesión *in vitro* de CBD a partir de las formulaciones de micropartículas de CBD desarrolladas ($n=3$).

Formulación	Higuchi días 0-13	Higuchi días 0-7	Higuchi días 7-13	Korsmeyer-Peppas*	Mecanismo de transporte
<i>MS 5/150</i>	$y= 30,088x-5,7658$ $r=0,9963$	$y= 30,901-6,9108$ $r=0,9949$	$y= 22,088x+20,491$ $r=0,9882$	$y=0,5657x-0,6311$ $r=0,9976$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana**
<i>MS 10/150</i>	$y=30,971x-8,0326$ $r=0,9951$	$y=32,861x-7,0451$ $r=0,9937$	$y=19,697x+28,574$ $r=0,9993$	$y=0,6976x-0,687$ $r= 0,9998$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana**
<i>MS 15/150</i>	$y=31,027x-6,7308$ $r=0,9929$	$y=32,949x-9,3094$ $r=0,9919$	$y=7,959x+35,737$ $r=0,9794$	$y=0,6162x-0,649$ $r=0,9997$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana**
<i>MS 30/150</i>	$y=27,948x-1,2098$ $r=0,9829$	$y=32,339x-6,8789$ $r=0,9882$	$y=15,694x+30,056$ $r=0,9565$	$y=0,5646x-0,5735$ $r=0,9997$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana**
<i>MS 50/150</i>	$y=26,149x+8,3932$ $r=0,9697$	$y=36,058x+7,2879$ $r=0,9832$	$y=15,887x+38,316$ $r=0,9968$	$y=0,7238x-0,6631$ $r=0,9957$	$n=0,5-1,0$ Anómalo, no fickiano

r = coeficiente de correlación.

*Cinética de Korsmeyer-Peppas considerando únicamente hasta el 60% de p.a. liberado.

**valores experimentales de n próximos a 0,5 fueron considerados correspondientes a difusión Fickiana.

Tabla 32. Ajustes a la cinética de orden uno de los datos de cesión *in vitro* de CBD a partir de las formulaciones de micropartículas de CBD desarrolladas ($n=3$).

Formulación	Orden uno días 0-13	Orden uno días 0-7	Orden uno días 7-13
<i>MS 5/150</i>	$y = -0,3309x + 4,9195$ $r = 0,9611$	$y = -0,2024x + 4,5808$ $r = 0,9940$	$y = -0,5342x + 7,0161$ $r = 0,98$
<i>MS 10/150</i>	$y = -0,3495x + 4,9799$ $r = 0,9514$	$y = -0,2218x + 4,6307$ $r = 0,99$	$y = -0,5729x + 7,2861$ $r = 0,9558$
<i>MS 15/150</i>	$y = -0,3661x + 4,9778$ $r = 0,9685$	$y = -0,2332x + 4,6315$ $r = 0,9872$	$y = -0,5597x + 6,9567$ $r = 0,9857$
<i>MS 30/150</i>	$y = -0,1905x + 4,4969$ $r = 0,9934$	$y = -0,208x + 4,5468$ $r = 0,9937$	$y = -0,165x + 4,2477$ $r = 0,9708$
<i>MS 50/150</i>	$y = -0,2036x + 4,3967$ $r = 0,9960$	$y = -0,2341x + 4,4808$ $r = 0,9884$	$y = -0,1964x + 4,3422$ $r = 0,9987$

$r =$ coeficiente de correlación.

Según podemos observar, los valores experimentales del exponente de liberación de Korsmeyer-Peppas (n) de las formulaciones 5/150, 10/150, 15/150 y 30/150 fueron próximos a 0,5, por lo que podemos asumir que el mecanismo de liberación implicado en la cesión del cannabidiol a partir de dichas formulaciones fue la difusión Fickiana. De hecho, debido a la naturaleza semicristalina de la PCL, el agua es capaz de penetrar fácilmente por la región amorfa del polímero, facilitando así la liberación del fármaco por difusión.

En el caso de la formulación 50/150, n tomó un valor de 0,72, sugiriendo que la liberación del CBD a partir de dicha formulación es controlada por un proceso de difusión anómala, el cual sólo puede ser interpretado como un proceso complejo, que no puede ser descrito como un modelo simple para predecir todas las observaciones experimentales. Es habitual que el mecanismo de cesión a partir de sistemas de liberación controlada sea muy complejo, y aunque algunos procesos pueden ser clasificados como puramente difusivos o puramente controlados por erosión, muchos otros sólo pueden ser interpretados como una combinación de ambos mecanismos (Mathew *et al.*, 2007).

En lo referente al ajuste a los diferentes modelos cinéticos, todos los datos experimentales obtenidos en los ensayos de cesión *in vitro* a partir de las micropartículas de CBD-PCL 5/150, 10/150 y 15/150 se ajustaron bien ($r > 0,99$) a la cinética de Higuchi.

De acuerdo a este modelo, la figura 41 muestra el porcentaje cedido acumulado de CBD a partir de las microesferas de poli- ϵ -caprolactona a partir de las formulaciones con distinto contenido en principio activo frente a la raíz cuadrada del tiempo (días^{1/2}). En ella podemos apreciar el buen ajuste de las formulaciones 5/150, 10/150 y 15/150 a dicho modelo.

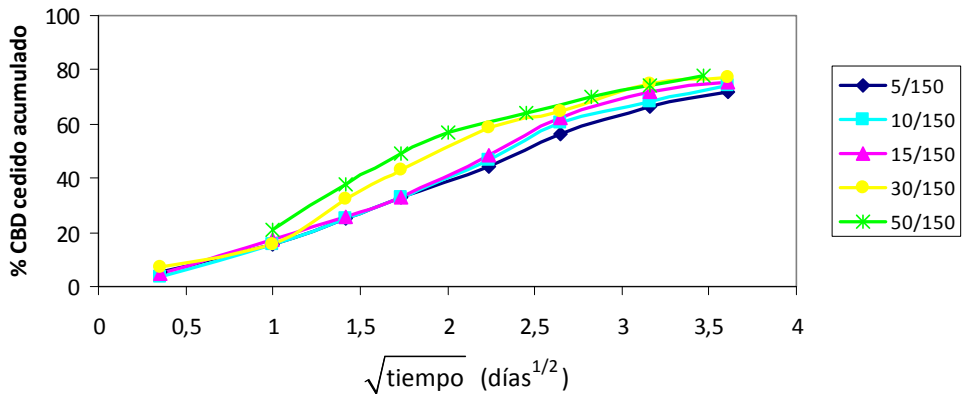


Figura 41. Ajuste cinético al modelo de Higuchi (hasta día 13 de ensayo) de los resultados de cesión de CBD de las microesferas elaboradas con distinto contenido en p.a.

Sin embargo, en el caso de las formulaciones 30/150 y 50/150 los resultados experimentales se ajustaron mejor a la cinética de orden uno con valores de coeficiente de correlación (r) de 0,99.

Evaluación morfológica de las micropartículas tras los ensayos de cesión.

Al finalizar el ensayo de cesión se tomaron fotografías al microscopio electrónico de las microesferas remanentes para evaluar el grado de degradación del polímero, éstas aparecen recogidas en la figura 42.

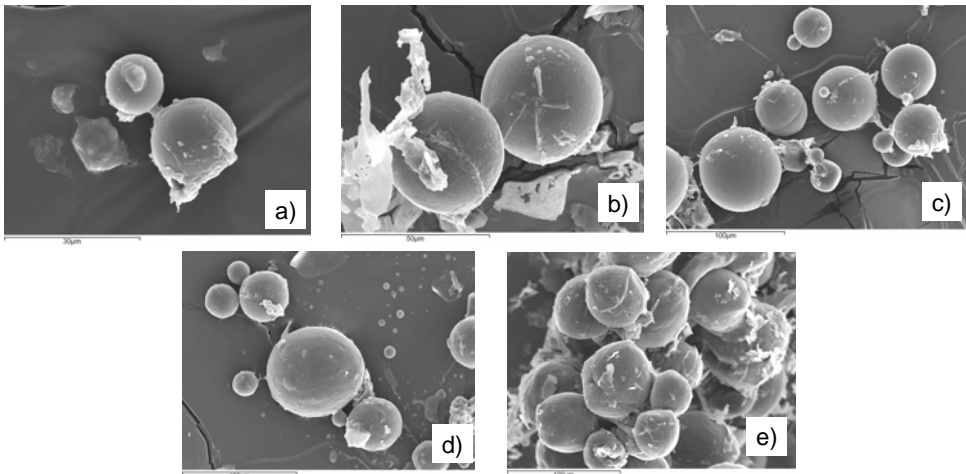


Figura 42. Fotografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido (SEM) de las microesferas de cannabidiol al finalizar los estudios de cesión (a) 5/150; (b) 10/150; (c) 15/150; (d) 30/150 y (e) 50/150.

Tal y como podemos observar, durante los ensayos de cesión *in vitro* aparecieron ligeras modificaciones en la superficie de las micropartículas (figura 42), pero las micropartículas no se rompieron, ni perdieron su morfología esférica, no existiendo por tanto una bioerosión apreciable de la poli- ϵ -caprolactona durante el tiempo que duró el ensayo. Por tanto, se descartó la erosión como mecanismo de liberación del fármaco encapsulado, y la liberación del cannabidiol se atribuyó a la difusión del cannabinoide a través de la matriz polimérica. Además, los resultados obtenidos al ajustar los valores experimentales de cesión *in vitro* a la cinética de Korsmeyer-Peppas parecen corroborar esto ya que el valor del exponente n obtenido fue próximo a 0,5, siendo por tanto un mecanismo de difusión Fickiana el que gobierna el proceso de liberación del cannabidiol a partir de las formulaciones de CBD 5/150, 10/150, 15/150 y 30/150 desarrolladas.

Según la bibliografía, aunque la PCL es un polímero biodegradable, su biodegradación es considerablemente más lenta que la de otros polímeros biodegradables. Por ello la difusión a través de las regiones amorfas de la matriz polimérica, y no la erosión del polímero, es el principal mecanismo responsable de la liberación de fármaco (Jeong *et al.*, 2003).

2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS DE Δ^9 -TETRAHIDROCANNABINOL.

El THC materia prima en contacto con aire, sufrió un cambio de color pasando rápidamente de amarillo a morado y a continuación a marrón. Estos cambios de color son indicativos de su degradación (Mechoulam, 1970; van Drooge *et al.*, 2004), por lo que durante su manipulación se evitó en la medida de lo posible su contacto con el aire, y la elaboración de las microesferas se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno.

El proceso de encapsulación se desarrolló con normalidad en todos los casos, aunque al emplear la proporción THC-PCL 50:150 la filtración fue muy lenta, formándose una torta muy difícil de despegar del filtro.

En la figura 43 se muestra, a modo de ejemplo, una fotografía al microscopio óptico de las micropartículas elaboradas a partir de una relación THC:PCL 15:150 y 5% de vitamina E acetato. Tal y como podemos observar, las micropartículas obtenidas fueron esféricas, de superficie lisa, no apareciendo agregados.

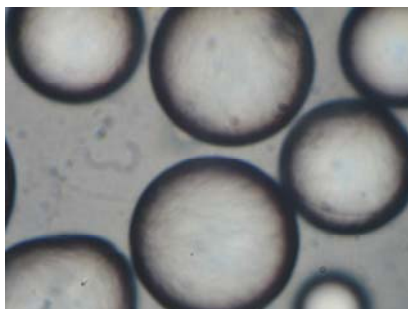


Figura 43. Fotografía al microscopio óptico de microesferas elaboradas a partir de 15 mg THC/150 mg PCL 5% vitamina E acetato durante la etapa de evaporación del solvente orgánico.

El proceso de microencapsulación fue reproducible, con un rendimiento del 70-90% (tabla 34) -similar al obtenido con el CBD-, no afectando la adición del antioxidante al rendimiento del proceso (t-Student $p=0,423$ para las microesferas THC-PCL 15/150-5% Vit E *versus* 15/150, y $p=0,633$ para las microesferas THC-PCL 30/150-5% Vit E *versus* 30/150).

Cuando se empleó una relación p.a.:polímero de 50/150 el rendimiento del proceso fue inferior al obtenido con las otras proporciones, e incluso inferior al obtenido con el CBD a esa misma proporción (tabla 34), debido a que con esta

relación fármaco:polímero se formó una torta de microesferas difícil de despegar del filtro. Esto puede ser debido a la naturaleza del THC, ya que el Δ^9 -THC materia prima es una resina pegajosa, viscosa (Flora *et al.*, 1981; Repka *et al.*, 2006), y al incrementar su relación con respecto al polímero aumenta su proporción en la superficie de las microesferas originando la aglomeración de las mismas, y su adhesión a la membrana de filtración. Así cuando se trabajó con proporciones 30/150 y 50/150 el rendimiento del proceso fue inferior al obtenido con el CBD.

2.3.1. Tamaño, forma y estado de agregación.

a. Microscopio electrónico (SEM).

La figura 44 muestra las características morfológicas de las formulaciones de microesferas de THC desarrolladas. Las fotografías revelan que en todos los casos se obtuvieron micropartículas esféricas, bien formadas, con una superficie no porosa, no detectándose diferencias morfológicas entre las microesferas liofilizadas y sin liofilizar (figura 44 *b* y *c*).

Tampoco se observaron diferencias entre las formulaciones obtenidas a partir de relaciones THC-PCL 15/150 y 30/150, con o sin la adición de antioxidante. Sin embargo, al emplearse a una proporción de THC-PCL 50/150 se obtuvieron micropartículas muy aglomeradas (figura 44 *i-j*), limitando el proceso de microencapsulación.

Las propiedades adhesivas del THC (Repka *et al.*, 2006) podrían justificar la mayor tendencia de las micropartículas de THC de aglomerarse en comparación con las micropartículas de CBD.

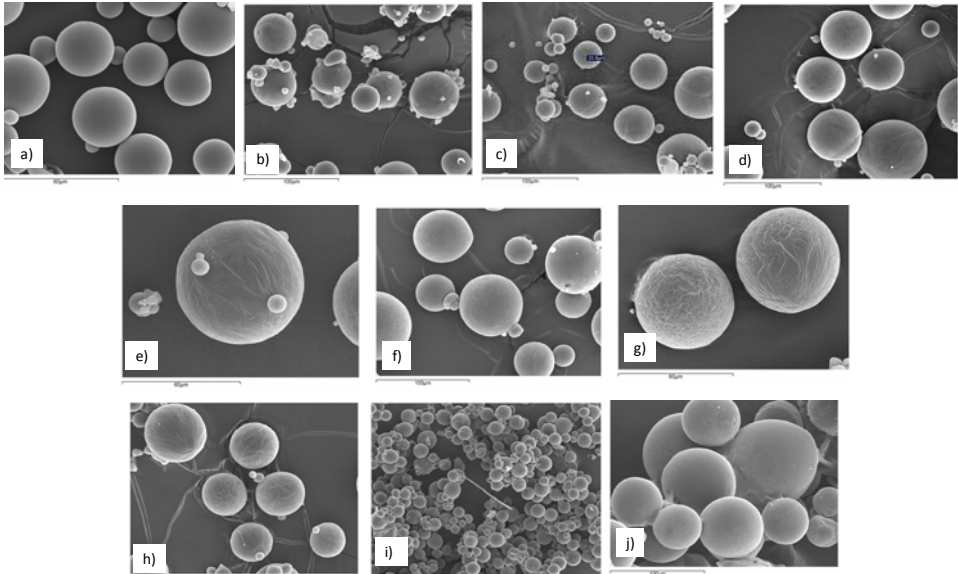


Figura 44. Fotografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido (SEM) de micropartículas placebo (a); microsferas de THC: 15/150 sin liofilizar (b) y liofilizadas (c), 15/150-0,05% vit E (d), 15/150-5% vit E (e), 30/150 (f), 30/150-0,05% vit E (g), 30/150-5% vit E (h), 50/150 (i, j).

b. Difracción de rayos láser.

Como podemos apreciar en la figura 45, en todos los casos, salvo en la formulación 50/150, la distribución de tamaños se ajustó a una distribución unimodal. Debemos destacar, que tal y como se ha demostrado por microscopía electrónica (figura 44g), al emplear la relación THC-PCL 50/150 se obtuvieron micropartículas agregadas, por lo que la medida de su tamaño por difracción de rayos láser no es correcta, pues se mediría el tamaño de los agregados y no de las partículas aisladas, por lo que la figura 45g es sólo orientativa, y no debe interpretarse como un dato real.

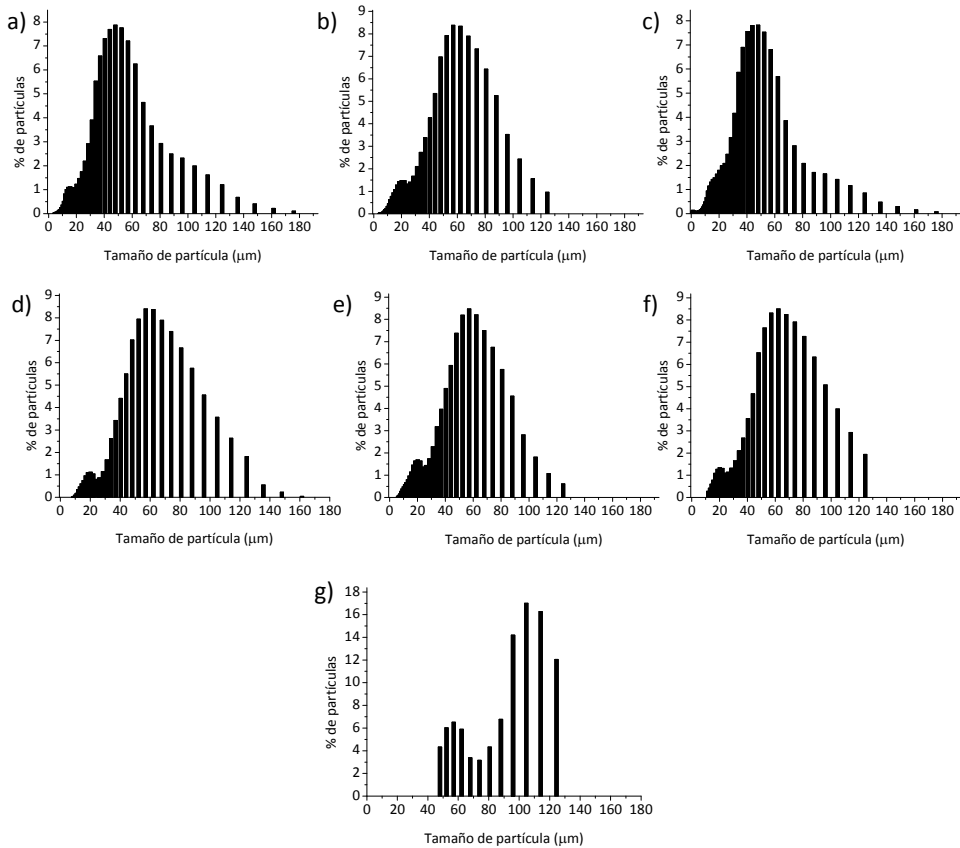


Figura 45. Distribuciones de tamaño de partícula de las formulaciones de MPs THC-PCL
 (a) 15/150, (b) 15/150-0,05% vit E, (c) 15/150-5% vit E;
 (d) 30/150, (e) 30/150-0,05% vit E, (f) 30/150-5% vit E (g) 50/150.

En la tabla 33 aparecen recogidos los datos relativos al tamaño de partícula de cada una de las formulaciones de micropartículas de THC. Aunque se observa una ligera tendencia a aumentar el tamaño medio de partícula al incrementar la proporción inicial de THC, debemos destacar que con las dos proporciones p.a.:polímero, 15/150 y 30/150, se obtuvieron partículas de un tamaño adecuado para su posterior administración por vía parenteral. Asimismo, según queda reflejado en dicha tabla, la adición de vitamina E acetato no modificó el tamaño de partícula.

Tabla 33. Parámetros relativos a la distribución de tamaños de las formulaciones de micropartículas de Δ^9 -THC (μm).

Formulación	Tamaño ($\text{mv}\pm\text{SD}$)	Percentil 10	Percentil 50 (mediana)	Percentil 90	Polidispersión
<i>Placebo</i>	36,78	15,29	35,67	59,48	1,24
<i>15/150</i>	49,18 \pm 21,54	21,10	44,68	83,62	1,40
<i>15/150-0,05% vit E</i>	54,34 \pm 24,29	21,03	53,50	85,69	1,21
<i>15/150-5% vit E</i>	44,64 \pm 20,30	16,83	41,37	73,79	1,38
<i>30/150</i>	59,46 \pm 24,28	29,30	56,75	93,78	1,14
<i>30/150-0,05% vit E</i>	51,77 \pm 23,48	19,72	51,03	81,87	1,22
<i>30/150-5% vit E</i>	60,11 \pm 24,84	27,37	58,36	94,03	1,14
<i>50/150</i>	87,88 \pm 27,63	52,08	93,45	115,7	-

2.3.2. Contenido en principio activo y eficacia de encapsulación.

En la tabla 34 se muestran el contenido en THC y la eficacia de encapsulación de las formulaciones de microesferas de THC desarrolladas, los cuales también aparecen gráficamente representados en la figura 46.

Tabla 34. Rendimiento, riqueza y eficacia de encapsulación de las formulaciones de micropartículas de tetrahidrocannabinol (* $n=1$; ** $n=3$).

Formulación	Rendimiento (%) (media \pm SD; $n=10$)	mg THC/100mg MPs (media \pm SD; $n=10$)	EE (%) (media \pm SD; $n=10$)
<i>Placebo</i>	86,18 \pm 4,04	-	-
<i>15/150</i>	87,34 \pm 7,29	9,52 \pm 0,45	103,78 \pm 5,50
<i>15/150-0,05% vit E*</i>	75,24	9,084	108,4
<i>15/150-5% vit E</i>	81,48 \pm 6,20	8,32 \pm 1,90	84,55 \pm 13,6
<i>30/150</i>	70,57 \pm 4,03	18,43 \pm 3,94	128,32 \pm 11,88
<i>30/150-0,05% vit E*</i>	69,04	15,93	113,39
<i>30/150-5% vit E</i>	72,34 \pm 2,78	17,82 \pm 3,92	119,88 \pm 12,92
<i>50/150**</i>	37,42 \pm 2,21	32,69 \pm 2,4	97,83 \pm 6,21

Cabe destacar, que al incrementar la relación THC:PCL inicial, la carga de las micropartículas se incrementó de manera proporcional, lo que hizo que no se modificaran apenas los valores de eficacia de encapsulación, que fueron próximos al 100%, tal y como queda reflejado en la figura 46. Además, no se detectó THC por HPLC en el agua de lavado obtenido al filtrar las microesferas, confirmando de manera indirecta estos elevados valores de eficacia de encapsulación.

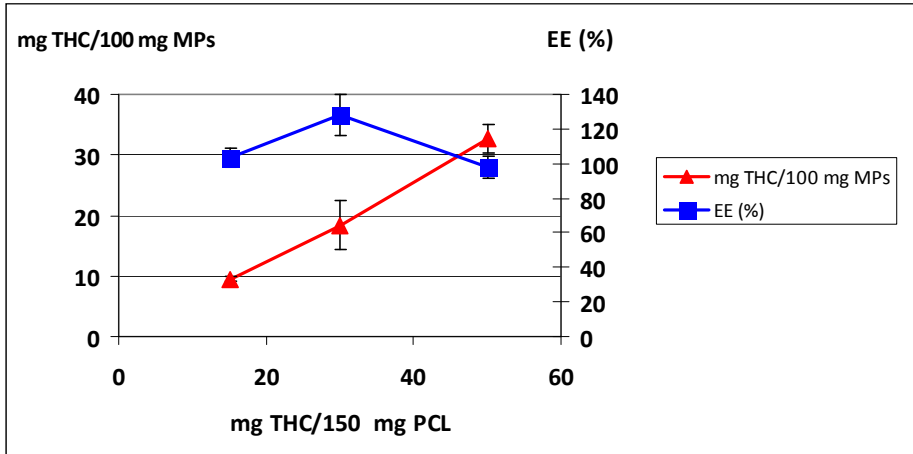


Figura 46. Evolución del contenido en THC en las microesferas elaboradas sin antioxidante y la eficacia de encapsulación al variar la relación inicial principio activo:polímero.

Además, tal y como podemos observar en la tabla 35, la adición de antioxidante al 5% no afectó significativamente a la carga de las microesferas (p -valor > 0,05).

Tabla 35. Análisis estadístico de la influencia de la adición de antioxidante al 5% sobre la carga de las micropartículas.

Formulación	mg THC/100mg MPs (media±SD; n=10)	t-Student
15/150	9,52±0,45	t = -0,822
15/150-5% vit E	8,32±1,90	(p-valor = 0,426)
30/150	18,43±3,94	t = 0,938
30/150-5% vit E	17,82±3,92	(p-valor= 0,366)

2.3.3. Estado físico del THC en las microesferas y efecto del THC sobre el grado de cristalinidad de la poli- ϵ -caprolactona.

A diferencia del cannabidiol, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol se presenta como una resina amorfa difícil de pesar y manipular, lo que nos impidió fabricar mezclas físicas THC:PCL para la evaluación de la solubilidad de este principio activo en el polímero. No obstante sí se llevaron a cabo análisis de calorimetría diferencial de barrido sobre el principio activo materia prima, la poli- ϵ -caprolactona materia prima, microesferas placebo y las diferentes formulaciones de micropartículas de Δ^9 -THC desarrolladas.

El Δ^9 -THC materia prima mostró una temperatura de transición vítrea (T_g) de 9,59°C (figura 47), lo que está en consonancia con datos publicados por otros autores (van Drooge *et al.*, 2005).

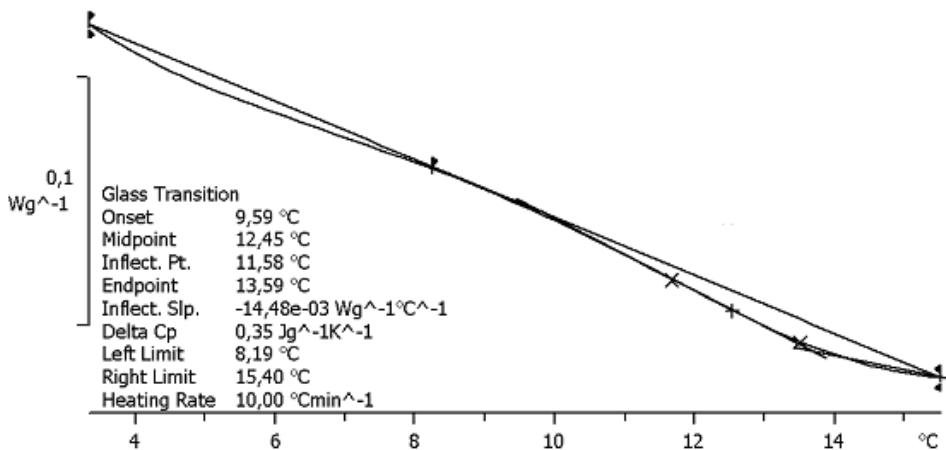


Figura 47. Temperatura de transición vítrea del Δ^9 -tetrahidrocannabinol.

La figura 48 muestra los termogramas correspondientes a la poli- ϵ -caprolactona materia prima (1), las micropartículas de PCL placebo (2), y las formulaciones de micropartículas de THC-PCL 15/150, 30/150 y 50/150 (3-5).

Como era de esperar, dada su naturaleza amorfa y su resistencia a la cristalización (Gaoni *et al.*, 1964; van Drooge *et al.*, 2005) el Δ^9 -THC se presenta en las microesferas en estado amorfo, no apareciendo ningún pico de fusión correspondiente al Δ^9 -THC en los termogramas de las microesferas (figuras 48-50).

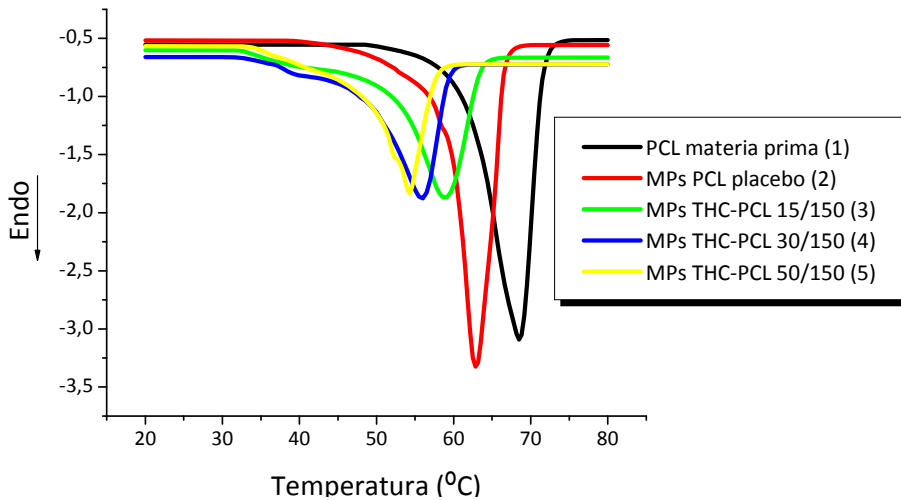


Figura 48. Termogramas de la PCL materia prima (1), micropartículas placebo (2), y las micropartículas de THC-PCL sin vitamina E (3-5).

Además, se observa que, tal como ocurría con las micropartículas de CBD, la inclusión de Δ^9 -THC en los sistemas parece afectar al punto de fusión de la poli- ϵ -caprolactona, pues, a medida que se incrementó la carga de fármaco en las microesferas, se produjo un descenso de la temperatura de fusión del polímero de 62 a 54°C (tabla 36), y el pico de fusión del polímero se hizo más ancho (figura 48), sugiriendo que existe miscibilidad entre el Δ^9 -THC y la PCL.

Este desplazamiento del pico de fusión del polímero hacia valores más bajos de temperatura y su ensanchamiento es especialmente importante, ya que parece influenciar sus características físicas, pues a medida que incrementó la carga de principio activo, la agregación de las micropartículas fue mayor. Este efecto plastificante del Δ^9 -THC sobre la PCL también se observó por microscopía electrónica (figura 44).

Otros autores han observado un efecto similar al combinar Δ^9 -THC e hidroxipropil celulosa (HPC) y han atribuido este efecto plastificante a la naturaleza viscosa del Δ^9 -THC, a su relativo bajo peso molecular (314,46 g/mol) y a la flexibilidad de la molécula considerando que pueden incrementar la movilidad de las cadenas de polímero (Repka *et al.*, 2006). Estas propiedades de la molécula, junto con las propiedades adhesivas del Δ^9 -THC podrían ser, por lo tanto, las responsables de esta aglomeración de las micropartículas cuando se emplean proporciones p.a.:polímero elevadas.

El aumento de la plasticidad de la poli- ϵ -caprolactona al adicionar Δ^9 -THC en las microesferas es reflejo, como cabría esperar, de un descenso en la cristalinidad del polímero (λ_m), y así queda demostrado en la tabla 36.

En las figuras 49 y 50 se comparan los termogramas de las formulaciones de microesferas de THC-PCL 15/150 y 30/150 sin antioxidante y con vitamina E acetato (0,05% y 5%).

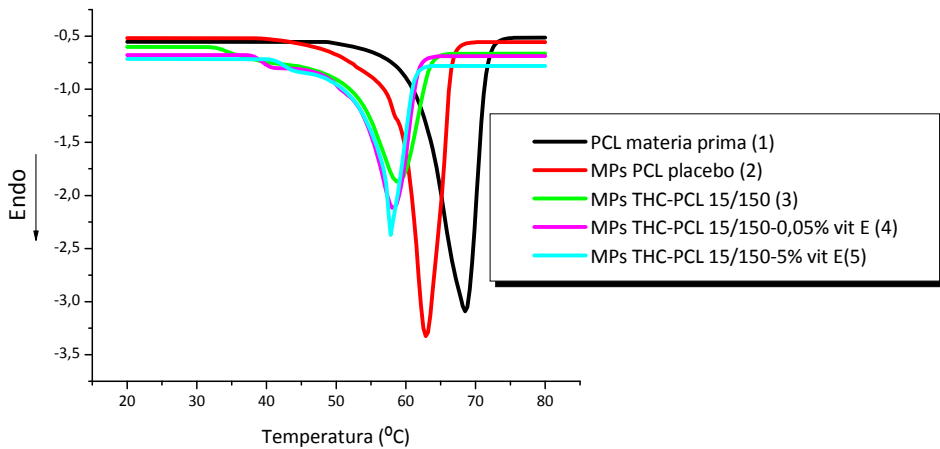


Figura 49. Termogramas de la PCL materia prima (1), micropartículas placebo (2), y las formulaciones de micropartículas de THC-PCL 15/150 (3-5).

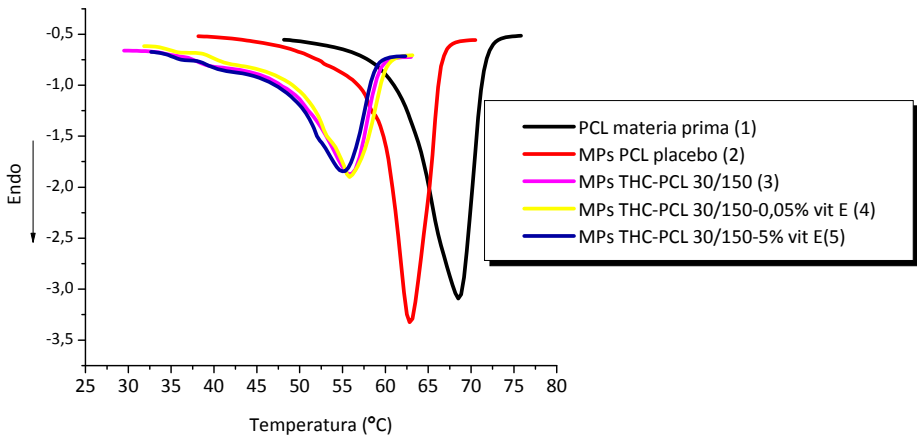


Figura 50. Termogramas de la PCL materia prima (1), micropartículas placebo (2), y las formulaciones de micropartículas de THC-PCL 30/150 (3-5).

No se observaron diferencias en los termogramas obtenidos a partir de las formulaciones preparadas con o sin antioxidante (figuras 49 y 50), por lo que

podemos afirmar que la adición del antioxidante sobre las formulaciones de microesferas de THC-PCL no tuvo ningún efecto sobre las características térmicas del polímero.

En la tabla 36 se recogen los parámetros térmicos que permiten calcular el grado de cristalinidad del polímero en cada una de las formulaciones desarrolladas. Como ya se observaba en las gráficas 48-50, se produce un descenso de la cristalinidad de la poli- ϵ -caprolactona al encapsular Δ^9 -THC en las microesferas.

Tabla 36. Parámetros calorimétricos de la poli- ϵ -caprolactona en las diferentes formulaciones de microesferas de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (* ΔH_m normalizada respecto al peso de polímero).

Muestra	T _m (°C)	ΔH_m^* (J/g)	λ_m (%)
<i>PCL materia prima</i>	66,95±1,24	102,09±2,36	73,69±2,56
<i>MPs placebo</i>	62,28±0,38	98,84±4,17	70,85±2,99
<i>MPs THC-PCL 15/150</i>	58,44	77,62	52,65
<i>MPs THC-PCL 15/150-0,05% vit E</i>	57,82	70,84	50,78
<i>MPs THC-PCL 15/150-5% vit E</i>	57,44	59,25	50,23
<i>MPs THC-PCL 30/150</i>	55,70	71,99	52,61
<i>MPs THC-PCL 30/150-0,05% vit E</i>	55,48	73,78	52,90
<i>MPs THC-PCL 30/150-5% vit E</i>	54,80	73,48	52,68
<i>MPs THC-PCL 50/150</i>	54,01	68,05	48,78

2.3.4. Ensayos de cesión *in vitro*.

En la tabla 37, se muestran la media y desviación estándar de los porcentajes de THC cedidos acumulados a distintos tiempos a partir las formulaciones de micropartículas de THC-PCL 15/150, 30/150 y 50/150.

Tabla 37. Resultados de los ensayos de cesión *in vitro* de las formulaciones de microesferas de Δ^9 -tetrahidrocannabinol desarrolladas (% cedido acumulado) $n=3$.

Tiempo (días)	Formulación de MS de Δ^9 -THC (% cedido acumulado, media \pm SD; $n=3$)		
	15/150	30/150	50/150
0,125	13,93 \pm 0,46	13,44 \pm 0,70	10,63 \pm 0,87
1	32,42 \pm 2,38	32,35 \pm 0,69	30,76 \pm 1,31
2	48,72 \pm 1,28	50,94 \pm 1,72	47,89 \pm 3,42
3	61,66 \pm 1,43	62,76 \pm 1,50	61,30 \pm 3,16
5	69,84 \pm 1,32	72,23 \pm 1,41	71,82 \pm 3,74
7	76,78 \pm 1,53	79,29 \pm 1,58	80,46 \pm 4,00
10	82,04 \pm 2,02	84,55 \pm 1,77	88,04 \pm 3,41
13	86,54 \pm 2,20	88,01 \pm 1,75	94,55 \pm 3,98
16	90,11 \pm 2,38	90,51 \pm 1,76	98,30 \pm 3,35

Los perfiles de cesión del THC a partir de estas formulaciones de micropartículas aparecen recogidos en la figura 51.

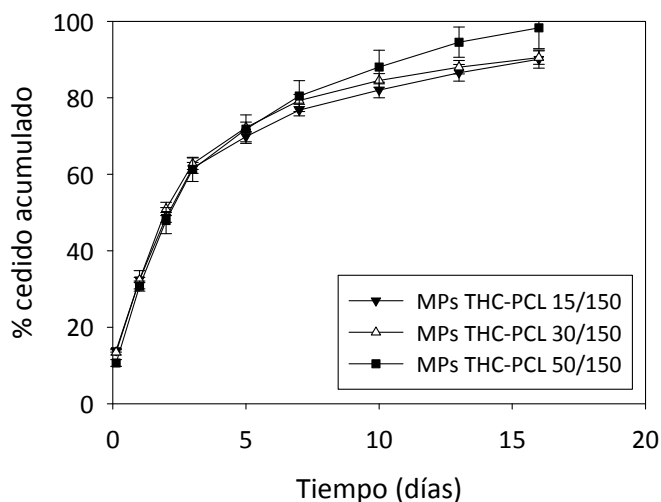


Figura 51. Perfiles de cesión *in vitro* de las formulaciones de microesferas de THC-PCL 15/150, 30/150 y 50/150.

Al finalizar el ensayo de cesión se valoró la cantidad de Δ^9 -THC remanente en los viales. Esta cantidad fue de $2,78 \pm 0,09 \mu\text{g}$ (un 0,19% del contenido inicial) en el caso de la formulación 15/150 y $4,49 \pm 0,12 \mu\text{g}$ (un 0,16% del contenido inicial) en la formulación 30/150. Debido a que el contenido remanente de Δ^9 -THC en las micropartículas fue inferior al 1%, se descartó que el porcentaje no cedido fuera debido a la presencia de Δ^9 -THC remanente en los sistemas al final del ensayo, atribuyéndose entonces al error experimental (retirada de micropartículas al tomar las muestras de medio de cesión a lo largo del ensayo y/o adherencia del Δ^9 -THC al material empleado). Por ello, se realizó una normalización de los valores experimentales obtenidos respecto a la cantidad total de fármaco cedido, tal y como aparece reflejado en la tabla 38.

Tabla 38. Resultados normalizados de los ensayos de cesión *in vitro* de las formulaciones de microesferas de Δ^9 -tetrahidrocannabinol desarrolladas (% cedido acumulado) $n=3$.

Tiempo (días)	Formulación de MS de Δ^9 -THC (% cedido acumulado, media \pm SD; $n=3$)		
	15/150 corregido	30/150 corregido	50/150
0,125	15,47 \pm 0,82	14,87 \pm 0,68	10,63 \pm 0,87
1	35,42 \pm 2,48	35,78 \pm 0,64	30,76 \pm 1,31
2	53,24 \pm 1,19	56,28 \pm 1,08	47,89 \pm 3,42
3	67,32 \pm 0,51	69,36 \pm 0,78	61,30 \pm 3,16
5	76,28 \pm 0,36	79,81 \pm 0,32	71,82 \pm 3,74
7	83,89 \pm 1,04	87,60 \pm 0,12	80,46 \pm 4,00
10	89,65 \pm 1,73	93,40 \pm 0,19	88,04 \pm 3,41
13	94,58 \pm 2,02	97,23 \pm 0,06	94,55 \pm 3,98
16	98,49 \pm 2,30	100,00 \pm 0,01	98,30 \pm 3,35

Los perfiles de cesión normalizados aparecen representados en la figura 52. En ella podemos apreciar como prácticamente existe superposición entre los perfiles de liberación del Δ^9 -THC a partir de las formulaciones de micropartículas 15/150, 30/150 y 50/150.

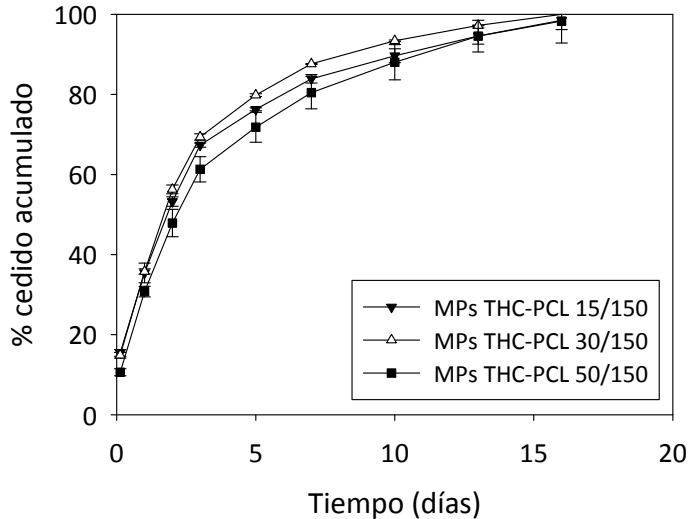


Figura 52. Perfiles de cesión *in vitro* corregidos de las formulaciones de microesferas de THC-PCL 15/150, 30/150 y 50/150.

En efecto, se obtuvieron perfiles de cesión similares a partir de las formulaciones de micropartículas de Δ^9 -THC elaboradas con distinta relación p.a.:polímero sin la adición de antioxidante. Estos perfiles mostraron un pequeño efecto *burst* (un 13% del contenido en Δ^9 -THC es cedido a las 3 horas) seguido de un perfil bifásico, caracterizado por una fase de liberación más rápida (días 0-5) seguida de una etapa donde la velocidad de cesión del Δ^9 -THC encapsulado fue menor.

Efecto de la incorporación del antioxidante sobre los perfiles de liberación del Δ^9 -THC.

También se estudió la influencia de la presencia de antioxidante, y la concentración de éste, en la cesión del Δ^9 -THC a partir de las microesferas.

En la tabla 39, se muestran la media y desviación estándar de los porcentajes de THC cedidos acumulados a distintos tiempos a partir las formulaciones de micropartículas de THC-PCL 15/150 y THC-PCL 30/150 elaboradas con o sin antioxidante (vitamina E acetato al 0,05 y 5%). Estos resultados aparecen representados gráficamente en las figuras 53 y 54, respectivamente.

Tabla 39. Resultados de los ensayos de cesión *in vitro* de las formulaciones de microesferas de Δ^9 -THC 15/150 y 30/150 elaboradas con o sin antioxidante. (% cedido acumulado) $n=3$.

Tiempo (días)	Formulación de MS de Δ^9 -THC 15/150 (% cedido acumulado, media \pm SD)			Formulación de MS de Δ^9 -THC 30/150 (% cedido acumulado, media \pm SD)		
	15/150 sin vit E	15/150 0,05% vit E	15/150 5% vit E	30/150 sin vit E	30/150 0,05% vit E	30/150 5% vit E
0,125	14,87 \pm 0,68	10,45 \pm 2,89	12,27 \pm 0,35	14,87 \pm 0,68	14,97 \pm 0,49	15,83 \pm 0,58
1	35,78 \pm 0,64	25,73 \pm 1,28	37,55 \pm 3,03	35,78 \pm 0,64	28,39 \pm 0,15	38,59 \pm 1,80
2	56,28 \pm 1,08	34,41 \pm 0,33	55,61 \pm 0,65	56,28 \pm 1,08	41,15 \pm 0,58	59,86 \pm 1,26
3	69,36 \pm 0,78	41,98 \pm 0,33	69,36 \pm 0,83	69,36 \pm 0,78	49,48 \pm 0,51	72,86 \pm 1,35
5	79,81 \pm 0,32	47,19 \pm 1,52	79,78 \pm 0,73	79,81 \pm 0,32	56,62 \pm 0,93	84,93 \pm 0,39
7	87,60 \pm 0,12	51,35 \pm 1,25	86,45 \pm 0,35	87,60 \pm 0,12	60,23 \pm 0,84	93,45 \pm 0,53
10	93,40 \pm 0,19	55,37 \pm 1,50	94,67 \pm 1,06	93,40 \pm 0,19	64,52 \pm 1,03	100,09 \pm 0,98
13	97,23 \pm 0,06	57,74 \pm 1,42	98,28 \pm 0,74	97,23 \pm 0,06	66,77 \pm 1,19	100,00 \pm 1,03
16	100,00 \pm 0,01	-	-	100,00 \pm 0,01	-	-
18	-	59,22 \pm 1,22	100,00 \pm 0,79	-	67,96 \pm 1,38	100,00 \pm 1,20

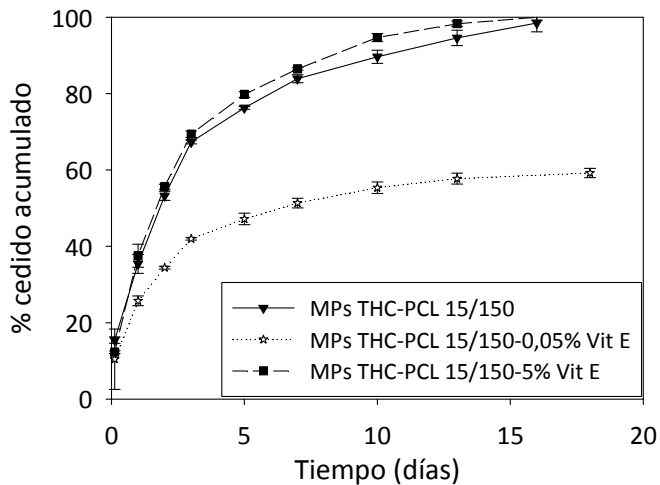


Figura 53. Perfiles de liberación *in vitro* del THC a partir de las formulaciones de microesferas de THC-PCL 15/150, con y sin vitamina E.

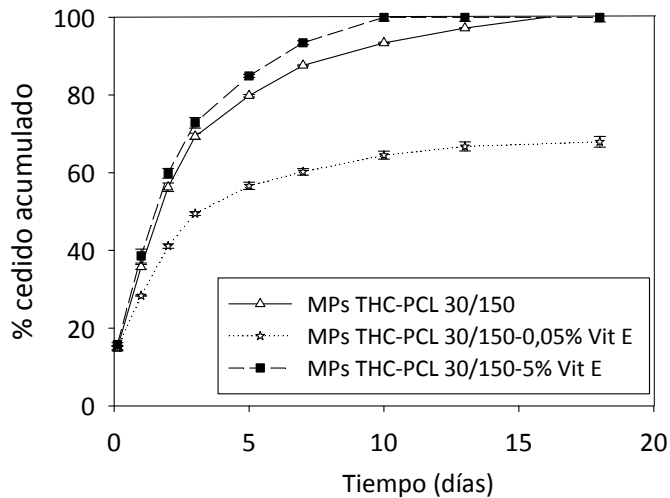


Figura 54. Perfiles de liberación *in vitro* del THC a partir de las formulaciones de microesferas de THC-PCL 30/150, con y sin vitamina E.

Como se puede apreciar, la adición de antioxidante en baja proporción (0,05%) modificó los perfiles de cesión del Δ^9 -THC encapsulado a partir de los sistemas 15/150 y 30/150, originando una liberación del p.a. más lenta. Sin embargo, la adición de vitamina E acetato al 5% no tuvo una influencia significativa sobre el perfil de cesión del THC a partir de los sistemas 15/150 y 30/150.

Al finalizar los ensayos de cesión se valoró por HPLC el contenido remanente de THC en las micropartículas. En el caso de las formulaciones elaboradas con un 0,05% de antioxidante el porcentaje de fármaco remanente fue de un 30-35% del fármaco encapsulado. Sin embargo, en las microesferas preparadas con vitamina E acetato al 5% fue de un 0,14-0,33%, lo que se consideró despreciable. Estos resultados confirman las diferencias observadas en los ensayos de cesión *in vitro*.

Además, la adición del antioxidante a concentración del 5% fue capaz de evitar la oxidación del THC, ya que las microesferas preparadas con esta concentración de antioxidante no variaron de color con el tiempo, lo cual es indicativo de la estabilización del THC en las microesferas (van Drooge *et al.*, 2004).

A) Parámetros modelo independientes.

A continuación se muestran los parámetros modelo independientes obtenidos a partir de los resultados de cesión *in vitro* de las diferentes formulaciones de micropartículas de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (tabla 40).

Tabla 40. Parámetros modelo independientes correspondientes a los resultados normalizados de los ensayos de cesión *in vitro* de las formulaciones de microesferas de THC desarrolladas ($n=3$).

Formulación	$t_{10\%}$	$t_{60\%}$	$t_{90\%}$	ED _{13 días} (%)
<i>MPs THC-PCL 15/150</i>	3h	2 días	8 días	74,48
<i>MPs THC-PCL 15/150-0,05% vit E</i>	3h	18 días	> 18 días	46,32
<i>MPs THC-PCL 15/150-5% vit E</i>	3h	2 días	8 días	77,54
<i>MPs THC-PCL 30/150</i>	3h	2 días	8 días	77,38
<i>MPs THC-PCL 30/150-0,05% vit E</i>	3h	7 días	> 18 días	54,38
<i>MPs THC-PCL 30/150-5% vit E</i>	3h	2 días	6 días	82,07
<i>MPs THC-PCL 50/150</i>	3h	2 días	10 días	71,13

Como podemos observar el $t_{10\%}$ fue de unas 3 horas para todas las formulaciones de microesferas de THC-PCL desarrolladas. El $t_{60\%}$ fue próximo a 2 días para las formulaciones preparadas sin antioxidante o con un 5% del mismo, incrementándose dicho valor en el caso de las formulaciones preparadas a partir de 0,05% de vitamina E acetato. El $t_{90\%}$ fue de 8 días para las micropartículas que no contenían antioxidante y para la formulación 15/150 con un 5% de vitamina E acetato; este tiempo se redujo a 6 días para la formulación 30/150-5% vitamina E acetato, y se incrementó a más de 18 días en el caso de las formulaciones preparadas con un 0,05% de antioxidante.

En cuanto a la eficacia de disolución, en el rango de relaciones p.a.:polímero que hemos trabajado, a día 13 del ensayo el incremento de carga de THC en las microesferas preparadas sin antioxidante no influyó sobre la eficacia de disolución del mismo, siendo ésta de un 75% en todos los casos.

Cuando se adicionó vitamina E acetato a una concentración del 0,05%, los valores de eficacia de disolución a los 13 días respecto a la formulación sin antioxidante se hicieron más bajos (alrededor del 50%).

Sin embargo, cuando se empleó el antioxidante a un 5% pareció no influir demasiado sobre el perfil de disolución del THC a partir de los sistemas. La eficacia de disolución se incrementó ligeramente (de un 74,48% a un 77,54% en el caso de las formulaciones 15/150, y de un 77,38% a un 82,07% en las formulaciones 30/150).

A continuación, con el objetivo de evaluar matemáticamente el efecto de la adición de antioxidante en los sistemas sobre los perfiles de las curvas de velocidad de disolución del THC, se calcularon los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2) (tabla 41). Para ello se tomó como referencia la formulación sin antioxidante preparada con la misma relación inicial principio activo:polímero.

Debido a que los valores de f_2 son sensibles al número de puntos de muestreo (sólo debe considerarse un punto a partir del 85% de fármaco disuelto), se calcularon estos parámetros para $t=10$ días en el caso de las micropartículas elaboradas con una relación p.a.:polímero 15/150, y $t=7$ días en las formulaciones preparadas a partir de la relación 30/150, de acuerdo a los resultados reflejados en la tabla 39.

Tabla 41. Factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2) de las diferentes formulaciones de microesferas de THC (formulación de referencia: aquella sin antioxidante).

Formulación	f_1	f_2	Conclusión
MPs THC-PCL 15/150 0,05% vit E	36,75*	30,53*	No similares
MPs THC-PCL 15/150 5% vit E	4,93*	74,19*	Similares (diferencia 2-5%)
MPs THC-PCL 30/150 0,05% vit E	27,07 [‡]	37,08 [‡]	No similares
MPs THC-PCL 30/150 5% vit E	6,33 [‡]	69,45 [‡]	Similares (diferencia < 5%)

* $t=10$ días

[‡] $t=7$ días

Así, según los resultados obtenidos podemos afirmar que las micropartículas elaboradas a partir de una misma relación inicial p.a.:polímero (15/150 ó 30/150) sin antioxidante o con antioxidante al 5% presentan perfiles de liberación similares (mostrando valores de f_1 comprendidos entre 0 y 15, y valores de f_2 entre 50 y 100). Sin embargo, cuando se empleó antioxidante al 0,05%, la liberación del THC encapsulado se hizo más lenta ($f_1 > 15$ y $f_2 < 50$).

B) Parámetros modelo dependientes.

Por último, los datos de cesión experimentales se ajustaron a los modelos cinéticos de Higuchi, orden uno y Korsmeyer-Peppas (tablas 42-43).

Tabla 42. Ajustes a los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas de los datos de cesión *in vitro* de Δ^9 -THC a partir de las formulaciones de micropartículas de Δ^9 -THC desarrolladas ($n=3$).

Formulación	Higuchi días 0-16*	Higuchi días 0-3	Higuchi días 3-16*	Korsmeyer-Peppas**	Mecanismo de transporte
<i>MS 15/150</i>	$y=22,338x+18,252$ $r=0,9629$	$y=37,552x+0,6219$ $r=0,9957$	$y=13,584x+45,685$ $r=0,9911$	$y= 0,4348x-0,4244$ $r=0,9962$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana
<i>MS 15/150-0,05% vit E acetato</i>	$y=12,221x+14,914$ $r=0,9470$	$y=22,729x+2,5746$ $r=0,9997$	$y=7,0123x+31,543$ $r=0,9715$	$y= 0,3551x-0,6055$ $r=0,9843$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana
<i>MS 15/150-5% vit E acetato</i>	$y=20,229x+17,802$ $r=0,9443$	$y=37,423x-2,6218$ $r=0,9996$	$y=11,258x+46,511$ $r=0,9608$	$y= 0,5433x-0,4655$ $r=0,9999$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana
<i>MS 30/150</i>	$y= 23,036x+18,913$ $r= 0,9549$	$y= 39,931x-0,8432$ $r=0,9956$	$y= 13,282x+49,428$ $r=0,9777$	$y= 0,4666x-0,4142$ $r=0,9951$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana
<i>MS 30/150-0,05% vit E acetato</i>	$y= 13,685x+19,003$ $r=0,9405$	$y= 25,258x+5,0848$ $r=0,9961$	$y= 7,3054x+39,471$ $r=0,9571$	$y= 0,3697x-0,5044$ $r=0,9940$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana
<i>MS 30/150-5% vit E acetato</i>	$y= 30,876x+11,186$ $r=0,9782$	$y= 41,875-0,3241$ $r=0,9968$	$y= 19,159x+41,006$ $r=0,9899$	$y= 0,4678x-0,3851$ $r=0,9962$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana
<i>MS 50/150</i>	$y= 23,93x+11,287$ $r=0,9752$	$y= 36,715x-3,6568$ $r=0,9969$	$y= 16,376x+34,971$ $r=0,9921$	$y= 0,5356x-0,4942$ $r=0,9988$	$n\approx 0,5$ Difusión Fickiana

$r=$ coeficiente de correlación.

*En el caso de las formulaciones con vitamina E acetato tiempo final 18 días.

**Cinética de Korsmeyer-Peppas considerando únicamente hasta el 60% de p.a. liberado.

Tabla 43. Ajustes a la cinética de orden uno de los datos de cesión *in vitro* de Δ^9 -THC a partir de las formulaciones de micropartículas de Δ^9 -THC desarrolladas ($n=3$).

Formulación	Orden uno días 0-16*	Orden uno días 0-3	Orden uno días 3-16*
<i>MS 15/150</i>	$y = -0,2276x + 4,3687$ $r = 0,9887$	$y = -0,3301x + 4,4896$ $r = 0,9994$	$y = -0,2227x + 4,3158$ $r = 0,9777$
<i>MS 15/150-0,05% vitamina E acetato</i>	$y = -0,0397x + 4,2776$ $r = 0,8925$	$y = -0,1475x + 4,4875$ $r = 0,9900$	$y = -0,0233x + 4,078$ $r = 0,9482$
<i>MS 15/150-5% vitamina E acetato</i>	$y = -0,1241x + 4,146$ $r = 0,9537$	$y = -0,2994x + 4,51$ $r = 0,9991$	$y = -0,093x + 3,7669$ $r = 0,9655$
<i>MS 30/150</i>	$y = -0,2561x + 4,3456$ $r = 0,9966$	$y = -0,3588x + 4,5009$ $r = 0,9994$	$y = -0,238x + 4,1784$ $r = 0,9980$
<i>MS 30/150-0,05% vitamina E acetato</i>	$y = -0,0512x + 4,1921$ $r = 0,8910$	$y = -0,1825x + 4,4573$ $r = 0,9982$	$y = -0,0293x + 3,9263$ $r = 0,9346$
<i>MS 30/150-5% vitamina E acetato</i>	$y = -0,3652x + 4,4593$ $r = 0,9985$	$y = -0,3972x + 4,4942$ $r = 0,9996$	$y = -0,3554x + 4,4082$ $r = 0,9951$
<i>MS 50/150</i>	$y = -0,2281x + 4,4878$ $r = 0,9911$	$y = -0,2904x + 4,5296$ $r = 0,9999$	$y = -0,2317x + 4,5306$ $r = 0,9832$

r = coeficiente de correlación.

*En el caso de las formulaciones con vitamina E acetato tiempo final 18 días.

En todos los casos los valores obtenidos para el exponente n de Korsmeyer-Peppas fueron próximos a 0,5; sugiriendo que el mecanismo de liberación del THC a partir de los sistemas fue la difusión Fickiana. De hecho, debido a la naturaleza semicristalina de la PCL, el agua es capaz de penetrar fácilmente en la región amorfa del polímero, facilitando así la liberación del fármaco por difusión.

Los perfiles de cesión se ajustan bastante bien a las cinéticas de Higuchi y de orden uno, siendo mejor el ajuste si se desdobra la curva en 2 partes, sugiriendo por tanto una cinética bifásica. Así podría distinguirse una primera fase (hasta día 3 de ensayo), que se corresponde con una liberación del principio activo de alrededor del 65%, en la que la velocidad de cesión es mayor (mayor pendiente de la recta), gobernada por una cinética de orden 1 ($r=0,999$); y una segunda etapa en la que la velocidad de liberación del fármaco a partir de los sistemas decrece, no observándose grandes diferencias entre los ajustes de esta segunda etapa (días 3-16) a uno u otro modelo cinético.

Evaluación morfológica de las micropartículas tras los ensayos de cesión.

Por último, se evaluó por microscopía electrónica de barrido la morfología de las microesferas a lo largo de los ensayos de cesión *in vitro*, con el objetivo de determinar si se producía la bioerosión de las mismas. La figura 55 muestra algunas fotografías tomadas durante los ensayos de cesión.

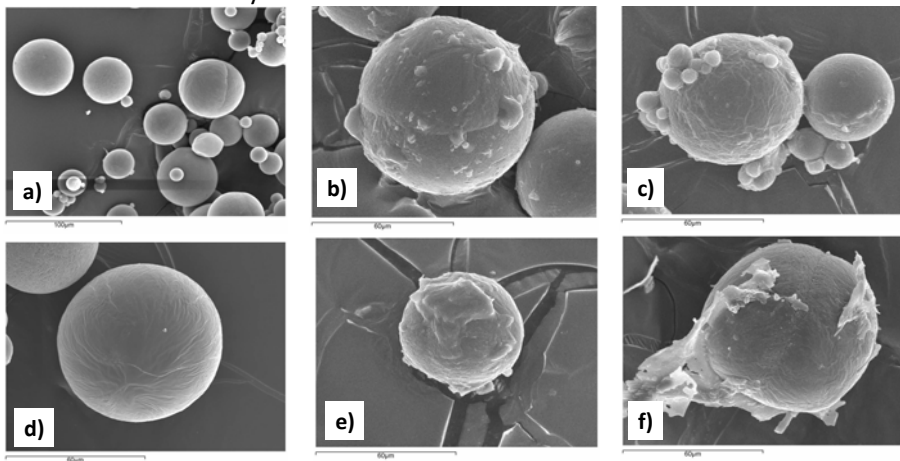


Figura 55. Fotografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido de las microesferas durante los ensayos de cesión *in vitro*.

Formulación de micropartículas THC-PCL 15/150 a tiempo 0 (a), 10 días (b) y 15 días (c)
Formulación de micropartículas THC-PCL 30/150 a tiempo 0 (d), 10 días (e) y 15 días (f).

Como podemos observar, durante los ensayos de cesión *in vitro* se produjo una ligera erosión de la superficie de las micropartículas, la cual no afectó a la morfología esférica de las mismas. La erosión observada en las micropartículas preparadas con antioxidante fue similar a la observada sin la adición del mismo. Por tanto, al igual que ocurrió con las micropartículas de CBD desarrolladas, se descartó la erosión de la poli- ϵ -caprolactona como mecanismo de liberación del THC encapsulado, y la liberación del cannabinoide fue atribuida a la difusión del mismo a través de la matriz polimérica. Además, los valores del exponente n obtenido al ajustar los resultados experimentales de cesión *in vitro* a la cinética de Korsmeyer-Peppas fueron próximos a 0,5, corroborando así que es un proceso de difusión Fickiana el que gobierna el proceso de liberación del Δ^9 -THC a partir de los sistemas desarrollados.

3

CONCLUSIONES

Se han obtenido micropartículas de cannabidiol y de Δ^9 -tetrahidrocannabinol esféricas, no agregadas, con una superficie lisa y una distribución de tamaños estrecha con un valor de polidispersión inferior a 2. Estas micropartículas presentaron un tamaño medio de 50-60 μm , adecuado para su administración por vía subcutánea.

Mediante su microencapsulación, se ha transformado el Δ^9 -THC materia prima - que se presenta como una resina oleosa difícil de manipular- en un producto sólido, pulverulento, fácil de pesar y manipular.

El rendimiento del proceso fue superior al 80% y las eficacias de encapsulación fueron mayores del 90% en todos los casos. La inclusión de vitamina E acetato como antioxidante a concentraciones de 0,05% y 5% en las microesferas de Δ^9 -THC no modificó la eficacia de encapsulación del principio activo.

No se detectó interacción química entre los cannabinoides y el polímero empleado para su encapsulación (poli- ϵ -caprolactona). Tanto en las micropartículas de CBD como en las micropartículas de THC el cannabinoide se encontró disperso al estado molecular en la matriz polimérica.

Al incrementar el contenido en cannabinoide en los sistemas se produjo un descenso en la temperatura de fusión del polímero que estuvo acompañada de un

descenso en la cristalinidad del mismo. Este descenso en la cristalinidad de la PCL explicaría el efecto plastificante del cannabinoide sobre el polímero, el cual se tradujo en un aumento en la agregación de las micropartículas al incrementar el contenido en principio activo. Este aumento en la agregación fue el factor limitante en el desarrollo de micropartículas con mayor carga en principio activo, de manera que la carga máxima alcanzada, sin que se viera comprometida la fluidez del producto, fue de 17 mg de principio activo/100 mg de micropartículas.

Los cannabinoides se liberaron de las microesferas de forma prolongada. En todos los casos se obtuvieron perfiles bifásicos, con una etapa de liberación rápida durante los primeros días, seguida de una etapa de liberación más lenta.

En el caso del CBD se observaron diferencias en la cesión *in vitro* del principio activo entre las formulaciones 5/150, 10/150 y 15/150 –en las cuales la primera fase de liberación fue más lenta y la cesión se prolongó 13 días-, y la formulación 30/150 – en la cual la primera fase de liberación fue más rápida y la cesión se prolongó hasta 20 días-.

En el caso del Δ^9 -THC todas las formulaciones se comportaron igual en cuanto a la liberación del principio activo encapsulado, prolongándose la misma hasta el día 16, excepto cuando se incorporó vitamina E acetato al 0,05% que provocó que no todo el fármaco fuera liberado a partir de los sistemas.

La adición de un 5% de vitamina E acetato como antioxidante a las micropartículas de Δ^9 -THC pareció aumentar la estabilidad del fármaco, no influyendo en los perfiles de cesión.

Se seleccionaron las formulaciones 15/150 y 30/150 de micropartículas de CBD y las formulaciones 15/150 y 30/150 con o sin 5% de antioxidante de micropartículas de Δ^9 -THC para la evaluación de su eficacia, debido a que fueron las que presentaron una mayor carga del principio activo y, por consiguiente, representarían un menor volumen de micropartículas a administrar.

The background features three overlapping circles of varying sizes, each composed of concentric rings in shades of gray. Two thin, light gray lines intersect to form an 'X' shape across the page, with the circles positioned at the intersections and along the lines.

**V. ESTUDIOS EN
CULTIVOS CELULARES
V. CELL CULTURE STUDIES**

Una vez caracterizadas *in vitro* las formulaciones de micropartículas de cannabidiol y Δ^9 -tetrahidrocannabinol, se procedió a evaluar la eficacia de las mismas en cultivos celulares. Para ello se aprovechó el potencial antitumoral de los cannabinoides (Costa, 2007; Guzmán, 2003; Ligresti *et al.*, 2006; Velasco *et al.*, 2004). Estos ensayos fueron llevados a cabo en los laboratorios del Dr. Vincenzo Di Marzo (Endocannabinoid Research Group-Istituto di Chimica Biomolecolare-CNR, Nápoles, Italia).

1 | MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar cómo se llevarían a cabo estos estudios de eficacia de las micropartículas en cultivos celulares se realizó una revisión bibliográfica, y se vio que para realizar estos ensayos existían dos posibilidades:

a) Cuantificar los niveles de citoquinas (en concreto IL-10 y IL-12) en el medio de cultivo, pues el CBD estimula la producción de IL-12 e inhibe la producción de IL-10 *in vitro* tanto en macrófagos (Sacerdote *et al.*, 2005) como en linfocitos T humanos

(Srivastava *et al.*, 1998).

b) Realizar ensayos de proliferación celular o citotoxicidad sobre diversas líneas celulares cancerígenas, aprovechando el potencial antitumoral de los cannabinoides (Ligresti *et al.*, 2006).

Como ya se comentó en la introducción, las propiedades antiproliferativas de los cannabinoides se conocen desde hace más de 30 años, cuando Munson y cols. (Munson *et al.*, 1975) demostraron que el THC inhibe el crecimiento de células de adenocarcinoma de pulmón tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, no se realizaron más estudios en dicho área hasta los años 90, cuando se demostró que diversos fitocannabinoides (como el THC y el CBD), cannabinoides sintéticos (por ejemplo, WIN 55,212-2 y HU-210) y cannabinoides endógenos (anandamida y 2-araquidonoilglicerol) muestran acción antiproliferativa *in vitro* sobre un amplio espectro de células tumorales (Guzmán, 2003; Ligresti *et al.*, 2006; Velasco *et al.*, 2004). Además, hoy en día se sabe que los cannabinoides son capaces de ralentizar el crecimiento de varios tumores en modelos xenogénicos, como el carcinoma de pulmón, los gliomas, epitelomas tiroideos, carcinomas epiteliales y linfomas. No obstante, todavía no se conocen con exactitud todas las bases moleculares de este efecto (Freimuth *et al.*, 2009; Grant *et al.*, 2005).

Los ensayos sobre cultivos celulares fueron realizados en el Istituto di Chimica Biomolecolare-CNR (Nápoles, Italia), bajo la tutela del Dr. Vincenzo Di Marzo, responsable del Endocannabinoid Research Group -grupo con gran experiencia en la evaluación farmacológica de los fito- y endocannabinoides-. Basándonos en resultados previos de este grupo de investigación (Ligresti *et al.*, 2006), donde evaluaron el potencial antitumoral de diversos fitocannabinoides sobre distintas líneas celulares cancerígenas, se decidió evaluar la eficacia de los sistemas de CBD y Δ^9 -THC desarrollados realizando ensayos de citotoxicidad *in vitro* sobre células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, la línea celular de leucemia basófila en ratas RBL-2H3 y células de cáncer colorrectal humano Caco-2.

Estos estudios de citotoxicidad nos permitieron evaluar no sólo la eficacia de las formulaciones de micropartículas de CBD ó Δ^9 -THC, si no también evaluar la biocompatibilidad de las microesferas placebo.

En concreto se evaluó la eficacia de las formulaciones de micropartículas de CBD-PCL y THC-PCL 15/150 y 30/150, puesto que son aquellas que presentan más interés de cara a una futura administración *in vivo*, ya que serían las que permitirían administrar la mayor cantidad de fármaco para una misma cantidad de polímero.

Los medios de cultivo fueron seleccionados de acuerdo con la información suministrada por el proveedor (DSMZ, Braunschweig, Alemania), y aparecen recogidos en la tabla 44.

Tabla 44. Resumen de las líneas celulares empleadas y sus medios de cultivo. (FBS: suero fetal bovino).

Línea celular	Medio de cultivo
<i>MDA-MB-231</i>	medio RPMI 1640 con L-Glutamina (Biowhitaker®, Lonza, Velviers, Bélgica), 10% FBS, 1% Penicilina-estreptomicina (10mg/mL).
<i>RBL-2H3</i>	Essential Medium Tagle with L-Glutamina (EMEM) (Biowhitaker®, Lonza, Velviers, Bélgica), 10% FBS, 1% Penicilina-estreptomicina, glutamina 200mM.
<i>Caco-2</i>	Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa y L-glutamina (Biowhitaker®, Lonza, Velviers, Bélgica).

Para llevar a cabo los ensayos se sembraron las células en placas de poliestireno de 6 pocillos (Falcon®, BD) a densidad de 30.000-90.000 células/pocillo, y fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ en atmósfera humidificada (incubador de CO₂, Forma Scientific Inc). La cantidad de células empleadas en cada ensayo dependió de la duración del mismo, pues si éste duraba muchos días debíamos partir de un número menor de células, para que en los pocillos control éstas crecieran sin problemas. Cinco horas después de sembrar las células (cuando éstas ya estaban adheridas al pocillo), se añadió el tratamiento (vehículo, fármaco en solución, micropartículas placebo o micropartículas cargadas). El estado de las células fue evaluado diariamente mediante microscopía óptica. Cada dos días se reemplazó el medio de cultivo para evitar que la pérdida de nutrientes del medio afectara a la viabilidad celular, y a diferentes tiempos se evaluó la viabilidad celular por colorimetría, empleándose dos técnicas:

a) **Tinción con cristal violeta**

Las células se observaron al microscopio óptico para comprobar que no había ningún tipo de contaminación. A continuación fueron lavadas con 1 mL de PBS pH 7,4 (Phosphate Buffer Saline, 0,0067M Bio Whittaker BE17-516, Lonza®) para eliminar las células muertas –no adheridas-, y fueron fijadas con 1mL de solución de formalina al 10% (Sigma Aldrich) durante 15 minutos. Después de fijadas las células se lavaron con agua destilada y se colorearon con 1 mL de cristal violeta al 0,1% (Sigma Aldrich) durante 30 minutos. Finalmente se lavaron con agua para eliminar el exceso de colorante, se dejaron secar al aire, y se observaron por microscopía óptica. Para cuantificar la coloración, se añadieron 1,5 mL de ácido acético al 10% a las células teñidas para disolver el color y pasados 5 minutos, se determinó la absorbancia de los pocillos a 595 nm (espectrofotómetro Lambda12, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA).

b) **Reducción del MTT**

El ensayo MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células vivas (Mosmann, 1983). La sal es transformada por las enzimas en cristales azules insolubles (formazán) que absorben a 630 nm, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células. Las enzimas que realizan esta acción sólo se encuentran en células vivas, metabólicamente activas, y el color azul producido es proporcional al número de células vivas presentes. Este ensayo fue elegido por su gran sensibilidad (Clifford *et al.*, 1996).

Antes de comenzar el ensayo se observaron las células al microscopio óptico, para verificar que no había ningún tipo de contaminación. A continuación se añadieron 170 µL de solución MTT (5mg/mL) (Sigma Aldrich) en cada pocillo, dejando las placas en estufa a 37°C y 5% CO₂ durante 3 horas. Transcurrido dicho tiempo se lisaron las células y se solubilizaron los cristales azules formados por adición de 670 µL/pocillo de buffer de lisis pH 4,7 (contiene dodecilsulfato sódico –SDS- al 20% en una solución 1:1 de dimetilformamida –DMF- y agua) dejándolo actuar durante al menos 6 horas.

Finalmente la viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia de los diferentes pocillos a una longitud de onda de 630 nm (espectrofotómetro Lambda12, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA).

Con ambas técnicas el porcentaje de viabilidad celular se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células control}} \times 100 \quad (\text{Ec. 17})$$

*DO: densidad óptica

Se tomó como control negativo (100% de supervivencia celular) las células tratadas con el vehículo o con las micropartículas placebo.

Como control positivo se empleó el fármaco en solución.

Preparación de las muestras

Para evaluar el efecto del fármaco en solución se preparó una solución madre de cannabinoide (CBD o Δ^9 -THC) en etanol (100mM), diluyéndose posteriormente a la concentración deseada con medio de cultivo carente de FBS y antibióticos. En todos los casos la concentración de etanol fue inferior al 0,001%.

En el caso de las micropartículas, se pesó la cantidad deseada y se resuspendió en medio de cultivo carente de suero y antibióticos. La cantidad de micropartículas a ensayar se calculó a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de cesión *in vitro* (cantidad de fármaco cedido/día), de manera que, diariamente se liberase una cantidad de cannabinoide similar a la añadida en solución.

Ensayos

Se realizaron cuatro tipos de ensayos sobre cultivos celulares:

- 1) Evaluación de la citotoxicidad de las micropartículas placebo.

Se evaluó la citotoxicidad de las microesferas de poli- ϵ -caprolactona blancas con el fin de garantizar la biocompatibilidad de las mismas. Como ya se comentó en la introducción, la poli- ϵ -caprolactona es un polímero biodegradable y biocompatible, aprobado por la FDA, ampliamente utilizado en tecnología farmacéutica para la elaboración de sistemas de liberación controlada de

administración por vía parenteral (Durán *et al.*, 2006).

El ensayo se realizó sobre células MDA-MB-231 y RBL-2H3. A las 3h de sembrar las células, se adicionaron 0,5-8 mg de micropartículas placebo/pocillo resuspendidas en 100µL de medio de cultivo, adicionándose sobre los cultivos celulares de manera que la concentración final de las mismas fue de 0,47-2,66 mg/mL. Estas concentraciones fueron elegidas en función de las cantidades de micropartículas de CBD o Δ^9 -THC utilizadas para evaluar la eficacia de las mismas. En los pocillos control no se adicionó ningún tratamiento.

2) Evaluación de la citotoxicidad del CBD y del Δ^9 -THC en solución.

Estos ensayos preliminares se realizaron para verificar la eficacia de nuestros CBD y Δ^9 -THC materias primas (THC Pharm GmbH, Frankfurt, Alemania).

Se trabajó con dos concentraciones de cannabidiol y de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (10 y 25 µM) sobre células MDA-MB-231 (células de cáncer de mama humano) y células RBL-2H3 (células de leucemia basófila de rata), respectivamente. Se seleccionaron dichas concentraciones basándonos en resultados previos del laboratorio del Dr. Di Marzo (Ligresti *et al.*, 2006) donde la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) del CBD sobre células MDA-MB-231 fue de 10,6±1,8 µM; y la IC₅₀ del Δ^9 -THC sobre células RBL-2H3 fue de 15,8±3,7 µM.

La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) se define como la concentración de fármaco necesaria para reducir *in vitro* el crecimiento de la población celular en un 50%. Dicha concentración es calculada por extrapolación a partir de la curva obtenida al tratar diariamente las células con distintas concentraciones de fármaco durante 96h.

Dado que uno de los principales objetivos de los ensayos en cultivos celulares fue evaluar la eficacia de las micropartículas de CBD como sistemas de liberación prolongada, se realizaron ensayos preliminares con CBD en solución administrado diariamente para evaluar la influencia de la duración del tratamiento sobre la viabilidad celular. Para ello se emplearon células de cáncer de mama MDA-MB-231. Los tiempos de exposición ensayados fueron períodos cortos (48 y 96 horas), por lo que se empleó la técnica del MTT para evaluar el

efecto citotóxico, ya que ésta es más sensible que el cristal violeta.

- 3) Puesta a punto de un protocolo para la evaluación el efecto citotóxico de las micropartículas a largo plazo.

Debido a que no es factible mantener las células en cultivo durante una semana sin cambiar el medio de cultivo (pues la falta de nutrientes afectaría a la viabilidad celular), se realizó un ensayo preliminar con el fin de evaluar si el uso de un inserto (insertos para cultivos celulares con poro de $3\mu\text{m}$, Falcon®), sobre el cual se depositarían las micropartículas, influía sobre la viabilidad celular. Los insertos seleccionados permitirían retirar el medio de cultivo sin eliminar las micropartículas, pues el tamaño de las micropartículas ($>30\mu\text{m}$) era muy superior al tamaño de poro del inserto ($3\mu\text{m}$), garantizando así que éstas no eran capaces de atravesar la membrana y difundir a la parte inferior. Con el fin de determinar si la presencia del inserto modifica la citotoxicidad del CBD se realizó un ensayo en el que se sembraron las células MDA-MB-231 sobre la placa de 6 pocillos, en la mitad de los pocillos se adicionó el fármaco directamente sobre las células, y en la otra mitad de los pocillos se colocó un inserto sobre cada pocillo y sobre él se adicionó el fármaco. El uso del inserto hizo que el volumen de medio de cultivo en esos pocillos fuera de 2mL, en lugar de 1mL. El fármaco en solución (CBD 25 μM) se adicionó diariamente, y el medio de cultivo fue reemplazado cada 2 días. La duración del ensayo fue de 4 días. Transcurrido dicho tiempo se evaluó la citotoxicidad mediante el test del cristal violeta.

- 4) Determinación de la eficacia de las micropartículas de CBD o Δ^9 -THC.

Una vez puestas a punto las condiciones de trabajo se procedió a evaluar la eficacia en cultivos celulares de las formulaciones de micropartículas de cannabidiol CBD-PCL 15/150 y 30/150, y micropartículas de Δ^9 -tetrahidrocannabinol THC-PCL 15/150 y 30/150 elaboradas con o sin antioxidante (vitamina E acetato al 5%). En todos los casos se comprobó la eficacia de una única administración de las microesferas, frente a la administración diaria del fármaco en solución.

La cantidad de micropartículas cargadas de fármaco que se adicionó sobre cada

pocillo se calculó tomando como referencia los resultados obtenidos en los ensayos de cesión realizados *in vitro* (capítulo IV apartados 2.2.5 y 2.3.4), de modo que la cantidad de fármaco liberado cada día fuera similar a la cantidad de fármaco en solución adicionado diariamente en los pocillos control. En los ensayos de cesión *in vitro* el porcentaje de fármaco encapsulado liberado fue de alrededor del 16%/día durante los 5 primeros días de ensayo, es decir, se liberaron 1,6 mg de fármaco/100 mg de microesferas/día para las formulaciones 15/150, y 2,6 mg de fármaco/100 mg de microesferas/día para las formulaciones 30/150.

Se evaluó la viabilidad celular a diferentes tiempos de exposición: 2, 4, 7 y 9 días. No es posible alargar la duración de los ensayos debido a que en los pocillos control (tratados con vehículo o micropartículas placebo) las células alcanzarían el 100% de confluencia y comenzarían a morir (no dependiendo del fármaco) dejando de servir como control.

2 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

2.1. Evaluación de la ausencia de citotoxicidad de las micropartículas placebo.

En la tabla 45 aparecen recogidos los resultados relativos al estudio de citotoxicidad de las micropartículas placebo. Como podemos observar, éstas no tuvieron ningún efecto sobre la viabilidad celular (valor de probabilidad asociada al estadístico t-de Student=0,24). Por tanto se confirma la biocompatibilidad del polímero y de los sistemas elaborados (micropartículas con un tamaño medio de 37 μm).

Tabla 45. Evaluación de la citotoxicidad de las micropartículas placebo.

Tratamiento	Absorbancia	t-Student
Ninguno	0,1010	t=-1,36 (p=0,24)
	0,0825	
	0,0827	
3 mg micropartículas placebo/pocillo	0,0809	
	0,1476	
	0,1206	

2.2. Evaluación del efecto citotóxico del cannabinoide en solución.

2.2.1 Cannabidiol.

Se evaluó la influencia de la duración del tratamiento (48 o 96h) sobre la viabilidad de las células de cáncer de mama MDA-MB-231. Se usaron dos concentraciones de CBD (THC Pharm GmbH, Frankfurt, Alemania): 10 y 25 μ M. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la tabla 46.

Tabla 46. Efecto de la duración del tratamiento con CBD en solución sobre la viabilidad de las células MDA-MB-231. Ensayo del MTT.

Concentración CBD (μ M)	Duración del tratamiento (horas)	% viabilidad celular (media \pm SD)
10	48	82,21 \pm 0,02
	96	58,46 \pm 0,07
25	48	8,34 \pm 0,09
	96	2,67 \pm 0,36

La figura 56 muestra, como al incrementar la duración del tratamiento de 48h a 96h se produjo un incremento de la citotoxicidad de 17 a 42 % para el tratamiento con CBD 10 μ M, y de 91% a 98% para el tratamiento con CBD 25 μ M (tabla 46). Estos resultados sugieren que desde el punto de vista terapéutico es interesante incrementar el tiempo de contacto del cannabinoide con las células cancerígenas, pues aumenta su eficacia antitumoral.

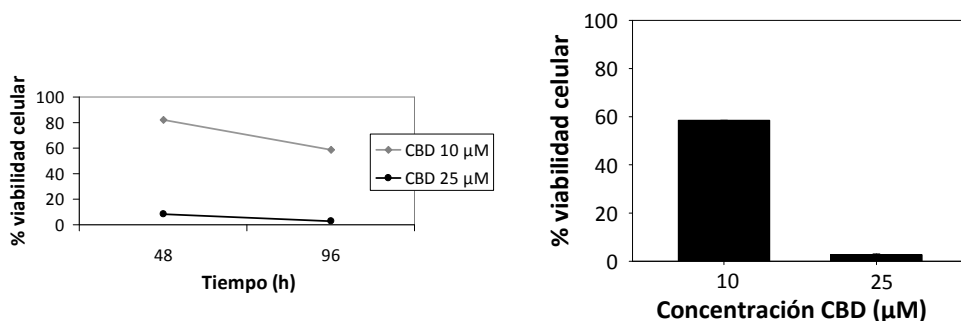


Figura 56. Viabilidad celular de células MDA-MB 231 (80.000 células/pocillo) tratadas con CBD en solución.

Tal y como muestra la figura 56, tras 96h de tratamiento el CBD a una concentración 10 µM originó una citotoxicidad del 41,54%, mientras que a una concentración de 25 µM la citotoxicidad fue próxima al 98%. Con estos datos a 96h se procedió a hacer una estimación de la IC₅₀ por extrapolación, obteniéndose un valor de 12,24µM, resultado similar al obtenido previamente en el laboratorio del Dr. Di Marzo (IC₅₀=10,6±1,8µM) (Ligresti *et al.*, 2006) con un extracto de CBD (GW Pharmaceuticals Ltd., UK).

2.2.2 Δ⁹-tetrahidrocannabinol.

La figura 57 muestra los resultados de citotoxicidad producidos por el Δ⁹-THC en solución sobre células RBL-2H3. Como podemos observar, el THC en solución a una concentración de 25µM produjo una citotoxicidad del 55%, de manera que la IC₅₀ estará alrededor de este valor. Sin embargo, el grupo del Dr. Di Marzo con un THC proveniente de distinto origen obtuvo una IC₅₀ de 15,8±3,7µM sobre esta línea celular (Ligresti *et al.*, 2006). En efecto, el THC del Dr. Di Marzo, no era THC puro, sino un extracto de cannabis con un alto contenido en THC proveniente de otra casa comercial. Por tanto, la diferencia en los resultados obtenidos puede ser debida a la diferente potencia de los compuestos al provenir de diferente origen, aunque también es posible que estas diferencias sean debidas al estado de las células, el número de pase en el que se realicen los ensayos, y a que siempre existe una variabilidad biológica.

Concentración THC (μM)	% viabilidad celular (media \pm SD)
10	98,35 \pm 1,87
25	45,06 \pm 3,72

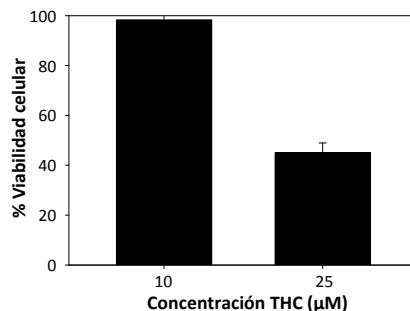


Figura 57. Viabilidad celular de células RBL-2H3 (40.000 células/pocillo) tratadas con THC en solución 5 μM ó 25 μM durante 4 días (cristal violeta).

2.3. Puesta a punto de un protocolo para la evaluación el efecto citotóxico de las micropartículas a largo plazo.

En la tabla 47 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo realizado para evaluar si la presencia del inserto modificaba el efecto citotóxico del CBD. Como puede observarse éste no tuvo ninguna influencia sobre los resultados obtenidos (la citotoxicidad de CBD en solución 25 μM sobre células MDA-MB-231 fue del 92% sin el inserto y del 92% con el inserto), por lo que se emplearon estos insertos en los ensayos de citotoxicidad de las micropartículas con el fin de conseguir tiempos de exposición superiores a 2 días.

Tabla 47. Evaluación de la influencia del inserto en la citotoxicidad del CBD.

Concentración CBD (μM)	Duración del tratamiento (horas)	Inserto	% viabilidad celular (media \pm SD)	t-Student
25	96	No	8,21 \pm 0,57	t=-0,18
		Sí	8,33 \pm 0,28	(p=0,86)

2.4. Determinación de la eficacia de las micropartículas de CBD y Δ^9 -THC.

Una vez puestas a punto las condiciones de trabajo, se realizaron los estudios de evaluación de la eficacia de las micropartículas en cultivos celulares.

2.4.1 Cannabidiol.

En la tabla 48 aparecen reflejados los resultados de viabilidad celular obtenidos con el CBD en solución y con micropartículas de CBD sobre células MDA-MB-231 tras 4 días de tratamiento.

Tabla 48. Efecto antitumoral del CBD en solución o incorporado en micropartículas (15/150 y 30/150) sobre células MDA-MB-231 (80.000 células/pocillo), tiempo=4 días, ensayo del cristal violeta.

Tratamiento	% viabilidad celular (media±SD)
CBD 10 μ M	72,44±0,50
CBD 25 μ M	10,42±2,51
4mg MPs CBD 15/150	46,33±1,43
8mg MPs CBD 15/150	48,01±1,18
3mg MPs CBD 30/150	38,54±0,73
4mg MPs CBD 30/150	22,60±1,34

Como podemos observar, ambas formulaciones de micropartículas de CBD (15/150 y 30/150) mostraron un efecto citotóxico sobre las células MDA-MB-231 durante los 4 días que duró el ensayo, demostrando la capacidad de los sistemas de ofrecer una liberación prolongada del fármaco (figura 58). No obstante, no se observó una correlación en cuanto a la cesión *in vitro* en baño de agitación y el efecto en cultivos celulares, pues en teoría la cantidad de CBD liberada a partir de 4mg micropartículas CBD-PCL 15/150 debería muy superior a 25 μ M, y por tanto obtenerse un efecto superior al obtenido con el fármaco en solución a dicha concentración, pero no fue así. Por ello, con el objetivo de investigar si esa diferencia en la eficacia era debida a la saturación del medio o a una menor de cesión del fármaco respecto a los ensayos de cesión *in vitro* en baño de agitación -pues la velocidad de agitación influye en la velocidad de cesión del principio activo, incrementándose ésta al incrementar la velocidad de agitación (Conti *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2001a; D'Souza *et al.*, 2005)-, se incrementó la cantidad de micropartículas a emplear a 8mg. Al aumentar la cantidad de microesferas no aumentó el efecto citotóxico, por lo que se concluyó que una posible causa de esta diferencia podría ser la saturación del medio.

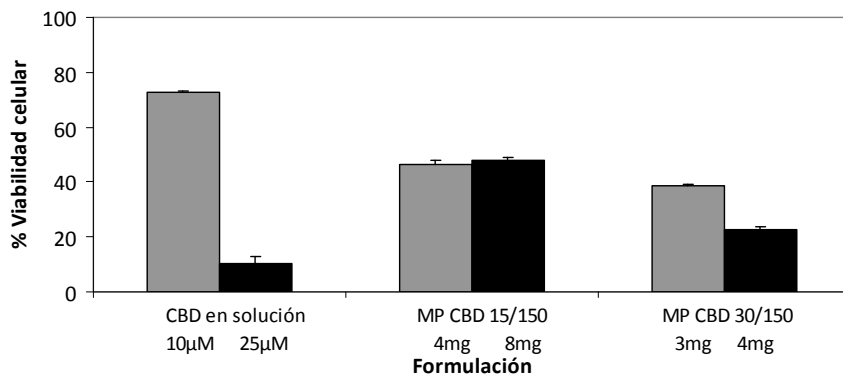


Figura 58. Efecto antitumoral del CBD en solución o incorporado en micropartículas (15/150 y 30/150) sobre células MDA-MB-231 (80.000 células/pocillo), tiempo=4 días. Ensayo del cristal violeta.

Posteriormente, se hizo un segundo ensayo alargando el tiempo de exposición de las células a las formulaciones y ajustando la cantidad de micropartículas a la cantidad de principio activo añadido en disolución, de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de cesión *in vitro*. También se disminuyó el número de células/pocillo sembradas al inicio del experimento con el fin de evitar que en los pocillos control las células alcanzasen rápidamente un alto grado de confluencia y no poder alargar la duración del ensayo. En la tabla 49 y la figura 59 se muestran los resultados obtenidos sobre células MDA-MB-231 (a) y células RBL-2H3 (b), respectivamente.

Tabla 49. Efecto antitumoral del CBD en solución o incorporado en micropartículas (15/150 y 30/150) sobre células (a) MDA-MB-231 o (b) RBL-2H3 (30.000 células/pocillo). Tiempo=9 días. Ensayo del MTT.

a)

Tratamiento	% viabilidad celular (media±SD)			
	día 2	día 4	día 7	día 9
CBD 20 µM	68,43±2,21	54,36±3,12	54,59±0,87	30,06±0,22
1,88 mg MPs CBD 15/150	78,31±1,03	43,11±1,18	38,13±2,23	52,75±3,13
0,94 mg MPs CBD 30/150	71,16±0,11	37,57±0,05	35,58±3,07	59,82±1,20

b)

Tratamiento	% viabilidad celular (media±SD)		
	día 2	día 4	día 9
	CBD 5 μ M	72,16±4,95	68,73±1,47
0,46 mg MPs CBD 15/150	77,16±0,18	79,12±3,04	87,39±1,04
0,23 mg MPs CBD 30/150	81,00±6,60	79,01±0,66	88,54±4,53

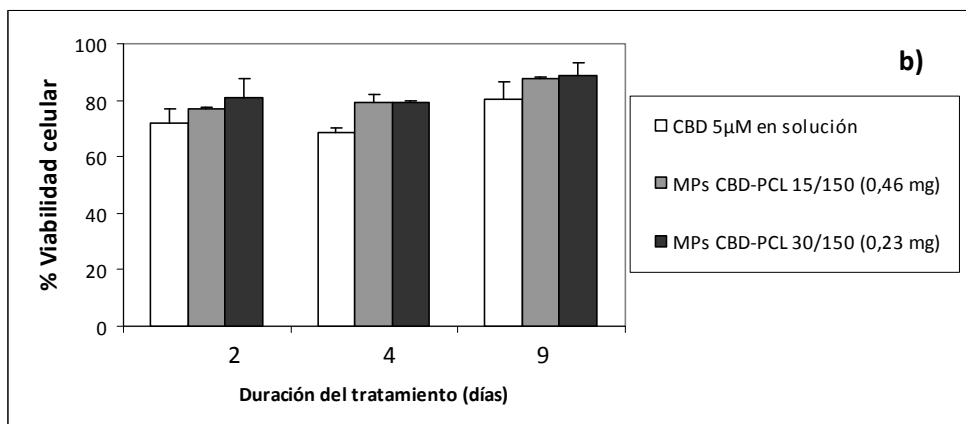
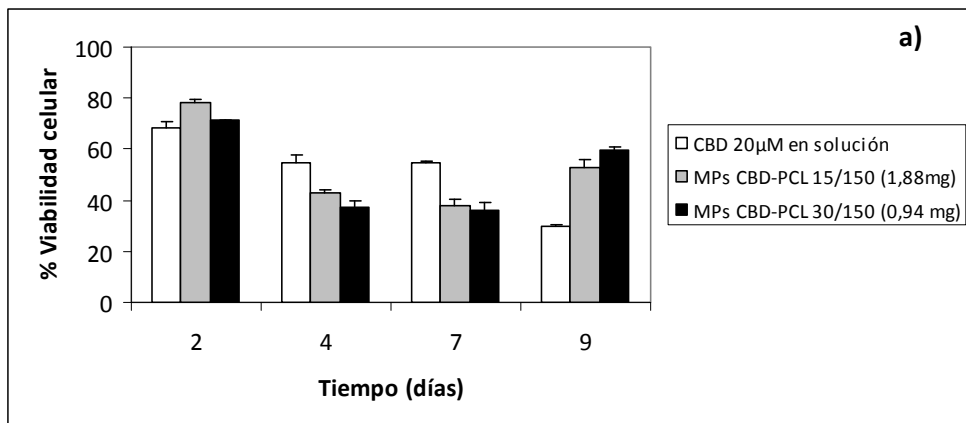


Figura 59. Efecto antitumoral del CBD en solución o incorporado en micropartículas (15/150 y 30/150) sobre células (a) MDA-MB-231 o (b) RBL-2H3 (30.000 células/pocillo). Tiempo=9 días. Ensayo del MTT.

Tal y como refleja la figura 59a, al alargar el tiempo de exposición de las células al fármaco en solución la viabilidad celular decreció. Asimismo, el fármaco microencapsulado mantuvo su actividad antitumoral –incluso superior a la del

fármaco en solución- hasta día 7 de ensayo. Sin embargo, la eficacia de las micropartículas a los 9 días fue inferior al fármaco en disolución. Esta diferencia podría ser debida a que, según los ensayos de cesión *in vitro*, durante los primeros cinco días la cantidad de fármaco liberado era mayor, y a partir del día 7 esa cantidad fue menor, obteniéndose por tanto concentraciones más bajas de fármaco en el medio.

En la figura 59b aparecen reflejados los resultados de citotoxicidad del CBD en solución o microencapsulado sobre células RBL-2H3. En este caso, el efecto citotóxico del fármaco en solución no incrementó al aumentar el tiempo de exposición de las células al mismo, tal y como cabría esperar. Esto también ocurrió en los pocillos tratados con micropartículas. Además, no se observaron grandes diferencias en la viabilidad celular entre los pocillos tratados con CBD en solución o CBD microencapsulado. De hecho, el efecto obtenido en todos los casos fue inferior al esperado, pues según Ligresti y cols. la IC_{50} del CBD sobre las células RBL-2H3 es de $6,3 \pm 1,5 \mu M$ (Ligresti *et al.*, 2006). Estas diferencias pueden ser debidas al estado de las células, el número de pase en el que se encuentren, así como al diferente origen del fármaco empleado.

Es importante resaltar, que debido a las limitaciones de los cultivos celulares no se pudo evaluar la eficacia de los sistemas a tiempos de exposición más prolongados, pues las células del control negativo y las células tratadas con placebo alcanzan un alto grado de confluencia lo que limita su viabilidad.

2.4.2 Δ^9 -tetrahidrocannabinol.

En la tabla 50 y la figura 60 se recogen los resultados sobre la viabilidad celular de las células RBL-2H3 tratadas con Δ^9 -THC en solución o microencapsulado durante 4 días.

Tabla 50. Efecto antitumoral del THC en solución o incorporado en micropartículas (15/150 y 30/150) sobre células RBL-2H3 (30.000 células/pocillo). Tiempo=4 días. Ensayo del cristal violeta.

Tratamiento	% viabilidad celular (media±SD)
THC 20 μ M	37,85±2,20
1,88 mg MPs THC 15/150	77,96±5,40
1,88 mg MPs THC 15/150+antioxidante	74,93±5,31
0,94 mg MPs THC 30/150	56,06±0,86
0,94 mg MPs THC 30/150+antioxidante	65,74±5,96

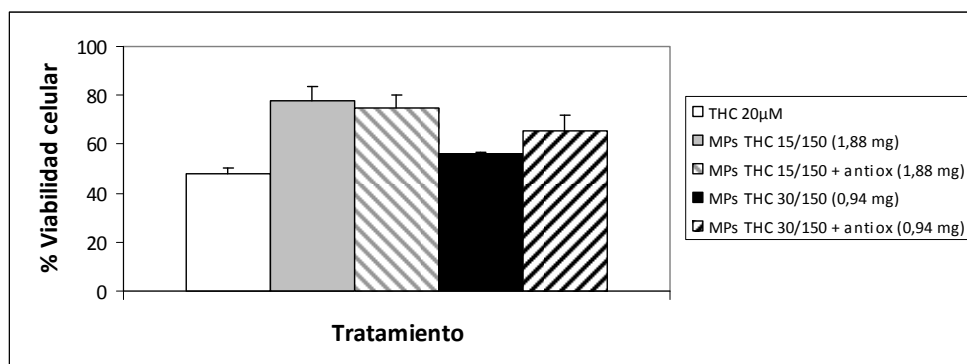


Figura 60. Viabilidad celular de células RBL-2H3 (30.000 células/pocillo) tratadas con THC en solución 20 μ M ó micropartículas de THC (con o sin 5% vitamina E acetato) durante 4 días (cristal violeta).

Todas las formulaciones mostraron un efecto antitumoral en mayor o menor intensidad. Sin embargo, el efecto citotóxico de las micropartículas fue inferior al obtenido con el fármaco en solución, pues la cantidad de micropartículas usadas en el ensayo, según los resultados de cesión *in vitro*, correspondería con una cantidad de THC liberado al día de 1,6 mg THC/100 mg microesferas, o lo que es lo mismo una concentración de alrededor de 30 μ M/pocillo, y la cantidad de THC en solución añadida diariamente fue la correspondiente a una concentración de 20 μ M/pocillo. Por tanto con el Δ^9 -THC no se observó una correlación entre la cantidad de fármaco liberada en los ensayos de cesión realizados en baño de agitación *in vitro* y la citotoxicidad sobre células, aunque, como ya se explicó con el CBD, estas diferencias podrían ser debidas a la ausencia de agitación en los cultivos celulares.

En la tabla 51 y en la figura 61 aparecen reflejados los resultados de los ensayos de citotoxicidad realizados con el THC en solución y el THC microencapsulado sobre células RBL-2H3 cuando el ensayo se prolongó hasta 9 días.

Tabla 51. Efecto antitumoral del THC en solución o incorporado en micropartículas (15/150 y 30/150) sobre células RBL-2H3 (30.000 células/pocillo). Ensayo del MTT.

Tratamiento	% viabilidad celular (media±SD)			
	día 2	día 4	día 7	día 9
THC 20 µM	41,73±2,36	39,53±0,47	28,82±0,52	36,94±0,32
1,88 mg MPs THC 15/150	50,12±2,51	38,31±0,32	56,97±0,45	62,83±1,22
1,88 mg MPs THC 15/150-5% vit E	52,99±2,32	43,49±0,09	56,36±0,53	48,98±3,21
0,94 mg MPs THC 30/150	49,70±0,21	51,94±0,03	45,30±0,68	67,01±0,56
0,94 mg MPs THC 30/150-5% vit E	59,89±0,81	51,25±0,01	54,21±0,39	64,33±0,43

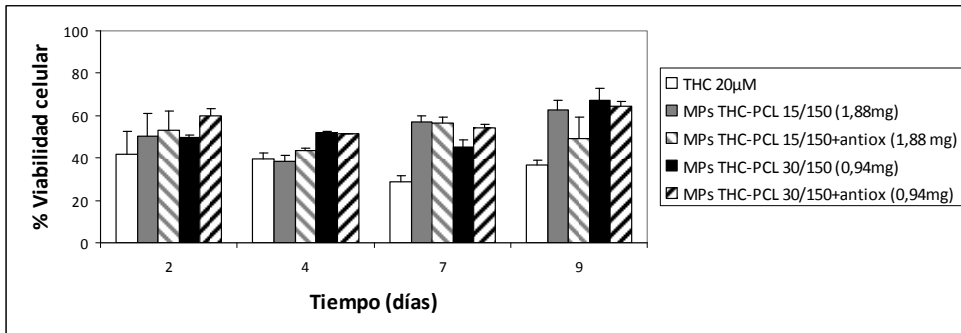


Figura 61. Viabilidad celular de células RBL-2H3 (30.000 células/pocillo) tratadas con THC en solución 20µM ó micropartículas de THC (ensayo MTT). Tiempo=9 días.

En todos los casos se observó efecto citotóxico. El efecto citotóxico del fármaco en solución se incrementó al aumentar el tiempo de exposición de las células al mismo hasta día 9 de ensayo. En el caso del THC microencapsulado, durante los 4 primeros días de ensayo el efecto observado fue similar al efecto del THC en solución. No obstante, a día 7 y a día 9 el efecto citotóxico de las micropartículas fue inferior al del THC en solución, probablemente debido a un menor porcentaje de fármaco cedido a partir de los sistemas a partir del día 5, como se observó en los ensayos de cesión realizados *in vitro* (capítulo IV).

En la tabla 52 y la figura 62 aparecen reflejados los resultados correspondientes a la exposición durante 7 días de las células Caco-2 al Δ^9 -THC en solución y a las formulaciones de micropartículas de THC desarrolladas.

Tabla 52. Efecto antitumoral del THC en solución o incorporado en micropartículas (15/150 y 30/150) sobre células Caco-2 (70.000 células/pocillo). Ensayo del MTT.

Tratamiento	% viabilidad celular (media \pm SD)		
	día 2	día 5	día 7
THC 20 μ M	42,17 \pm 0,32	53,6 \pm 0,73	38,59 \pm 0,28
1,88 mg MPs THC 15/150	43,22 \pm 0,13	56,96 \pm 0,34	67,94 \pm 0,26
1,88 mg MPs THC 15/150-5% vit E	43,19 \pm 0,41	58,91 \pm 0,23	68,17 \pm 0,29
0,94 mg MPs THC 30/150	41,01 \pm 0,25	42,61 \pm 0,23	60,16 \pm 0,34
0,94 mg MPs THC 30/150-5% vit E	40,62 \pm 0,05	45,37 \pm 0,02	66,19 \pm 0,61

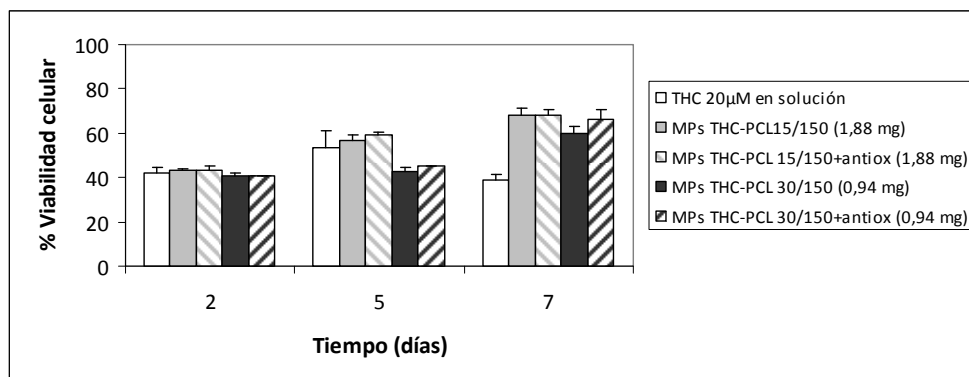


Figura 62. Viabilidad celular de células Caco-2 (70.000 células/pocillo) tratadas con THC en solución 20µM ó micropartículas de THC.

En todos los casos se observó efecto citotóxico. Así, la viabilidad celular en los pocillos tratados con THC en solución fue similar los días 2, 5 y 7. Además, la viabilidad celular en los pocillos donde se adicionaron micropartículas fue similar a la viabilidad en los pocillos donde se adicionó el fármaco en solución hasta día 5 de ensayo. No obstante, a partir del día 5 la eficacia del fármaco en solución fue superior a la observada con las micropartículas. Esto puede ser debido a que, como ya se comentó para las micropartículas de CBD, las micropartículas de THC, según los resultados de cesión *in vitro*, hasta día 5 liberan un mayor porcentaje de fármaco, y a partir de ese

día la cantidad de THC cedido/día decrece. No obstante, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la eficacia de las micropartículas como sistemas de liberación prolongada de THC, pues se mantuvo el efecto citotóxico del fármaco durante la duración del ensayo.

3 | CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un procedimiento que permite evaluar la citotoxicidad del fármaco liberado de las micropartículas, estando éstas en contacto con las células durante períodos superiores a 48h.

Los estudios realizados en cultivos celulares han confirmado:

-La biocompatibilidad de los sistemas desarrollados, pues las micropartículas placebo no afectaron a la viabilidad celular.

-La eficacia antitumoral *in vitro* del cannabidiol en solución sobre células de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Sin embargo, en nuestros estudios hemos observado una escasa actividad antitumoral del CBD sobre la línea celular RBL-2H3.

-La eficacia antitumoral del Δ^9 -tetrahidrocannabinol en solución sobre células de leucemia basófila de rata RBL-2H3 y células de cáncer colorrectal humano Caco-2.

-El efecto antitumoral prolongado durante 1 semana, de una única administración de micropartículas de CBD-PCL 15/150 y 30/150 sobre células MDA-MB-231, existiendo una correlación con los ensayos de cesión realizados *in vitro*.

-El efecto antitumoral prolongado durante 1 semana, de una única administración de micropartículas de THC-PCL 15/150 y 30/150 elaboradas con o sin vitamina E acetato al 5% sobre células RBL-2H3 y Caco-2, existiendo una correlación con los resultados de cesión realizados *in vitro*.

Se seleccionan para los estudios de eficacia *in vivo* las formulaciones de micropartículas de CBD 15/150 y las micropartículas de Δ^9 -THC 15/150-5% vitamina E acetato.

The background features three overlapping circles of varying sizes, each composed of concentric rings in shades of gray. Two thin, light gray lines intersect to form an 'X' shape across the page, with the circles positioned at the intersections and along the lines.

**VI. ESTUDIOS DE
EFICACIA *IN VIVO***
**VI. *IN VIVO* EFFICACY
STUDIES**

Dentro de los tumores cerebrales que afectan al ser humano, los gliomas son los más frecuentes (1-2 por cada 50.000 personas y año), malignos (mortalidad cercana al 100%) y de evolución más rápida (con una esperanza de vida de meses tras su diagnóstico). Los gliomas se definen como aquellos tumores que presentan evidencia histológica, inmunohistoquímica, y ultraestructural de diferenciación glial (Maher *et al.*, 2001). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los gliomas de acuerdo con el tipo específico de células con el que más se asemejan (astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias) y su grado de malignidad (de I a IV) (Kleihues *et al.*, 2002). El glioblastoma multiforme (GBM), o astrocitoma de grado IV, es el tumor cerebral primario más frecuente, y uno de los cánceres más agresivos y de peor pronóstico, siendo la supervivencia tras su diagnóstico de unos 6-12 meses, debido principalmente a su elevada invasividad y proliferación (Maher *et al.*, 2001; Massi *et al.*, 2004; Sarfaraz *et al.*, 2008; Velasco *et al.*, 2004).

Las estrategias terapéuticas actuales para el tratamiento del GBM incluyen la resección quirúrgica, la radioterapia focal, la quimioterapia y la inmunoterapia (Guzmán *et al.*, 2002; Maher *et al.*, 2001); pero el GBM presenta una alta resistencia a la quimioterapia estándar y a la radioterapia, y la característica de los gliomas de

crecimiento por infiltración difusa dificulta enormemente su resección quirúrgica, complicando el tratamiento clínico de estos pacientes (Vaccani *et al.*, 2005), por lo que en la mayoría de los casos estas estrategias son sólo paliativas.

Un largo número de agentes quimioterápicos (por ejemplo, agentes alquilantes como la temozolamida, y nitrosoureas como la carmustina) han sido evaluados, pero no se ha obtenido una mejora significativa de la supervivencia de los pacientes (Velasco *et al.*, 2007).

Como se ha comentado en la introducción, en los últimos años se ha demostrado el potencial antitumoral de los cannabinoides (Alexander *et al.*, 2009; Guzmán, 2003; Ligresti *et al.*, 2006; Massi *et al.*, 2004; Parolaro *et al.*, 2008; Velasco *et al.*, 2007). Los cannabinoides parecen ser compuestos antitumorales selectivos, puesto que son capaces de matar las células cancerígenas, pero no las células sanas (Guzmán, 2003). Hoy se sabe que los cannabinoides pueden ejercer su acción antitumoral a través de varios mecanismos tal y como queda reflejado en la figura 63. Así, estos compuestos pueden actuar directamente sobre las células tumorales inhibiendo su proliferación (es decir, impidiendo que se dividan) o induciendo su muerte por un mecanismo de apoptosis o muerte celular programada. Además, los cannabinoides pueden afectar a otros parámetros de la progresión tumoral como son la angiogénesis y la metástasis, reduciendo, por tanto, la progresión del tumor (Freimuth *et al.*, 2009; Guzmán, 2005). Debido a que las células de glioma siguen un patrón de crecimiento característico invadiendo estructuras cerebrales adyacentes y rodeando vasos sanguíneos, la inhibición de la migración celular es un paso importante en la mejora del pronóstico de los pacientes con GBM.

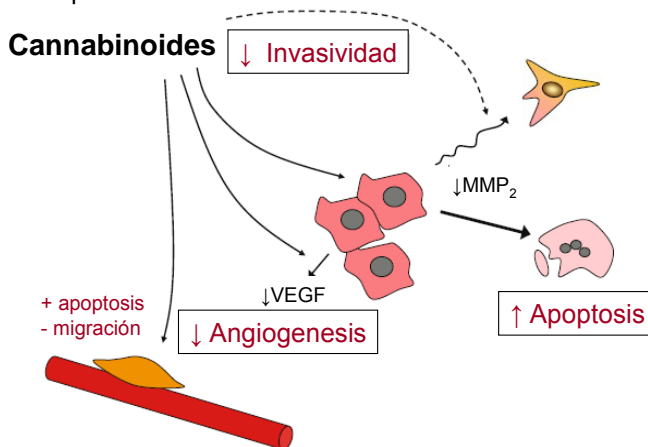


Figura 63. Efecto antitumoral de los cannabinoides sobre gliomas (Velasco *et al.*, 2007).

En efecto, la significativa actividad antiproliferativa de los cannabinoides en modelos animales de glioma, junto con su baja toxicidad, en comparación con otros agentes quimioterápicos, convierte a estos compuestos en ingredientes candidatos en cocktails antitumorales para el tratamiento del GBM (Velasco *et al.*, 2007). Además, existen evidencias de que la expresión de receptores cannabinoides es superior en algunas células humanas de cáncer (Pertwee, 2009).

Como la regresión tumoral en modelos experimentales representa un avance importante con relevancia en la clínica, se decidió evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de los sistemas desarrollados en la presente tesis doctoral. Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo de los Dres. Manuel Guzmán y Guillermo Velasco del Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología, UCM. Este grupo de investigación ya había demostrado la eficacia antitumoral del Δ^9 -tetrahidrocannabinol sobre gliomas en ratas y ratones (Galve-Roperh *et al.*, 2000) e incluso había llevado a cabo un ensayo clínico de fase I/II en pacientes con GBM (Guzmán *et al.*, 2006). Sin embargo, no habían obtenido resultados concluyentes con cannabidiol. Debido a que nosotros en cultivos celulares sí habíamos observado un efecto antitumoral del CBD en solución y de las micropartículas de CBD sobre diferentes líneas celulares (capítulo V) y a que otros autores sí habían observado un efecto antiproliferativo del CBD sobre células humanas de glioma (Iuvone *et al.*, 2009; Massi *et al.*, 2004; Massi *et al.*, 2008; Vaccani *et al.*, 2005) se decidió evaluar la eficacia *in vivo* tanto de las micropartículas de CBD como de las micropartículas de Δ^9 -THC desarrolladas.

Así, los objetivos de dichos estudios de eficacia *in vivo* fueron:

- I. Evaluar la eficacia antitumoral del cannabidiol en solución y la formulación de micropartículas de CBD-PCL 15/150.
- II. Corroborar que el Δ^9 -tetrahidrocannabinol con el que trabajamos mostraba eficacia *in vivo*, y evaluar la eficacia de la formulación de micropartículas de THC-PCL 15/150-5% vitamina E acetato.
- III. Evaluar si una mezcla de CBD y Δ^9 -THC al 50% ejercía un efecto aditivo o sinérgico respecto a la utilización de un solo cannabinoide, pues según las últimas investigaciones en este campo ambos cannabinoides parecen tener un mecanismo de acción diferente. Además, hoy en día se sabe que el CBD

es capaz de antagonizar algunos de los efectos secundarios producidos por el THC –efectos psíquicos, taquicardia, sedación-, a la vez que potencia algunos de sus efectos terapéuticos–analgésico, antiemético,...-(Russo *et al.*, 2006; Varvel *et al.*, 2006).

Existe un preparado comercial, Sativex® (GW Pharmaceuticals Ltd., UK), que contiene ambos cannabinoides, que actualmente está aprobado para el tratamiento del dolor oncológico y del dolor neuropático en pacientes con esclerosis múltiple, y que se encuentra pendiente de aprobación para el tratamiento de la espasticidad en esclerosis múltiple. Sativex® es un extracto líquido de cannabis para administración como aerosol sublingual que contiene principalmente Δ^9 -THC y CBD (derivados de la planta) en proporción 2,7:2,5 respectivamente.

Así, se evaluó la eficacia antitumoral de:

- una mezcla de CBD y Δ^9 -THC al 50% en solución, y
- una mezcla al 50% de las micropartículas de CBD-PCL 15/150 y las micropartículas THC-PCL 15/150-5% vitamina E acetato desarrolladas.

1 | MATERIALES Y MÉTODOS

Se procedió a evaluar la eficacia antitumoral del cannabinoide en solución (CBD, Δ^9 -THC y la mezcla de ambos al 50%) y de las formulaciones de micropartículas (CBD-PCL 15/150, THC-PCL 15/150-5% vitamina E acetato y una mezcla de ambas al 50%) en un modelo xenográfico de glioma humano inducido en ratones.

Estos experimentos fueron realizados en el Animalario de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Generación de los tumores

Se trabajó con ratones macho inmunodeficientes (Harlan®) de 8 semanas.

Los tumores fueron generados a partir de células de glioblastoma humano U-87 MG (Human glioblastoma-astrocytoma, epithelial-like cell line). Éstas fueron cultivadas en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% FCS.

Una vez amplificadas las células, los tumores fueron inducidos mediante la inoculación subcutánea en el costado derecho de cada ratón de 5×10^6 células suspendidas en 100 μ L de PBS suplementado con glucosa al 0,1%.

Las dimensiones de los tumores fueron monitorizadas diariamente con un pie de rey electrónico, y el volumen de los tumores se calculó mediante la fórmula del volumen de una elipse:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = 4\pi/3 \times (\text{longitud}/2) \times (\text{anchura}/2)^2 \quad (\text{Ec. 18})$$

Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de unos 200 mm^3 , aproximadamente a las dos semanas de la inoculación, los ratones fueron asignados aleatoriamente a los diferentes grupos de tratamiento.

Tratamiento

Los diferentes tratamientos ensayados fueron:

- ◆ **Grupo 1:** Vehículo.
100 μ L de una mezcla de DMSO al 0,025% en PBS pH 7,4-BSA 0,5%.
- ◆ **Grupo 2:** CBD en solución.
0,5 mg de CBD disueltos en 100 μ L de una mezcla de DMSO al 0,025% en PBS pH 7,4-BSA 0,5%.
- ◆ **Grupo 3:** Δ^9 -THC en solución.
0,5 mg de Δ^9 -THC disueltos en 100 μ L de una mezcla de DMSO al 0,025% en PBS pH 7,4-BSA 0,5%.
- ◆ **Grupo 4:** mezcla de CBD y Δ^9 -THC al 50% en solución.
Se prepara una mezcla de 0,25 mg de CBD y 0,25 mg de Δ^9 -THC disueltos en 100 μ L de una mezcla de DMSO al 0,025% en PBS pH 7,4-BSA 0,5%.

- ◆ **Grupo 5:** Micropartículas blancas.
75 mg de micropartículas de poli-ε-caprolactona placebo resuspendidas en 400 µL de PBS pH 7,4-Pluronic F68 al 1%.
- ◆ **Grupo 6:** Micropartículas de CBD.
75 mg de micropartículas de CBD-PCL 15/150 resuspendidas en 400 µL de PBS pH 7,4-Pluronic F68 al 1%. Equivale a una dosis de 6 mg de CBD.
- ◆ **Grupo 7:** Micropartículas de Δ^9 -THC.
75 mg de micropartículas de THC-PCL 15/150-5% vitamina E acetato resuspendidas en 400 µL de PBS pH 7,4-Pluronic F68 al 1%. Equivale a una dosis de 6 mg de Δ^9 -THC.
- ◆ **Grupo 8:** Mezcla de micropartículas de CBD y micropartículas de Δ^9 -THC.
75 mg de una mezcla al 50% de micropartículas de CBD-PCL 15/150 y micropartículas de THC-PCL 15/150-5% vitamina E acetato resuspendidas en 400 µL de PBS pH 7,4-Pluronic F68 al 1%. Equivale a una dosis de 3 mg de CBD y 3 mg de Δ^9 -THC.

La cantidad de micropartículas a administrar se determinó basándonos en los resultados de cesión obtenidos *in vitro*. Según dichos estudios la cantidad de cannabinoide liberado al día, a partir de 75 mg de micropartículas, oscilaría entre 500 y 750 µg (siendo la cantidad liberada mayor durante los primeros días de ensayo). De acuerdo con estos cálculos, la cantidad de cannabinoide que se liberaría a partir de los sistemas sería ligeramente superior a la cantidad de fármaco administrada en solución, pero se seleccionó dicha dosis de micropartículas con el fin de contrarrestar posibles pérdidas de micropartículas durante su administración, ya que parte de las mismas se quedan en el eppendorf donde se prepara la suspensión y otra pequeña fracción en la aguja con la que se administran, por lo que se partió de una cantidad ligeramente superior a la dosis empleada en solución.

El tratamiento se administró mediante inyección subcutánea en la zona peritumoral, diariamente en el caso del fármaco en solución o su vehículo (grupos 1-4); o una vez cada 5 días (días 1, 6, 11 y 17) en los ratones tratados con micropartículas (grupos 5-7), controlándose el volumen de los tumores diariamente.

La duración del tratamiento fue de 21 días, durante los cuales se monitorizó el estado de salud de los ratones.

Evaluación de los resultados

Diariamente se monitorizó el crecimiento de los tumores.

Una vez finalizado el tratamiento (día 22), los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajeron los tumores, se pesaron y se midió su volumen. Se compararon estadísticamente los resultados obtenidos con los distintos tratamientos.

En el grupo de ratones tratados con micropartículas se recolectaron las mismas del lugar de administración, donde permanecen como sistema *depot*, con el fin de evaluar su morfología mediante microscopía electrónica de barrido y cuantificar su contenido remanente de cannabinoide.

Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Experimentación animal de la Universidad Complutense de acuerdo a la legislación española.

2

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Con el fin de evaluar la eficacia *in vivo* de los diferentes tratamientos, se monitorizó el volumen de los gliomas a lo largo del ensayo.

Tal y como refleja la figura 64, no se observaron diferencias en cuanto a la evolución del crecimiento de los tumores entre el grupo de ratones tratado con vehículo en solución (grupo 1) y el grupo tratado con micropartículas placebo (grupo 5), por ello, para simplificar las gráficas se representarán estos datos de manera conjunta.

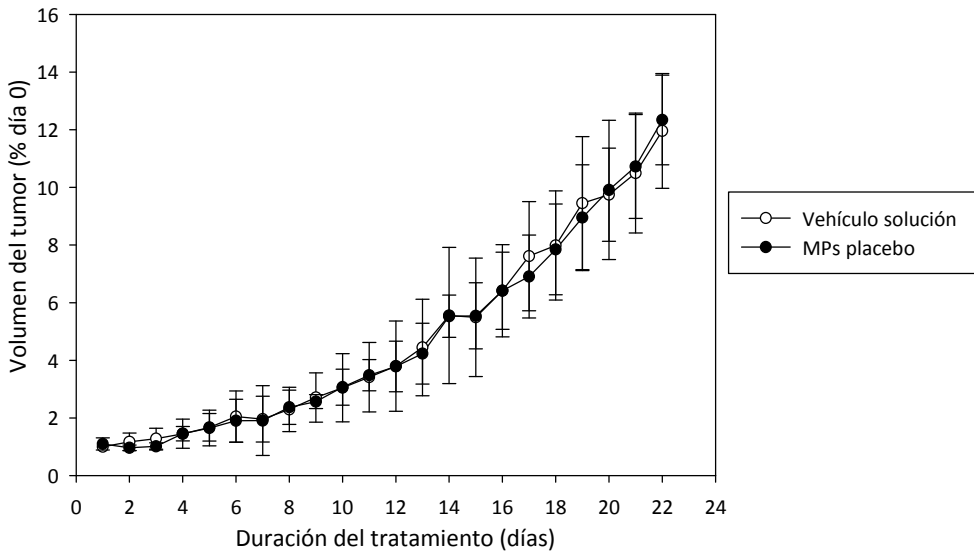


Figura 64. Evolución del crecimiento tumoral en los grupos tratados con vehículo en solución o micropartículas placebo.

La figura 65 refleja de manera global la evolución del volumen de los gliomas en todos los grupos. En ella se puede apreciar como existió una clara diferencia en el tamaño de los gliomas al finalizar el tratamiento entre los grupos tratados con vehículo y aquellos tratados con cannabinoides (en solución o encapsulado en micropartículas). En efecto, se observó una clara disminución del crecimiento de los gliomas en los ratones tratados con cannabinoides a partir del día 14 de tratamiento.

Debido a que se emplearon ratones inmunodeprimidos, estos resultados confirman que la acción antiproliferativa de los cannabinoides se ejerce directamente sobre las células tumorales, tal y como había descrito el grupo del Dr. Guzmán (Galve-Roperh *et al.*, 2000), y no es debida a un efecto indirecto mediado por una respuesta inmune.

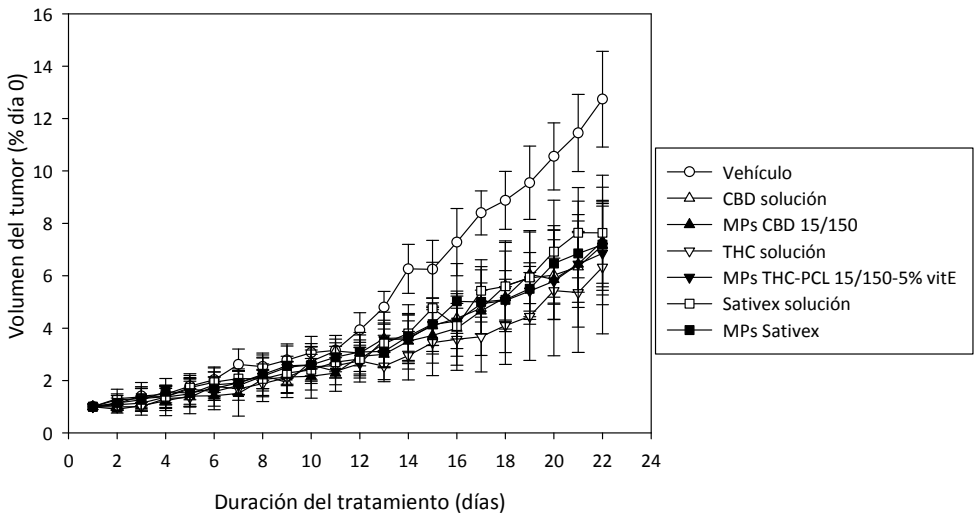


Figura 65. Evolución del crecimiento de los tumores en todos los grupos tratados.

2.1. Eficacia de los fármacos en disolución.

La gráfica 66 muestra los resultados obtenidos con los fármacos en solución. En ella podemos apreciar como el CBD, el THC y la mezcla CBD-THC al 50% fueron capaces de disminuir el crecimiento tumoral a partir del día 14 de inicio del tratamiento.

No obstante, el THC parece tener un efecto ligeramente superior al CBD. Esta diferencia también ha sido observada por otros autores en estudios en cultivos celulares, estimando que la IC_{50} del THC y del CBD sobre esta línea celular es de 3-4 μM y 25 μM , respectivamente (Massi *et al.*, 2004). De hecho, generalmente los cannabinoides no psicoactivos se emplean *in vitro* e *in vivo* a concentraciones más elevadas para obtener efectos farmacológicos (Malfait *et al.*, 2000), probablemente debido a la escasa afinidad de estos compuestos por los receptores CB_1 y CB_2 (Bisogno *et al.*, 2001; Massi *et al.*, 2004).

Por otro lado, la mezcla de CBD y THC, parece tener una eficacia ligeramente inferior al THC solo, por lo que a la vista de estos resultados, en este modelo no parece existir un efecto sinérgico de ambos cannabinoides.

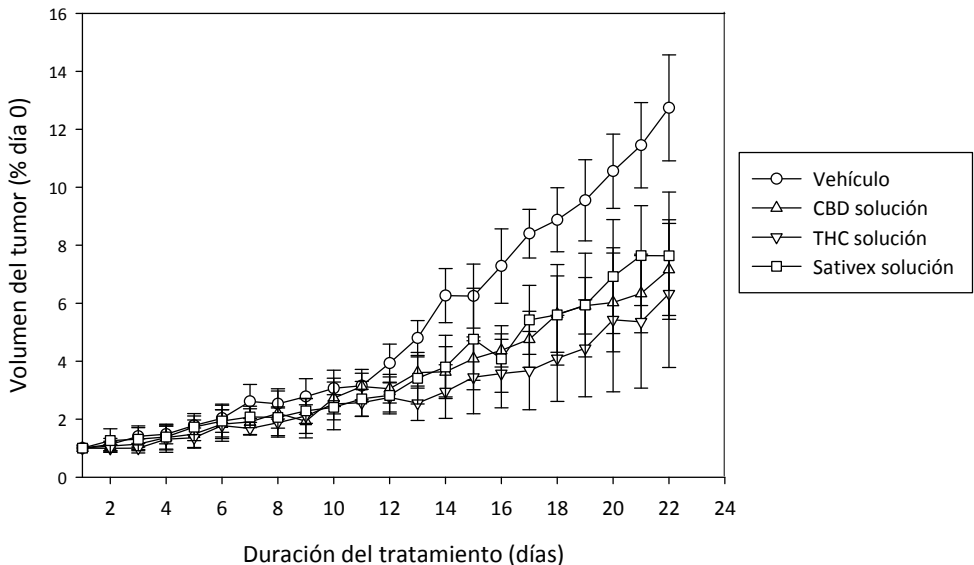


Figura 66. Evolución del crecimiento de los tumores en los grupos tratados con fármaco en solución.

2.2. Eficacia de los fármacos formulados en micropartículas.

En la gráfica 67 aparecen los resultados obtenidos con los cannabinoides microencapsulados. En este caso, al igual que con los cannabinoides en solución, se observó una reducción de la masa tumoral a partir de día 14 de ensayo; pero no se apreciaron diferencias en cuanto a la eficacia entre las diferentes formulaciones de micropartículas. En efecto, tanto las micropartículas de CBD como las micropartículas de THC, así como su mezcla al 50%, mostraron el mismo efecto en la inhibición del crecimiento tumoral.

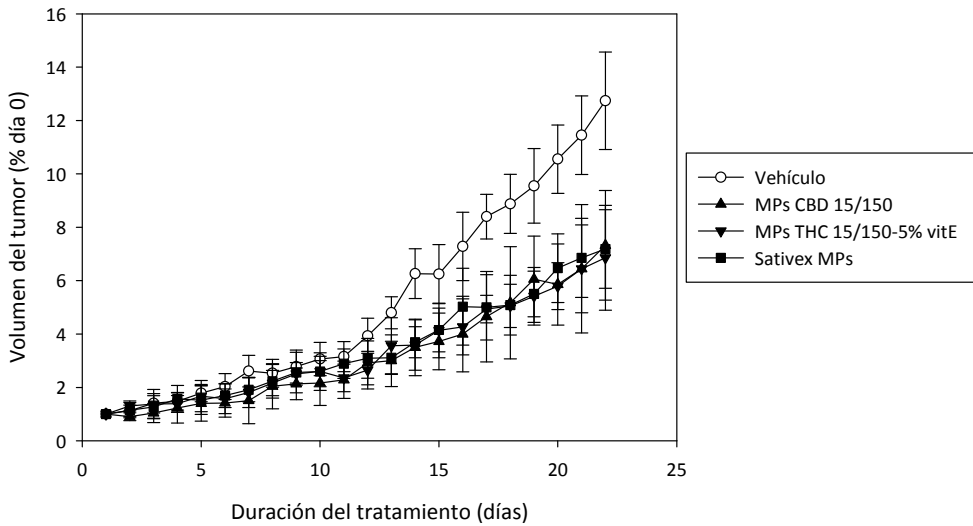


Figura 67. Evolución del crecimiento de los tumores en los grupos tratados con fármaco microencapsulado.

2.3. Eficacia del CBD en disolución *versus* las micropartículas de CBD.

La gráfica 68 compara la eficacia *in vivo* del CBD en solución frente al CBD microencapsulado. A la vista de los resultados obtenidos, y tal y como se ha comentado anteriormente, el CBD fue capaz de disminuir el tamaño de los gliomas a partir de día 14 de tratamiento. Además, esta gráfica muestra que la eficacia del fármaco en solución -administrado diariamente- o formulado en micropartículas - administradas cada cinco días- fue similar.

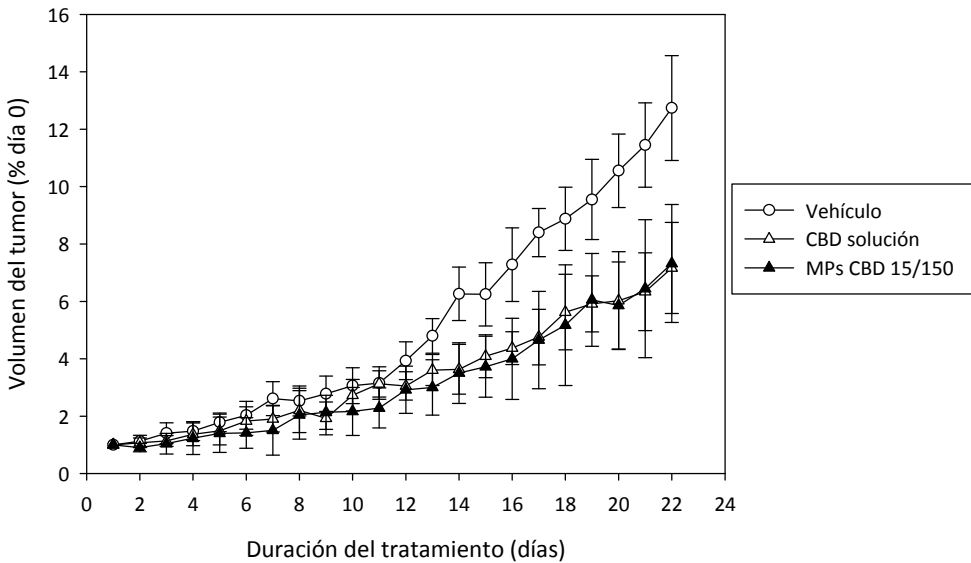


Figura 68. Evolución del crecimiento de los tumores en los grupos tratados con cannabidiol (solución o microencapsulado).

2.4. Eficacia del Δ^9 -THC en disolución *versus* las micropartículas de Δ^9 -THC.

La gráfica 69 muestra la evolución del crecimiento tumoral en los ratones tratados con Δ^9 -THC en solución o microencapsulado. Tal y como sucede con el CBD, ambas formulaciones presentaron una eficacia similar en este modelo. Esto es, la eficacia del Δ^9 -THC en solución –administrado diariamente- fue similar a la eficacia del Δ^9 -THC microencapsulado –administrado cada 5 días-.

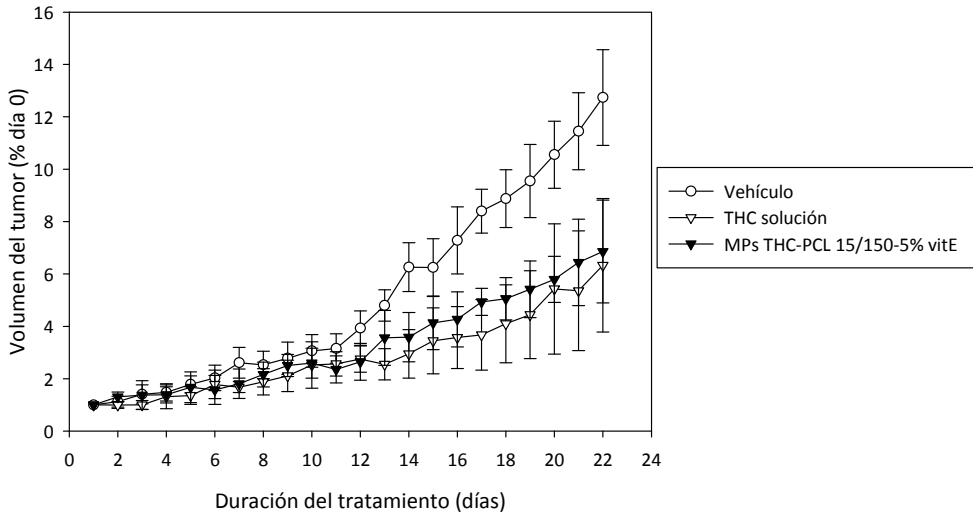


Figura 69. Evolución del crecimiento de los tumores en los grupos tratados con Δ^9 -tetrahidrocannabinol (solución o microencapsulado).

2.5. Eficacia de la mezcla de CBD y Δ^9 -THC en disolución *versus* la mezcla de micropartículas de CBD y de Δ^9 -THC.

En la gráfica 70 aparecen recogidos los resultados obtenidos al emplear la combinación de CBD y Δ^9 -THC, formulados en solución y en micropartículas. Tal y como sucedió con el CBD y con el Δ^9 -THC por separado, ambas formulaciones presentaron una eficacia similar.

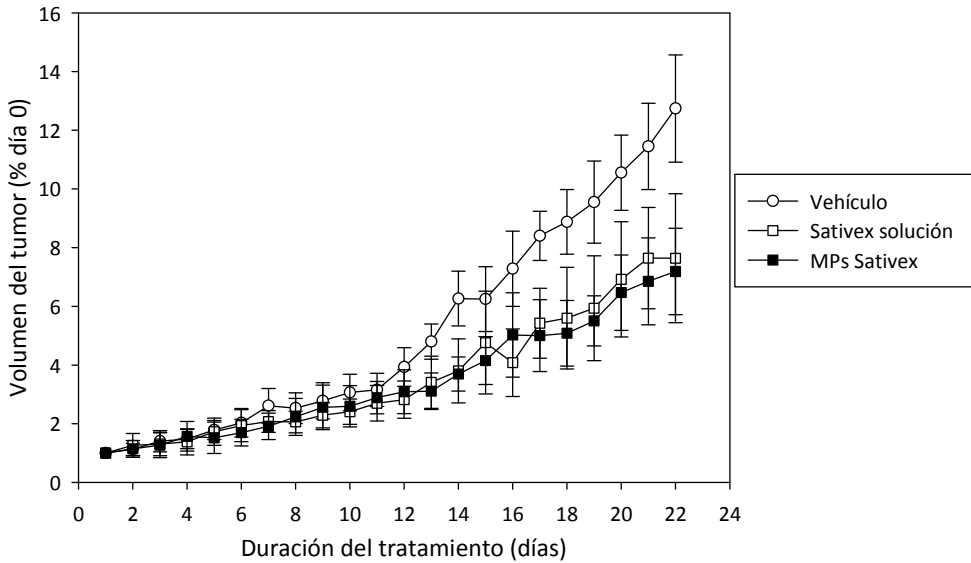


Figura 70. Evolución del crecimiento de los tumores en los grupos tratados con Sativex® (solución o microencapsulado).

2.6. Evaluación de los tratamientos al finalizar el estudio.

El último día del ensayo se sacrificaron los ratones, se extrajeron los gliomas, se fotografiaron, se midieron para calcular su volumen y se pesaron. En la tabla 53 aparecen recogidos los incrementos de volumen de los tumores correspondientes a cada grupo al finalizar el tratamiento, y en la tabla 55 sus pesos.

Tabla 53. Volúmenes de los tumores al finalizar el tratamiento (día 22).

Tratamiento	Volumen medio del tumor día 22 (% día 0) (media±SD)
<i>Vehículo</i>	12,739±1,855
<i>CBD solución</i>	7,166±1,589
<i>THC solución</i>	6,331±2,548
<i>Sativex solución</i>	7,639±2,197
<i>MPs CBD</i>	7,324±2,054
<i>MPs THC</i>	6,858±1,963
<i>MPs Sativex</i>	7,187±1,472

El análisis estadístico de los resultados de volumen de los tumores aparece recogido en la tabla 54. Al no ajustarse todos los datos a una distribución normal se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para comparar los resultados.

Tabla 54. Análisis estadístico de los volúmenes del tumor al finalizar el tratamiento. (Test de Mann-Whitney). *p-valor<0,05: diferencia estadísticamente significativa.

Tratamiento	Vehículo	CBD solución	THC solución	Sativex solución
<i>CBD solución</i>	W=1,0 p=0,008*	--	W=13,0 p=0,471	W=21,0 p=0,688
<i>THC solución</i>	W=1,0 p=0,008*	--	--	W=24,0 p=0,378
<i>Sativex solución</i>	W=2,0 p=0,013*	--	--	--
<i>MPs CBD</i>	W=3,0 p=0,008*	W=24,0 p=0,948	--	--
<i>MPs THC</i>	W=1,0 p=0,008*	--	W=24,0 p=0,948	--
<i>MPs Sativex</i>	W=1,0 p=0,005*	--	--	W=18,0 p=0,720

Se observó una diferencia estadísticamente significativa (p -valor $<0,05$) entre los grupos tratados con cannabinoides (en solución o microencapsulados) y el grupo control (vehículo en solución o micropartículas placebo), lo cual confirma el potencial antitumoral de estos compuestos. Además no se observaron diferencias entre los grupos tratados con CBD, THC o su mezcla en solución. Tampoco existieron diferencias entre los grupos tratados con el cannabinoide en solución o ese mismo cannabinoide formulado en micropartículas.

En la figura 71 aparecen representados gráficamente los pesos de los tumores extraídos de cada ratón. En todos los grupos tratados con cannabinoide el peso de los tumores tras 21 días de tratamiento fue inferior al peso de los gliomas en los grupos control.

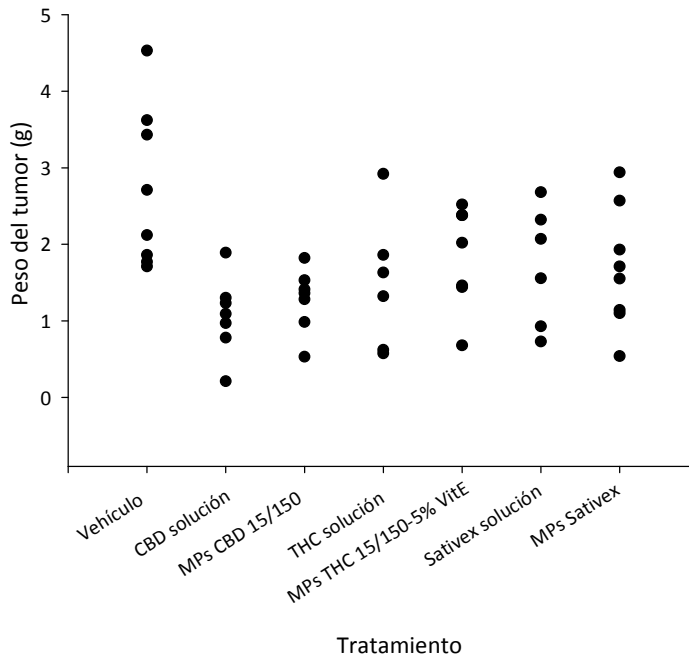


Figura 71. Peso de los tumores tras el sacrificio de los ratones.

Tras comprobar que los valores de peso se ajustaban a una distribución normal en todos los grupos (valores de simetría y curtosis entre -2 y +2), se realizó un Test de Rangos Múltiples para comparar los distintos tratamientos. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la tabla 55.

Tabla 55. Pesos de los tumores al finalizar el tratamiento (día 22) y Test de Rangos Múltiples.

Tratamiento	Media±SD	Grupos homogéneos
<i>Vehículo</i>	2,718±0,855	X
<i>CBD solución</i>	1,066±0,355	X
<i>THC solución</i>	1,487±0,649	X
<i>Sativex solución</i>	1,714±0,642	X
<i>MPs CBD</i>	1,273±0,294	X
<i>MPs THC</i>	1,84±0,554	X
<i>MPs Sativex</i>	1,684±0,602	X

Al igual que ocurría con los volúmenes de los tumores, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con vehículo y los tratados con cannabinoides. Asimismo, no se observaron diferencias en cuanto al peso del tumor una vez finalizado el tratamiento con el cannabinoide en solución o el cannabinoide microencapsulado, y tampoco se observaron diferencias entre los diferentes cannabinoides (CBD, Δ^9 -THC o su mezcla al 50%).

En la figura 72 aparecen recogidas, a modo de ejemplo, fotografías de los tumores extraídos de cada uno de los grupos tratados. La administración de cannabidiol, Δ^9 -tetrahidrocannabinol, o su combinación, tanto en solución como formulados en micropartículas, fueron capaces de inhibir el crecimiento tumoral y, por tanto, el tamaño de los tumores extraídos fue considerablemente menor en los grupos tratados con cannabinoides respecto a los grupos tratados con vehículo en solución o micropartículas placebo.

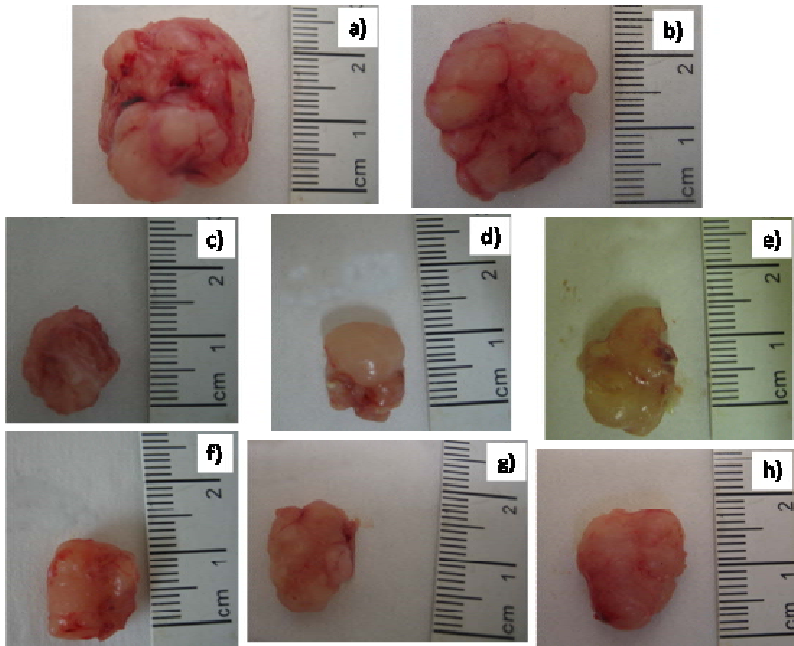


Figura 72. Fotografías de los gliomas una vez extraídos correspondientes a los diferentes grupos de tratamiento: a) vehículo en solución, b) micropartículas placebo, c) CBD en solución, d) Δ^9 -THC en solución, e) Sativex en solución, f) MPs CBD, g) MPs Δ^9 -THC y h) MPs CBD y MPs Δ^9 -THC.

Por tanto, podemos concluir que en todos los casos la administración del cannabinoide (CBD, Δ^9 -THC o su mezcla) disminuyó el tamaño de los gliomas a partir de la segunda semana de tratamiento, no existiendo diferencias de eficacia entre la administración diaria del fármaco en solución o la administración cada 5 días del cannabinoide encapsulado.

Finalmente, tras el sacrificio de los ratones se extrajeron muestras de las micropartículas remanentes en el lugar de administración para evaluar los cambios producidos en su morfología y cuantificar el cannabinoide remanente en las mismas.

En la figura 73 pueden compararse las diferencias morfológicas entre las micropartículas recién preparadas, la misma formulación de micropartículas tras los ensayos de cesión *in vitro*, y las micropartículas recogidas de los ratones tras su sacrificio.

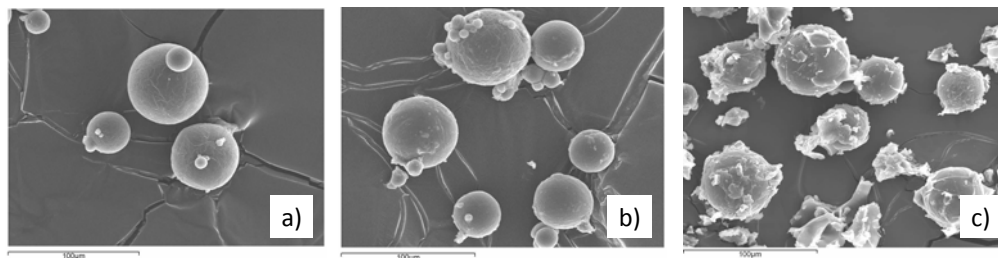


Figura 73. Fotografía (SEM) de las micropartículas de THC-PCL 15/150 5% vitamina E acetato (a) recién preparadas (b) tras el ensayo de cesión *in vitro* (t=15 días), (c) finalizado el experimento *in vivo*.

Como puede observarse, las micropartículas recién preparadas presentaron una superficie lisa, y tras los 15 días de duración de los ensayos de cesión *in vitro* la erosión de las micropartículas fue muy leve. Sin embargo, las microesferas que habían sido administradas *in vivo* presentaron una superficie rugosa y, algunas de ellas, presumiblemente aquellas administradas al inicio del tratamiento, aparecieron completamente erosionadas debido a la hidrólisis química del polímero. De hecho, como ya se ha comentado en la introducción, la poli- ϵ -caprolactona (PCL) es un polímero bioerosionable y biocompatible, estable *in vitro*, aprobado por la FDA, ampliamente utilizado en tecnología farmacéutica (Chen *et al.*, 2000; Grignard *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Probablemente *in vivo* la presencia de enzimas –esterasas– puede acelerar el proceso de degradación de la PCL, tal y como han descrito otros autores (Blanco *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2000; Darwis *et al.*, 1998; Hombreiro Pérez *et al.*, 2000; Persenaire *et al.*, 2001; Wnek *et al.*, 2004), de ahí las diferencias observadas en este estudio en cuanto a la erosión de las micropartículas *in vitro* e *in vivo* (figura 73 b-c). De hecho, se ha visto que, por ejemplo, tras la implantación del copolímero de policaprolactona-poli(etilenglicol) en el dorso o en el intestino delgado de ratas la degradación del polímero fue más rápida que la observada *in vitro* en presencia de lipasas, atribuyéndose esa diferencia a las condiciones fisiológicas de la muestra implantada en los animales (Blanco *et al.*, 2003).

Por último, se evaluó por HPLC el contenido remanente de CBD y de Δ^9 -THC en las micropartículas extraídas del lugar de administración.

Tabla 56. Contenido de cannabinoide de las micropartículas antes y después de su administración *in vivo*.

Formulación	t=0	t=22 días
<i>MPs CBD-PCL 15/150</i>	8,93±0,13 mg/100 mg MPs	5,3±0,22 mg/100 mg MPs
<i>MPs THC-PCL 15/150-5% vitamina E acetato</i>	8,21±0,07 mg/100 mg MPs	4,73±0,13 mg/100 mg MPs

Según aparece reflejado en la tabla 56, el contenido de CBD de las microesferas administradas fue de unos 9 mg/100 mg micropartículas, y el contenido medio de CBD en las micropartículas recogidas tras el ensayo fue 5 mg/100 mg micropartículas. En el caso de las micropartículas de THC el contenido inicial de las mismas fue de 8 mg/100 mg micropartículas y en las micropartículas extraídas de los ratones el contenido remanente fue de 5 mg/100 mg micropartículas. Es importante destacar que, al ser la poli-ε-caprolactona un polímero biodegradable (figura 73), no es posible comparar exactamente la cantidad de principio activo en las microesferas antes y después del ensayo, pues la relación p.a./polímero en las micropartículas una vez finalizado el ensayo también cambia debido a la bioerosión del polímero. Sin embargo, viendo estos resultados, sí podemos afirmar que quedó en el lugar de administración una cantidad de cannabinoide no liberada. Este resultado sugiere que en futuros ensayos se podría incrementar el intervalo posológico de las micropartículas a una semana o incluso diez días.

3

CONCLUSIONES

Ha quedado demostrado que las micropartículas placebo no producen ningún efecto sobre el crecimiento de los tumores de glioma humano utilizados.

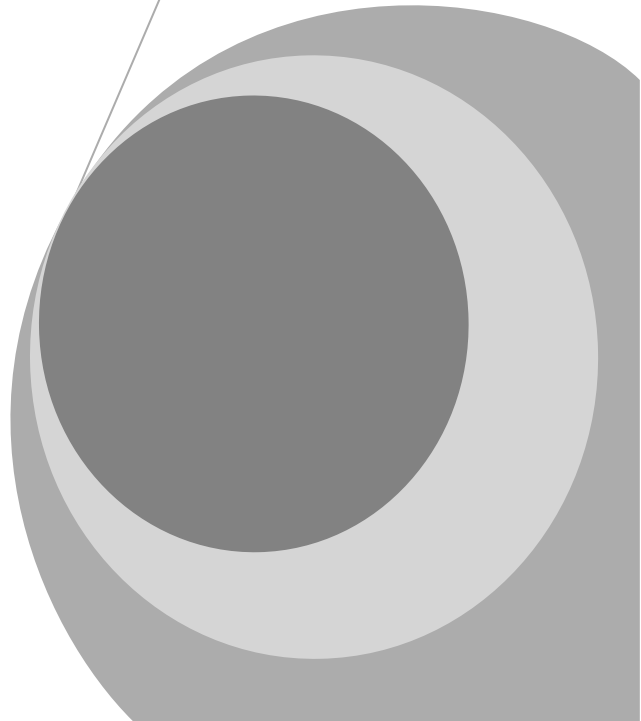
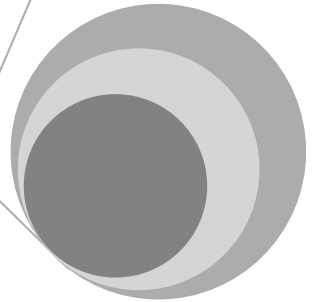
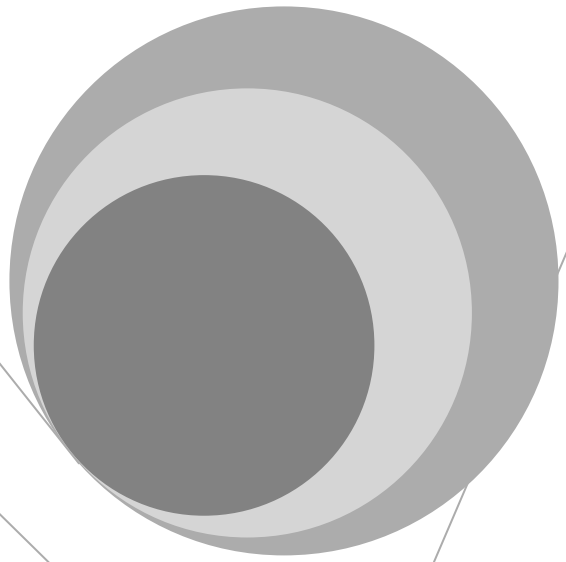
Con todos los tratamientos se ha observado un claro efecto antitumoral a partir del día 14 de ensayo.

En este estudio se ha comprobado la eficacia antitumoral no sólo del Δ^9 -THC en solución sino también del CBD en solución y de su mezcla al 50%. No se han observado diferencias en el efecto antitumoral del Δ^9 -THC y del CBD a las dosis

empleadas, ni en disolución ni encapsulados en micropartículas. Asimismo, en nuestro estudio tampoco se ha visto un efecto sinérgico entre ambos cannabinoides, ni en solución, ni formulados en micropartículas.

Los resultados obtenidos demuestran la eficacia antitumoral de las micropartículas de CBD y Δ^9 -THC desarrolladas, siendo capaces de enlentecer el crecimiento de los gliomas en el modelo animal propuesto. El hecho de que las micropartículas fueran administradas cada cinco días, confirma la utilidad terapéutica de las mismas como sistemas de liberación prolongada de CBD y Δ^9 -THC. La presencia de principio activo remanente en las micropartículas tras finalizar el ensayo, sugiere que en futuros ensayos se podría incrementar el intervalo de administración de las micropartículas a 1 semana o incluso 10 días.

VII. SUMMARY



CHAPTER III. ANALYTICAL METHOD VALIDATION.

1. OBJECTIVE.

Although numerous analytical methods have been reported for the quantification of cannabinoids in plant material or biological samples, most of these methods require the use of sophisticated instrumentations such as gas chromatography/mass spectrometry or, more recently, high-performance liquid chromatography/mass spectrometry.

Therefore, the purpose of the present work was to develop and validate a simple, rapid and sensitive RP-HPLC method for the characterization of CBD and THC-loaded polymeric microparticles. This method will be used to quantify the microencapsulated cannabinoid in order to determine the microspheres drug loading and the remaining drug in the microparticles after the *in vitro* drug release tests and the *in vivo* efficacy studies. Moreover, it will be employed to quantify the released cannabinoid from the polymeric systems during the *in vitro* release studies.

2. MATERIALS AND METHODS.

2.1. Chemicals and reagents.

Methanol (LC grade) and acetonitrile (LC grade) were obtained from Lab-Scan (Dublin, Ireland). Chromatographic-grade water was produced by a Milli-Q system (Millipore, Barcelona, Spain).

Cannabidiol (CBD) and Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) were purchased from THC Pharm GmbH (Frankfurt, Germany); Poly- ϵ -caprolactone (Mw 42,500) and polyvinyl alcohol were obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Dichloromethane was obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. Instrumentation and Chromatographic Conditions.

Analyses were performed using an HP1050 Liquid Chromatograph (Hewlett Packard) equipped with a quaternary pump, a manual injector fitted with a 20 μ L sample loop, and a UV-Vis detector. The data were acquired using Agilent Chemstation software (version B.03.01).

The chromatographic conditions were chosen based on the analytical procedure described by Munjal (Munjal *et al.*, 2006a). The stationary phase was a Mediterranea®-Sea C18 (150 x 4.6 mm i.d., 5 μ m) column (Teknokroma, Barcelona, Spain). The mobile phase was a methanol-acetonitrile-water mixture (52:30:18) adjusted to pH 4.5 with acetic acid. Before use, it was filtered through a

Millipore® membrane filter (47mm membrane, 0.45µm pore size, nylon) and degassed by an ultrasonic bath. All separations were performed isocratically at a flow rate of 1.8 mL/min, and column was maintained at room temperature. The injection volume was 20 µL and the detection wavelength was set at 228 nm. The overall chromatographic run time for an assay was approximately 15 min.

2.3. Preparation of Calibration Standards.

In order to prepare a stock standard solution of CBD or Δ⁹-THC, 10 mg of cannabinoid were dissolved in 10 mL methanol and were stored at -20°C.

Working standard solutions (ranging from 0.7 to 15 µg/mL) were freshly prepared every day by diluting the stock solutions with the mobile phase.

Samples preparation.

In order to quantify the encapsulated cannabinoid 1 mL of dichloromethane was added to 10 mg of cannabinoid-loaded microparticles to dissolve the polymer. Subsequently, after vortexing for 2 min, 9 mL of mobile phase were added while the mixture was vortex-mixed for another 2 min. Then, the mixture was further diluted with the mobile phase to the suitable concentration, and filtered through 0.45 µm PTFE filters prior to injection onto the LC apparatus.

2.4. Method Validation.

The method was validated in terms of specificity, linearity, limit of quantitation (LOQ), precision (repeatability and intermediate precision), and accuracy according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines for validation of analytical procedures (*ICH Q2 (R1)*).

2.4.1. Specificity.

Specificity is the ability of the method to assess unequivocally the analyte in the presence of components which may be expected to be present. Typically these might include impurities, degradation products, matrix components, etc.

In order to determine the capacity of the analytical method to identify interferences coming from cannabinoid degradation products standard solutions of cannabinoid were subjected to stress conditions: acid (HCl 0.1N), basic (NaOH 0.1N), oxidative (H₂O₂ 3%), temperature (60°C) and sunlight degradation.

Moreover, in order to evaluate the ability of the method to quantify the cannabinoid in the presence of the polymer, placebo and drug-loaded microparticles were analyzed.

Furthermore, it was assessed whether the dissolution medium (PBS pH 7.4-Tween 80® 0.1%) interfered with drug quantification by analyzing the release medium and samples from the *in vitro* release tests.

The resulting chromatograms were analyzed to identify the drug peak, and to evaluate if it was well-separated from the other peaks.

2.4.2. Linearity, Range and Sensitivity.

Linearity was evaluated using three freshly prepared calibration curves constructed using three separate batches of five different drug concentrations covering the range of 0.7–15 µg/mL prepared from three stock methanolic solutions (1mg/mL).

The calibration curves were determined by measuring the cannabinoid peak area as a function of the corresponding cannabinoid concentrations. After checking variance homocedasticity, the calibration equations were calculated by means of the least square method. The linearity of the method was confirmed by an analysis of variance (ANOVA). The proportionality of the method was evaluated using a Student's t-test.

2.4.3. Precision.

According to the ICH Q2 (R1) guideline, precision was measured as repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day).

In order to evaluate the repeatability of the method two kinds of samples were used.

- Artificial samples: placebo microparticles samples were spiked in triplicate with standard cannabinoid solutions at three different concentrations, corresponding to the lowest, the middle and the highest point of the calibration curve (0.7; 10 y 15 µg/mL).
- Real samples: a batch of cannabinoid-loaded microparticles was analyzed six times within the same day.

Repeatability was evaluated by calculating the coefficients of variation (CV) of the measured concentrations at each level. From the CV value, the number of required determinations (N) to obtain a precise result was calculated.

Also, a Bartlett's test was carried out to evaluate if the drug level influenced the response variance.

The intermediate precision was determined by analyzing a batch of microparticles in triplicate on three consecutive days.

In order to assess whether the time of analysis influenced the precision of the method the CV of the repeatability studies were compared with the intermediate precision CV.

2.4.4. Accuracy.

Accuracy was evaluated using the artificial samples employed for repeatability studies. Accuracy was calculated as the recovery percentage, which should be between 98-102%. A t-test was conducted to confirm that the mean recovery did not differ from 100%.

Finally, according to *The United States Pharmacopeia 31 NF26* (2008) recommendations, the recovered cannabinoid amount was plotted against the added amount, to evaluate if a straight line was obtained and if the confidence interval of its slope contained the theoretical value 1.

2.4.5. Limit of quantitation.

Calculation of the quantitation limit (LOQ) was based on the standard deviation of the calibration curve (σ) and the slope of curve (S), using the equation $LOQ = 10 \times \sigma / S$ (ICH Q2 (R1)).

2.4.6. System suitability.

System suitability was evaluated to confirm that the equipment was adequate for the analysis to be performed. The test was carried out by making replicate injections of a standard solution containing 10 $\mu\text{g/mL}$ of CBD or THC, and analyzing each solute for its retention time, peak area, theoretical plates (N) and, tailing factor.

3. RESULTS AND DISCUSSION.

Method Validation.

3.1. Specificity.

As illustrated in figures 19 and 21, chromatograms of raw cannabinoid showed a sharp large peak at 5 min for CBD and 10 min for Δ^9 -THC. However, in a chromatogram of cannabinoid which was intentionally stored under stress conditions to force degradation of the drug –mainly oxidation and acid degradation–, additional peaks, well-separated from the drug peak, appeared at shorter retention times. These results suggest that this chromatographic procedure would be able to quantify the drug in the presence of its main degradation products.

Placebo PCL microspheres, drug-loaded microspheres, release medium, and samples from an *in vitro* release test were also analyzed according to the proposed method and checked for any interference at the retention times of CBD or THC (figure 23).

In view of the obtained results, it was concluded that neither the excipients nor the release medium interfered with the cannabinoid analysis. Therefore, the proposed chromatographic method was considered to be specific for CBD and THC quantification in the studies which will be employed.

3.2. Linearity and sensitivity.

The linearity results are summarized in table 11. The correlation coefficients (r) were close to 1, indicating that there was a high correlation between the two variables (drug concentration and AUC).

The Bartlett's test (χ^2) confirmed that the analyte concentration did not influence the response variance and, therefore, the calibration equation was calculated by means of the ordinary least square method.

Furthermore, as the p-value of the ANOVA test was higher than 0.10 it was concluded that for both cannabinoids there was a linear relationship between the two variables (AUC and cannabinoid concentration). In fact, the method produced linear responses within the concentrations range of 0.7-15 $\mu\text{g/mL}$.

Finally, the results from the t-test for the y-intercept corroborated the proportionality of the method. As a result, the calibration curves were $y=36.254x$ ($r^2=0.9977$) and $y=34.366x$ ($r^2=0.9993$) for CBD and THC, respectively ($n=15$) (figure 24).

3.3. Precision.

Precision tests results were expressed by the corresponding CV values.

3.3.1. Repeatability.

Repeatability results of CBD from artificial samples and real samples are listed in tables 13 and 14. The data from THC samples are presented in tables 15 and 16.

As the p-value of the Bartlett's test was higher than 0.05 for CBD and THC (tables 3 and 5), it was assumed that the analyte concentration did not influence the method precision. In all cases the CV were lower than 2%, which was considered acceptable.

When using real samples, the precision was even better, with CV below 1%.

From the CV value of real samples, the number of required determinations (N) to obtain a precise result was calculated. This “ N ” value for a 98% acceptance level was one for CBD and two for THC. Therefore, two determinations of each sample would be enough to get a precise result.

3.3.2. Intermediate precision.

The statistical parameters of the intermediate precision studies are listed in tables 17 and 18.

According to table 17, for CBD the CV of the precision study was higher than the CV obtained in the repeatability study. Therefore, in order to evaluate if there were statistically significant differences between the variances of the results from the repeatability and intermediate precision studies, a F-Snedecor test was performed. As the experimental F value was higher than the tabulated F value, it was concluded that there were no statistically significant differences between the variances, and thus, time did not influence the precision of the results.

Relating to Δ^9 -THC (table 18), as the CV from the intermediate precision study was lower than the CV from the repeatability study, it was also concluded that time did not affect the method precision.

3.4. Accuracy of the method.

Results obtained from accuracy studies for CBD and THC are reported in tables 13 and 15, respectively. From the ANOVA test it was concluded that the analyte concentration did not influence the accuracy of the method. The average recovery percentages were between 98-102%; and the mean recovery confidence interval contained the value 100%. Furthermore, a t-test confirmed that the mean recovery was not statistically different from 100%.

Besides, according to USP recommendations when plotting the obtained values against the real values linear curves were obtained ($r^2 > 0.999$) (figure 25), and the confidence interval of the slope contained the unit value (tables 13 and 15).

As a result, it was concluded that the proposed RP-HPLC method was accurate.

3.5. Limit of quantitation.

The LOQ values for CBD and Δ^9 -THC were 0.222 $\mu\text{g/mL}$ and 0.613 $\mu\text{g/mL}$, respectively (table 19). These values were close to the lower concentration level used for the linearity studies.

As it has already been demonstrated that the analytical method was precise and accurate at 0.7 $\mu\text{g/mL}$, this level was established as the quantitation limit of the analytical method.

3.6. System suitability.

The parameters used to evaluate the system suitability are shown in table 20.

According to FDA recommendations(*FDA. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*, 1994) the theoretical plates number should be higher than 2.000 and the tailing factor lower than 2. As shown in table 20, these specifications were achieved.

The retention times were considered optimal, neither too short nor too long, which would reduce the capacity to analyse samples. Furthermore, as the retention times of CBD and THC are relatively separated, this method would be useful to quantify both cannabinoids when present in the same sample.

4. CONCLUSIONS.

In conclusion, validation statistics showed that this method possesses good specificity, linearity, precision, and accuracy.

Linearity and proportionality were confirmed in the 0.7-15 $\mu\text{g/mL}$ range. The lowest limit of the range was the limit of quantitation of the analytical method.

Method precision was verified as the CV values were below 2%. The number of replicates to obtain a precise result with $\alpha=0.02$ was 1 for CBD and 2 for THC. Furthermore, the day of analysis did not influence the precision of the results.

Accuracy of the method was proved because the average recovery value did not differ from 100% and the confidence interval of the slope for the curve real concentration-obtained concentration did contain the value 1.

CHAPTER IV. MICROSPHERES DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION.

1. MATERIALS AND METHODS.

1.1. Materials.

Cannabidiol (CBD) (purity 99.4%) and Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (purity $\geq 98\%$) were purchased from THC Pharm GmbH (Frankfurt, Germany). Poly- ϵ -caprolactone (PCL) (Mw: 42,500), polyvinyl alcohol (PVA, MW=30,000-70,000) and Sigmacote[®] were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dichloromethane (DCM) (HPLC grade), potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), disodium hydrogen phosphate dihydrate (Na₂HPO₄·2H₂O) and Tween[®]-80 were provided by Panreac (Barcelona, Spain). Acetonitrile and methanol HPLC grade were supplied by Lab-Scan (Dublin, Ireland). All other chemicals were of analytical reagent grade.

Distilled demineralised Milli-Q[®] water (Millipore, Madrid, Spain) was used. All chemicals and reagents were used as received.

Poly- ϵ -caprolactone (PCL) was selected as polymer because it is a biocompatible, biodegradable, FDA-approved, semi-crystalline aliphatic polyester that degrades slowly and does not generate an acid environment unlike the polylactide (PLA) or polyglycolide (PLG) polymers (Dhanaraju *et al.*, 2006; Durán *et al.*, 2006). Other advantages of PCL include hydrophobicity, *in vitro* stability and low cost (Chen *et al.*, 2000; Durán *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Pitt, 1990; Sinha *et al.*, 2004).

In order to avoid cannabinoid binding to glass, all glass material was pretreated with Sigmacote[®] before being used.

1.2. Preparation of microspheres.

Poly- ϵ -caprolactone (PCL) microspheres loaded with CBD or Δ^9 -THC were prepared by the oil-in-water (O/W) emulsion-solvent evaporation method (figures 26 and 27).

Briefly, the drug and the polymer were dissolved in 5 mL of dichloromethane (DCM) at room temperature. This organic phase was emulsified in 250 mL of a 0.5% (w/v) aqueous polyvinyl alcohol solution at 3,000 rpm for 6 min using a Polytron PT 3000 (Kinematica[®] AG, Lucern, Switzerland). The resulting O/W

emulsion was continuously stirred at room temperature using a turbine homogenizer (IKA® Laboratory Technology, Staufen, Germany) at 200 rpm for 3 h in order to allow complete organic solvent evaporation and hardening of the microspheres. Subsequently, the microspheres were collected by filtration (through a 5 µm Millipore® PTFE membrane filter) and washed gently with distilled deionized water to remove any adhered stabilizer.

Finally, the microspheres were freeze-dried (Flexi-Dry MP™, FTS® Systems, NY, USA) to prevent polymer hydrolysis during storage, and were stored at 4°C.

In order to assess the effect of lyophilization process on microspheres surface some batches were dried at room temperature.

In the present study, the maximum loading capacity of the carrier was assessed by preparing microspheres with different initial drug:polymer ratios (5, 10, 15, 30 or 50 mg CBD per 150 mg PCL).

THC-loaded microparticles were prepared by the method described above, but as THC readily oxidizes in contact with oxygen, a nitrogen atmosphere was employed when possible. An antioxidant (α -tocopherol acetate) was added at different proportions to the organic phase (0.05 or 5%), and its influence on THC release from the microparticles was evaluated. In order to assess the maximum loading capacity of the carrier different initial THC:PCL ratios were used, namely 15:150, 30:150 and 50:150.

Unloaded microspheres were prepared by the same method.

The yield of the process was calculated for all of the microspheres batches. It was determined as a mass balance, using equation 5.

$$\text{Percentage yield} = \frac{\text{mg of MPs}}{\text{mg of PCL} + \text{mg of CBD}} \times 100 \quad (5)$$

1.3. Characterization of the microspheres.

1.3.1. Size, morphology and aggregation state.

a. Scanning electron microscopy (SEM).

The surface, shape and aggregation state of the microspheres were examined both by optical (Olympus CH 40, Japan) and scanning electron microscopy (SEM) (Jeol- JSM-6400 Electron Microscope, Tokyo, Japan).

Samples were directly observed by optical microscopy. For SEM, double-sided adhesive tape was placed on an aluminium specimen holder upon which a small amount of microspheres was deposited. Then, the stub was coated with conducted gold with a sputter coater (Emitech K550X).

b. Laser diffraction.

The particle size distribution of the microspheres was measured by laser diffraction (Microtrac® SRA 150 Particle Size Analyser, Leeds & Northrup Instruments, Ireland). Prior to size analysis, a small amount of microspheres (5mg) was dispersed in 2 ml of deionized water and sonicated in an ultrasonic bath for 2 min.

Polydispersity was calculated by the following equation:

$$\text{Polydispersity} = \frac{D_{0.9} - D_{0.1}}{D_{0.5}} \quad (\text{Ec. 6})$$

where $D_{0.9}$, $D_{0.5}$ and $D_{0.1}$ are the particle diameters determined, respectively, at the 90th, 50th and 10th percentile of undersized particles (Mathew *et al.*, 2009) (figure 28).

1.3.2. Drug loading and Encapsulation Efficiency.

The term drug loading refers to the amount of drug encapsulated per 100 mg of microspheres.

The entrapment efficiency was calculated by equation (7) (Benoit *et al.*, 1999).

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{actual CBD:PCL ratio}}{\text{initial CBD:PCL ratio}} \times 100 \quad (7)$$

The validated high performance liquid chromatography (HPLC) method (chapter III) was used for the quantification of CBD and THC in the microspheres. Moreover, the concentration of CBD or THC in the remaining PVA solution obtained after filtration of the microspheres was also determined.

All measurements were conducted in triplicate.

1.3.3. Drug:polymer compatibility and solubility, physical state of the cannabinoid within the microspheres, and cannabinoid content effect on poly- ϵ -caprolactone crystallinity.

DSC scans were carried out using a Mettler-Toledo differential scanning calorimeter DSC820 with a Huber TC100 intracooler. The equipment was calibrated with indium. The samples were heated in pin-holed sealed aluminium pans at a linear heating rate of 10°C/min from 0 to 100°C under an inert nitrogen atmosphere at a flow rate of 70 mL/min.

Samples of pure drug; raw polymer; CBD:PCL physical mixtures; and placebo and drug-loaded PCL microspheres were analyzed in triplicate.

Due to Δ^9 -THC sticky and viscous nature, it was not feasible to prepare physical mixtures of THC and PCL, thus THC-PCL solubility and compatibility studies could not be performed.

The melting points were taken to be the onset of melting as is the convention in DSC (Li *et al.*, 2007). The heats of fusion were calculated from the areas under the melting peak curves (Stinchcomb *et al.*, 2004), and PCL crystallinity was determined by equation 8.

$$\lambda_m (\%) = (\Delta H_m / \Delta H^c_m) * 100 \quad (8)$$

where λ_m represents the crystallinity degree, ΔH_m is the melting enthalpy of a sample, and ΔH^c_m is the melting enthalpy of the sample 100% crystalline of the same polymer ($\Delta H^c_m = 139.5$ J/g for PCL) (Ali *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 1999; Sastre *et al.*, 2004).

All analyses were performed in triplicate.

1.3.4. *In Vitro* drug release

Due to CBD and THC extreme lipophilicity it was difficult to guarantee *sink* conditions during the *in vitro* release experiments. A preliminary study was carried out to set these conditions. The results from this study suggested that PBS pH 7.4-Tween®80 0.1% w/v should be used as buffer (the surfactant would increase cannabinoid aqueous solubility) and the buffer volume should be 15 mL for 5/150, 10/150 and 15/150 formulations, and 30 mL for 30/150 and 50/150 formulations.

The sample and separate method was used to evaluate the *in vitro* cannabinoid release from the microspheres (D'Souza *et al.*, 2006). Briefly, fifteen

milligrams of freeze-dried cannabinoid-loaded microparticles were suspended in 15 or 30 mL of release medium (PBS pH 7.4-Tween®80 0.1% w/v) in closed glass vials, and then immersed in a thermostatic shaking water bath (Clifton® NE5-28, United Kingdom) adjusted at 37°C with continuous agitation at a rate of 100 rpm. At specific time intervals, the supernatants were withdrawn, filtered through 0.45 µm nylon filters (Teknokroma®, Barcelona, Spain) and analyzed for cannabinoid content by HPLC. The withdrawn volume was immediately replenished with an equal volume of fresh and pre-warmed buffer.

At the end of the study the remaining microspheres were lyophilized. Their morphology was evaluated by SEM and the remaining cannabinoid content was determined by HPLC.

All the experiments were repeated thrice, and the average values were taken.

Several model independent parameters were calculated to compare the *in vitro* dissolution profiles ($t_{10\%}$, $t_{50\%}$, $t_{90\%}$, dissolution efficacy).

In the case of THC microparticles, the influence of antioxidant concentration onto the THC release from the matrices was also evaluated by means of the similarity factor (f_2) (Costa et al., 2001).

Also, different mathematical models were applied for describing the kinetics of the drug-release process from the microspheres. Therefore, kinetics of cannabinoid release from PCL microspheres were determined by finding the best fit of the release data to Higuchi, first order and Korsmeyer-Peppas plots.

2. RESULTS AND DISCUSSION.

2.1. CANNABIDIOL-LOADED MICROSPHERES.

2.1.1. Size, morphology and aggregation state.

a. Scanning electron microscopy.

Morphological characteristics of raw CBD and CBD microparticles are depicted in figure 31. Although raw cannabidiol had a crystalline nature (picture a), CBD-loaded microspheres did not show drug crystals on their surface (pictures c-f). Moreover, no morphological differences were observed between the placebo (b) and CBD-loaded microparticles (c-f). In all cases microspheres were spherical

in shape, individualized, nonporous, and uniform with a smooth surface without hollows or deformations.

Freeze-drying did not significantly affect microspheres surface morphology and no porous were observed in lyophilized microspheres (c-f).

Interestingly, although the microparticles maintained their spherical shape in all cases, as the initial drug-to-polymer ratio increased, microspheres tended to agglomerate. Thus at 10/150 and 15/150 individualized microspheres were observed, at 30/150 they formed doublets and triplets, and at 50/150 the agglomeration was greater, forming clusters, which would hamper their administration through a hypodermic needle. Therefore, higher drug-to-polymer ratios were not employed.

Finally, cross-sections of the CBD microspheres were observed by SEM (figure 32), which confirmed the absence of drug crystals in the microspheres.

b. Laser diffraction.

Size distribution plots of the different formulations are presented in figure 33. Moreover, average size, $D_{0.1}$, $D_{0.5}$, $D_{0.9}$, and polydispersity of the formulations are reported in table 24.

In all cases, except for the formulation 50/150, an unimodal particle size distribution was obtained. Formulations 5/150 and 10/150 showed a similar size distribution, with a mean diameter of 35 μm . When increasing the CBD:PCL ratio to 15/150 and 30/150 particle size increased to 52 μm . It is important to emphasize that the particle size of the formulation 50/150 could not be properly measured due to the agglomeration of the particles (figure 31f), and the presented results are for guidance only.

In all cases –except in the formulation 50/150- free flowing microparticles with a narrow particle size distribution (span value lower than 2) and a volume suitable for subcutaneous administration ($D_{0.9}$ lower than 100 μm) were obtained.

2.1.2 Drug loading and encapsulation efficiency.

Process yields, drug contents and encapsulation efficiencies of the CBD-PCL microparticles formulations are presented in table 25.

The microencapsulation process was reproducible in all cases, with process yields above 82%, except when the drug:polymer ratio was 50:150, where the yield was slightly lower.

As illustrated in figure 34, increasing the initial drug:polymer ratio proportionally increased microspheres drug loading. Thus, with the initial ratio of 15/150 the resulting microparticles contained around 9% of CBD, and with the initial ratio of 50/150 drug loading was close to 26.5%. As expected, results of encapsulation efficiencies exhibited no change with increasing drug loadings because drug loadings increased as the initial drug:polymer ratios did. The encapsulation efficiencies (EE) ranged from 90 to 110% (table 25). EE values higher than 100% could be attributed to the process yield, which was below 100%. That means that not all the initial polymer formed microspheres, but all the initial drug was efficiently microencapsulated. This might be due to the high lipophilic nature of the cannabinoid, so CBD tends to remain entrapped into the microspheres and not to dissolve into the external aqueous phase. This was confirmed by determining the CBD content in the external aqueous phase by HPLC, which was in all cases below the HPLC method quantitation limit (<0.7 µg/mL).

2.1.3. Drug-polymer compatibility and solubility.

In order to evaluate the drug-polymer compatibility and the CBD solubility in the polymer, DSC thermograms of raw CBD, placebo PCL microspheres, and different binary mixtures CBD: placebo PCL microparticles were compared (figure 35).

The DSC trace of pure CBD showed a sharp and large endothermic peak at 68.5°C, which corresponds to its melting point with an enthalpy of fusion of $\Delta H_f=70.64$ J/g, which is in accordance with the data reported by other authors (Durst *et al.*, 2007; Lodzki *et al.*, 2003; Stinchcomb *et al.*, 2004). The PCL thermogram showed an endothermic peak at 62°C. The thermograms of the physical mixtures showed two endothermic peaks (at 45-60°C and 65-70°C), which corresponded to PCL and CBD, respectively. Those results suggest that no chemical interaction between both components occurred. However, in the presence of CBD the polymer melting peak broadened and shifted to lower temperatures.

As expected, when increasing the rate of CBD, CBD peak was larger. However, CBD fusion peak was not detected when the ratio 1.5:1 (CBD:PCL) was used. Drug solubility was estimated by plotting the measured ΔH_f values versus the drug concentration in the physical mixtures (Dubernet, 1995; Gramaglia *et al.*, 2005; Theeuwes *et al.*, 1974) (figure 36). Hence, drug concentration corresponding to zero heat of fusion (no crystals present) should equate to the drug solubility in the polymer. This value was 1.53 mg CBD/mg PCL. This value was much higher than

the highest drug:polymer ratio used to prepare the microspheres (50:150). Therefore, at all the drug to polymer ratios used in the present work, CBD was soluble in the polymer.

2.1.4. Physical state of CBD within the microspheres and CBD effect on poly- ϵ -caprolactone crystallinity.

DSC thermograms of pure CBD, raw PCL, placebo PCL microspheres, and CBD-loaded PCL microspheres are shown in Fig. 37.

Raw CBD thermogram showed a narrow endothermic peak at 68.5°C, which corresponds to its fusion peak ($\Delta H_f=70.64$ J/g), which is in accordance with the data already published by (Durst *et al.*, 2007; Stinchcomb *et al.*, 2004). This thermal event confirms the crystalline nature of CBD. Moreover, drug crystals were observed by SEM (figure 31a).

Raw PCL and placebo PCL microspheres showed an endotherm at 67 and 62 °C (figure 37) with a heat of fusion of 102.09 ± 2.36 J/g and 98.84 ± 4.17 J/g respectively, which are in accordance to data already published for PCL (Durán *et al.*, 2006; Hombreiro Pérez *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2004). These results suggest that PCL maintained its semicrystalline characteristics in the microparticles prepared by the O/W technique, and therefore, the microencapsulation process did not affect PCL crystallinity (t-Student p-value = 0.09).

Considering that 100% crystalline PCL has a heat of fusion of 139.5 J/g (Ali *et al.*, 1993; Pitt *et al.*, 1979a), the PCL used in the present work had a crystallinity of 73.18% (table 26).

In the thermograms of CBD-loaded PCL microspheres, the peak corresponding to the melting point of pure CBD was completely absent, suggesting that the drug was completely dissolved within the polymeric matrix in an amorphous form, and no CBD crystallization occurred during the microspheres preparation process (Jeong *et al.*, 2003). In fact, it has been reported that cannabinoids are very difficult to crystallize (Mechoulam, 1981). These results confirm the SEM observations (figures 31 and 32), where no CBD crystals were observed either on the microspheres surface or inside the particles.

Moreover, CBD content in the microspheres seemed to alter the PCL fusion peak. In fact, when the PCL endotherm in the CBD loaded microspheres is analyzed it can be observed that as drug loading increased into the microspheres, the polymer melting peak broadened and shifted to lower temperature values and the heat of fusion decreased in the same way (table 26), suggesting that CBD

and PCL were miscible. The decrease of PCL melting point was considered important, because it affected the polymer physical properties. In fact, the decrease of polymer crystallinity, together with the drop in polymer fusion temperature could indicate that CBD does have a plastificant effect on the polymer. This could be the reason why, as seen by SEM, as CBD:PCL ratio increased the microspheres aggregation was more noticeable and, for ratios higher than 50/150 the aggregation was so intense that the microencapsulation process failed (figure 31).

This increase in PCL plasticity when increasing CBD loading may be due to a decrease in polymer crystallinity (λm), as illustrated in figure 38 and table 27. Raw polymer and placebo microparticles showed similar polymer crystallinity, thus it was concluded that the microencapsulation process did not affect polymer crystallinity. However, CBD incorporation into the microspheres caused a statistically significant drop in polymer crystallinity. Hence, when drug loading was increased from 5/150 to 10/150 a drop in polymer crystallinity was observed, although it was not statistically significant. Subsequently, when drug loading was increased to 15/150 and 30/150 polymer crystallinity decreased even more, in a statistically significant manner. Nevertheless, it seemed that the PCL crystallinity reached a limit because when increasing the drug loading from 30/150 to 50/150, the crystallinity value did not change. Therefore, it was concluded that when increasing the CBD loading into the microparticles, PCL crystallinity decreased, but it tended to stabilize around 50%.

2.1.5. *In vitro* drug release.

The *in vitro* release profiles of CBD microspheres are shown in figure 40. Release profiles indicated a low burst effect (less than 8% of the drug was released from the microspheres in the first 3 hours). However, the formulation 50/150 exhibited an important burst effect (21%), probably due to a greater amount of drug adsorbed onto the microspheres surface.

a) Model-independent parameters.

As depicted in figure 40, formulations 5/150, 10/150 and 15/150 showed similar release profiles. During the first days CBD release from these formulations was slower than from the 30/150 and 50/150 systems, but at day 13 all the CBD was released from those formulations. However, the formulations 30/150 and 50/150 showed a biphasic release profile, with a faster release phase till day 5-7, followed by a phase of slower CBD release, so that CBD release went on until day 20. These differences were also observed when calculating the $t_{50\%}$ and the $ED_{50\%}$ values (table 30). As a result, $t_{50\%}$ for 5/150, 10/150 and 15/150 formulations

was 4 days and ED_{5days} was 37%. However for 30/150 and 50/150 formulations these values were 2.5-3 days and 41-44%, respectively.

b) Model-dependent parameters.

The *in vitro* release data were fitted to Higuchi, first-order and Korsmeyer-Peppas kinetic models as shown in tables 31 and 32.

The release exponents (n) from Korsmeyer-Peppas equation for the formulations 5/150, 10/150, 15/150 and 30/150 were close to 0.5, suggesting that CBD release from these formulations was due to a Fickian diffusion mechanism. In fact, PCL is a semicrystalline polymer and water can penetrate easily into the amorphous part of the polymer matrix, thus facilitating the release of the drug by diffusion (Durán *et al.*, 2006). However, the n value for the formulation 50/150 was 0.72, suggesting that CBD release from this formulation follows a non-Fickian model (anomalous transport).

Moreover, experimental release data from 5/150, 10/150 and 15/150 formulations fitted well ($r>0.99$) to Higuchi model. Nevertheless, results from 30/150 and 50/150 formulations were best fitted to first order kinetic model ($r=0.99$).

Microparticles morphological evaluation after the *in vitro* release studies.

The SEM photomicrographs of the microspheres taken at the end of the 21-day *in vitro* dissolution study (figure 42) revealed low signs of surface degradation. Microparticles were not broken and kept their spherical shape, thus excluding the influence of an erosion mechanism on CBD release from the microspheres. These observations were in agreement with the Korsmeyer-Peppas release exponent (n) values close to 0.5 obtained for the formulations 5/150, 10/150, 15/150 and 30/150. Therefore, these results substantiate that the main drug release mechanism from these formulations was drug diffusion through the polymeric matrix. In fact, it has been reported that PCL degradation is very slow in an aqueous medium because of its semi-crystallinity and hydrophobicity. This indicates that drug release is mainly due to a diffusion mechanism, and not to polymer degradation (Durán *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2003).

2.2. Δ^9 -TETRAHYDROCANNABINOL-LOADED MICROSPHERES.

2.2.1. Size, morphology and aggregation state.

a. Scanning electron microscopy (SEM).

Scanning electron micrographs of THC-loaded PCL microspheres are shown in figure 44. In all cases the microspheres had a smooth and nonporous surface. They were spherical in shape, and were well-separated. No differences were observed between the non-lyophilized and the lyophilized microspheres (figure 44 *b* and *c*).

Besides, no morphological differences were observed between the formulations prepared with or without antioxidant.

However, the microspheres prepared from a 50/150 drug-to-polymer ratio appeared in groups. This agglomeration was attributed to the high lipophilicity and the viscous and sticky tar-like nature of THC as well as to its bioadhesive properties (Repka *et al.*, 2006). In fact, when increasing the drug-to-polymer ratio, a higher proportion of the drug would be present on the microparticles surface due to an incomplete encapsulation. The sticky nature of THC could justify the greater trend of the THC microparticles to agglomerate in comparison with the CBD microparticles.

b. Laser diffraction.

Particle size plots are presented in figure 45. In all cases, except for the 50/150 formulation, an unimodal particle size distribution was obtained. It is important to emphasize that as shown by SEM (figure 44*g*), when employing the 50/150 drug-polymer ratio agglomerated particles were obtained, so its particle size measurement by laser diffraction (figure 45*g*) is for guidance only, and should not be interpreted as a real data.

The results of the particle size analysis are listed in table 33. Although particle size slightly increased when increasing the initial drug-to-polymer ratio, microparticles suitable for parenteral administration were obtained from both 15/150 and 30/150 ratios. Moreover, the addition of vitamin E acetate did not modify the particle size.

2.2.2. Drug loading and encapsulation efficiency.

The results of drug loadings and encapsulation efficiencies (EE) of the THC-PCL microspheres are listed in table 34.

Interestingly, as depicted in figure 46, when increasing the initial drug-to-polymer ratio, the microspheres drug loading increased in a proportional way, resulting in encapsulation efficiencies close to 100% in all cases. Moreover, no THC was detected in the liquid obtained after microparticles filtration, hence confirming these high EE values.

Furthermore, the addition of vitamin E acetate did not influence microspheres drug loading (table 35).

2.3. Physical state of THC within the microspheres and THC effect on poly- ϵ -caprolactone crystallinity.

DSC studies were carried out on raw THC, raw PCL, placebo and THC-loaded microparticles. Unlike CBD, THC is an amorphous resin difficult to manipulate, which hindered the preparation of THC:PCL physical mixtures to evaluate THC solubility in the polymer.

THC raw material showed a Tg at 9.33°C (figure 47), which is in agreement with data already reported by other authors (van Drooge *et al.*, 2005).

Figure 48 shows the thermograms of raw PCL, placebo microparticles, and 15/150, 30/150 and 50/150 THC-PCL microparticles. Due to its amorphous nature and its resistance to crystallization (Gaoni *et al.*, 1964; van Drooge *et al.*, 2005) Δ^9 -THC in the microspheres was in an amorphous state. This suggestion was confirmed by the absence of a fusion peak for THC in the microparticles thermograms (figures 48-50).

Moreover, as observed for CBD microparticles, THC seemed to affect PCL melting peak. Indeed, as drug loading increased polymer melting point broadened and shifted to lower temperatures (from 62 to 54°C), suggesting that PCL and THC were miscible.

These changes in polymer melting peak seemed to affect PCL physical characteristics because as drug loading increased microspheres agglomeration was greater. This plasticizing effect of THC on PCL was also observed by SEM (figure 44).

Furthermore, the increase in PCL plasticity when adding THC, may be due to a decrease in polymer crystallinity (λm), as reflected in table 36.

In addition, THC's adhesive properties could be responsible for microparticles agglomeration when using high drug-to-polymer ratios.

The thermograms of the microparticles prepared with antioxidant (0.05 or 5%) were similar to those obtained from the equivalent formulation without antioxidant (figures 49 and 50). Therefore, it was concluded that the addition of antioxidant did not alter the polymer thermal characteristics.

2.4. *In vitro* release studies.

The release profiles of antioxidant-free THC-PCL microspheres formulations are illustrated in figure 52. Over the whole *in vitro* release study, it seemed that the variation of drug loading did not have a significant influence on the THC release behaviour from the microparticles. Moreover, all THC formulations showed a low burst effect, followed by a biphasic release -with a faster release phase (days 0-5) followed by a slower release phase-.

The influence of antioxidant presence, and its concentration on the release of THC from the microspheres was also evaluated (table 39, figures 53 and 54). The use of antioxidant at 0.05% did originate a slower release of THC from the systems, and at day 20 a 25-30% of THC was not released yet. However, when vitamin E acetate was employed at 5%, THC release was not modified.

a) Model-independent parameters.

The model-independent parameters calculated from the THC-loaded microparticles *in vitro* release data are presented in table 40. The $t_{10\%}$ was about 3h for all the formulations. The $t_{60\%}$ was 2 days for the microspheres prepared with no antioxidant or with 5% antioxidant, but the $t_{60\%}$ value was higher (7 or 18 days) in the case of the microparticles prepared with 0.05% antioxidant.

With regard to the dissolution efficacy (DE), the increase in drug-to-polymer ratio (at the ratios studied) did not modify the DE at day 13, being around 75% in all cases. When 5% antioxidant was used no differences in DE were observed (table 40). However, when including 0.05% vitamin E acetate the DE values at day 13 decreased to 50%.

In order to quantify the effect of antioxidant addition on the dissolution profiles, the similarity (f_2) factors were calculated. The formulation prepared with

the same drug-to-polymer ratio in the absence of antioxidant was used as reference. The results obtained are listed in table 41. The 5% vitamin E formulations exhibited a similar release profile as their antioxidant-free counterparts ($f_2=74.19$ and 69.45), while the release rate of the drug was lowered in the presence of 0.05% vitamin E ($f_2=30.53$ and 37.08).

b) Model-dependent parameters.

The experimental results were fitted to Higuchi, first-order and Korsmeyer-Peppas kinetic models (tables 42 and 43).

The n value from the Korsmeyer-Peppas model was close to 0.5 suggesting that the mechanism involved in THC release from the matrices was drug diffusion. In fact, due to the semicrystalline nature of PCL water can penetrate easily into the amorphous part of the polymer facilitating the release of the drug by diffusion.

Better fittings were obtained when considering a biphasic profile. Thus, a first rapid first-order release phase (until day 3) could be observed (65% of THC released) ($r=0.999$), followed by a second slower phase which could be ascribed either to the Higuchi or the first-order model.

Evaluation of microspheres morphology after the *in vitro* release tests.

SEM pictures of the microparticles at different time points of the *in vitro* release experiments are shown in figure 55. It can be observed that only a slight erosion on microspheres surface occurred, but it did not affect the spherical morphology of the microparticles. The erosion observed on the microparticles prepared with antioxidant was similar to the erosion observed on their antioxidant-free counterparts. Therefore, it was concluded that THC release from the microspheres was not due to polymer erosion but to drug diffusion through the polymer matrix, which is in accordance with the n values obtained ($n<0.5$).

3 CONCLUSIONS.

Spherical, non-aggregated CBD- or THC-loaded microparticles were obtained. These systems had a smooth surface and a narrow particle size distribution with a polydispersity value lower than 2. The obtained microparticles had a particle size suitable for their subcutaneous administration (50-60 μ m).

Viscous, resinous and difficult to handle Δ^9 -tetrahydrocannabinol was turned into a solid, powdered product, easy to handle and to weight.

High process yields (>80%) and high encapsulation efficiencies (>90%) were obtained. The addition of vitamin E acetate as antioxidant at 0.05 or 5% to THC microspheres did not modify the drug encapsulation efficiencies.

No chemical interaction between the cannabinoids and poly- ϵ -caprolactone was detected. Both in the CBD microparticles and the THC microparticles the cannabinoid was molecularly dispersed within the polymeric matrix.

When increasing the cannabinoid content in the microparticles a decrease in polymer melting temperature and polymer crystallinity was observed. The reduction in PCL crystallinity would explain the plastificant effect of the cannabinoid on the polymer. This plastificant effect resulted in an increase in microparticles aggregation when increasing the cannabinoid loading. This increase in microparticles aggregation was the limiting factor for the development of microspheres with higher drug loadings. So, the maximum drug loading which did not affect the product fluidity was 17 mg of drug/100 mg of microparticles.

Furthermore, the developed microparticles showed an *in vitro* prolonged release of the cannabinoid. In all cases biphasic release profiles were observed, with an initial rapid release phase, followed by a slower release phase. Differences were observed between CBD formulations 5/150, 10/150 and 15/150, which showed a complete release of CBD at day 13, and the formulations 30/150 and 50/150, which showed a complete release of CBD at day 20. All THC formulations showed similar release profiles, and complete release of THC was achieved at day 16, unless 0.05% vitamin E acetate was added.

The addition of antioxidant at 0.05% not only did not avoid THC oxidation but also affected THC release from the microspheres. Not all the THC was released from the systems during the *in vitro* release experiments.

The addition of antioxidant at 5% to the THC microparticles seemed to increase THC stability, while it did not modify the THC release profiles.

The 15/150 and 30/150 CBD and Δ^9 -THC (without or with 5% antioxidant) microspheres formulations were selected for the efficacy studies because they had the highest drug loadings and, therefore, they would represent the less volume of microparticles to be administered.

CHAPTER IV. CELL CULTURE STUDIES.

1. SCOPE.

Over the last few years several studies have shown the antitumoral efficacy of cannabinoids both *in vitro* and *in vivo* (Costa, 2007; Guzmán, 2003; Ligresti *et al.*, 2006; Massi *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2004). The aim of the present chapter was to evaluate the efficacy of the CBD and THC microparticles on different cancer cell lines.

These experiments were carried out in the laboratories of Dr Vincenzo Di Marzo (Endocannabinoid Research Group) at the Institute of Biomolecular Chemistry (ICB, CNR, Naples, Italy).

2. MATERIALS AND METHODS.

Cell lines: MDA-MB-231 (human breast cancer cell line), RBL-2H3 (rat basophilic leukemia fibroblast-like cells) and Caco-2 (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells).

Cell cultures. Media, sera, and subculturing procedures differed from line to line and were selected according to the information provided by the supplier.

Cell Proliferation Assay. Cells were seeded at a density of 30,000-90,000 cells/well on six-well culture plates at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Five hours after seeding, treatment (vehicle, drug in solution, placebo or drug-loaded microparticles) was added to the wells. The amount of MPs was calculated based on the *in vitro* release results. Medium was changed every two days.

Cytotoxicity evaluation. Cytotoxicity was determined by measuring the inhibition of cell growth using tetrazolium dye (MTT) assay at different time points. The assay is dependent on the cellular reduction of MTT, by the mitochondrial dehydrogenase of viable cells, to a blue formazan product which can be measured spectrophotometrically.

Cell viability was calculated by the following formula: cell viability (%) = optical density (OD) of the treated cells/OD of the vehicle-treated cells.

Samples.

- *Drug solution.* A stock solution of CBD or Δ^9 -THC in ethanol (100mM) was prepared. Subsequently, this solution was diluted to the desired concentration with FBS-free and antibiotic-free cell culture medium. In all cases, ethanol concentration was below 0.001%.
- *Microparticles.* Placebo, 15/150 and 30/150 formulations were used. The amount of microparticles to be added was weighed and resuspended in FBS-free and antibiotic-free cell culture medium.

The amount of microparticles added per well was calculated based on the *in vitro* release studies results (chapter IV), so that the amount of drug released daily from the microspheres was similar to the amount of drug in solution added daily to the control wells. Indeed, about 16% drug was released per day during the first 5 days of the *in vitro* release tests. In other words, about 1.6 mg of drug/100 mg microspheres/day were released from the 15/150 formulations, and about 2.6 mg of drug/100 mg microspheres/day were released from the 30/150 formulations.

In order to avoid microparticles withdrawal when changing the cell culture medium, microparticles were placed on a 3 μ m pore size insert. The lack of effect of the insert was previously investigated (table 47).

Studies.

a) Placebo microparticles cytotoxicity.

This study was performed on MDA-MB-231 cells.

b) Evaluation of CBD and THC microparticles efficacy.

After setting the conditions to perform these studies the antitumoral efficacy of the CBD and THC microparticles on MDA-MB-231, RBL-2H3 and Caco-2 cancer cell lines was evaluated. In all cases, a single administration of microspheres was compared to a daily addition of the drug in solution.

Cell viability was assessed at different time points: 2, 4, 7 and 9 days. The studies could not be extended because cells from vehicle-treated wells would reach 100% confluence and, hence, would start to die, not being suitable as control anymore.

3. RESULTS AND DISCUSSION.

3.1. Placebo microspheres cytotoxicity.

The results from the placebo microparticles cytotoxicity studies are listed in table 45. The obtained results demonstrate that blank microspheres did not affect cell viability (t-Student p-value=0.24), and therefore the lack of cytotoxicity of the developed microspheres (with an average size of 37 μm) was confirmed.

3.2. Evaluation of CBD and Δ^9 -THC microparticles efficacy.

The cytotoxicities of the CBD-loaded microparticles and free CBD (positive control) on MDA-MB-231 cell line are shown in table 49a and figure 59a. In the case of CBD-loaded microparticles, all the samples inhibited the cell growth for all the time course tested (9 days) because of the sustained release properties of the microspheres. Until day 7 CBD microparticles showed greater cytotoxicity than CBD solution did. However, at day 9 CBD microparticles showed a lower cytotoxic effect than the drug solution, which could be due to the slower release rate of CBD from the systems after day 7 as was shown in the *in vitro* release experiments.

With regard to Δ^9 -THC-loaded microparticles, as depicted in tables 51-52 and figures 61-62, THC microspheres inhibited RBL-2H3 and Caco-2 cell growth during the 7 or 9-days of exposure. Microparticles cytotoxicity was similar to THC solution cytotoxicity till day 4 of exposure. However, at days 7 and 9, microparticles efficacy was lower than solution efficacy. This difference could be due to a lower release of THC from the microparticles as shown by the *in vitro* release studies.

Importantly, the evaluation period could not be extended because cells in the control wells reached 100% confluence and in the very near future would start to die.

4. CONCLUSIONS.

A laboratory procedure to evaluate the cytotoxicity of the drug released from the microparticles, being the cells exposed to the microparticles for more than 48h, was developed.

The biocompatibility of the developed systems was confirmed, as the placebo microparticles did not affect cell viability.

The *in vitro* antitumoral efficacy of CBD solution in MDA-MB-231 human breast cancer cells was confirmed. However, we did observe little antitumoral effect of CBD in RBL-2H3 cells.

The *in vitro* antitumoral efficacy of Δ^9 -THC solution in RBL-2H3 and Caco-2 cells was also confirmed.

The cell culture studies performed revealed that CBD formulations 15/150 and 30/150 were able to inhibit MDA-MB-231 cell proliferation during a 7-day exposure period, showing a correlation with the *in vitro* drug release studies.

The cell culture studies performed also showed that THC formulations 15/150 and 30/150 (prepared with or without 5% antioxidant) were capable of inhibiting RBL-2H3 and Caco-2 cell proliferation during a 7-day exposure period, showing a correlation with the *in vitro* drug release studies.

CHAPTER VI. IN VIVO EFFICACY STUDIES.

1. OBJECTIVES.

One of the main areas of research in the cannabinoid field is their usefulness as antitumoural agents in GBM as well as the cellular mechanisms underlying these effects.

The proposed antitumour mechanisms are complex and may involve induction of apoptosis in tumor cells, antiproliferative action, and an antimetastatic effect through inhibition of angiogenesis and tumor cell migration - reviewed in (Flygare *et al.*, 2008; Freimuth *et al.*, 2009; Guzmán, 2003; Guzmán *et al.*, 2002; Iuvone *et al.*, 2009; Massi *et al.*, 2004; McAllister *et al.*, 2005; Parolaro *et al.*, 2008; Patsos *et al.*, 2005; Velasco *et al.*, 2004)-.

The significant antiproliferative action of cannabinoids in animal models of gliomas, together with their low toxicity compared with other chemotherapeutic agents, might make these compounds promising new ingredients of antitumoral cocktails for the management of GBM (Velasco *et al.*, 2007).

Since tumor regression in animal experimental tumor models represents an important endpoint of clinical relevance, in a final set of experiments we evaluated the ability of cannabinoid-loaded microparticles to reduce glioma growth.

These experiments were carried out in collaboration with Dr Manuel Guzman's and Dr Guillermo Velasco's research group (Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Biology, Complutense University Madrid). This group had already demonstrated the antitumoral efficacy of Δ^9 -THC on a xenograft model of glioma (Galve-Roperh *et al.*, 2000), and had conducted a Phase I/II clinical trial in patients with GBM (Guzmán *et al.*, 2006).

The aims of these studies were:

- I. to evaluate the *in vivo* antitumoral efficacy of CBD solution and CBD-PCL microspheres,
- II. to evaluate the *in vivo* antitumoral efficacy of THC solution and THC-PCL microspheres,
- III. to evaluate if a 50% mixture of CBD and THC did show an additive or synergistic effect with regard to a single cannabinoid, because

recent studies have suggested that the mechanisms of action of CBD and THC are not equal. There is an approved medicine, Sativex®, which contains both cannabinoids, that is licensed for cancer pain and neuropathic pain in patients with MS. Therefore the antitumoral efficacy of a 1:1 mixture of CBD and THC either in solution or microencapsulated was evaluated.

2. MATERIALS AND METHODS.

Nude Mouse Xenograft Model of Human Glioma.

U-87 MG human glioblastoma cells were used. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were cultured in DMEM containing 10% FBS.

Tumors were generated in athymic nude mice (Harlan Laboratories). The animals were injected subcutaneously on the right flank with 5*10⁶ U-87 MG human glioma cells resuspended in 0.1 mL of PBS supplemented with 0.1% glucose.

Tumors were daily measured using an external caliper, and their volume was calculated by the formula: $4\pi/3 * (\text{length}/2) * (\text{width}/2)^2$.

When tumors reached a volume of 200 mm³, mice were randomly divided into 8 groups.

Treatment.

The treatments were:

- ◆ Group 1: vehicle.
100 µL of 0.025% DMSO in PBS pH 7.4-BSA 0.5%.
- ◆ Group 2: CBD solution.
0.5 mg of CBD dissolved in 100 µL of 0.025% DMSO in PBS pH 7.4-BSA 0.5%.
- ◆ Group 3: Δ⁹-THC solution.
0.5 mg of THC dissolved in 100 µL of 0.025% DMSO in PBS pH 7.4-BSA 0.5%.

- ◆ Group 4: CBD and Δ^9 -THC 1:1 mixture in solution.
0.25 mg of CBD and 0.25 mg of THC dissolved in 100 μ L of 0.025% DMSO in PBS pH 7.4-BSA 0.5%
- ◆ Group 5: placebo microparticles.
75 mg of placebo microparticles resuspended in 400 μ L of PBS pH 7.4-Pluronic F68 1%.
- ◆ Group 6: CBD microparticles.
75 mg of CBD-PCL 15/150 microparticles resuspended in 400 μ L of PBS pH 7.4-Pluronic F68 1% (equivalent to a CBD dose of 6mg).
- ◆ Group 7: Δ^9 -THC microparticles.
75 mg of THC-PCL 15/150-5% vitamin E microparticles resuspended in 400 μ L of PBS pH 7.4-Pluronic F68 1% (equivalent to a THC dose of 6mg).
- ◆ Group 8: a 50% mixture of CBD and Δ^9 -THC microparticles.
75 mg of a 50% mixture of CBD-PCL 15/150 microparticles and THC-PCL 15/150-5% vitamin E microparticles resuspended in 400 μ L of PBS pH 7.4-Pluronic F68 1% (equivalent to a CBD dose of 3mg and a THC dose of 3mg).

The amount of microparticles to be administered was calculated based on the *in vitro* release studies. According to these studies the amount of cannabinoid released from 75 mg of microparticles would be 500-750 μ g/day. Therefore, the amount of cannabinoid administered with the microparticles would be slightly higher than the amount administered in solution. However, this dose was selected to counteract the losses due to microparticles administration because some of the microparticles would remain in the eppendorf where the suspension is prepared and the needle of the syringe.

Importantly, the vehicle or the cannabinoid in solution (groups 1 to 4) were daily administrated peritumorally to the mice. However, the microspheres (groups 5-8) were injected peritumorally every 5 days (days 1, 6, 11 and 17) to the mice.

During the length of the study, mice were monitored daily for health status and tumor volumes.

Evaluation of the results.

Tumor growth was monitored on a daily basis.

After 22 days of treatment mice were sacrificed and tumors were removed, weighed and measured. The remaining microspheres were removed and freeze-dried. The morphology and the cannabinoid content of the remaining microspheres were also evaluated.

Protocols were approved by the Institutional Animals Ethics Committee.

3. RESULTS.

As depicted in figure 64, no significant differences were found between control groups (vehicle versus placebo microparticles). Therefore, in order to simplify the graphs these data were put together.

The results of tumor growth evolution in all groups are presented in figure 65. It was found that between 14 and 22 days of treatment, cannabinoid-treated mice (either in solution or microencapsulated) had significantly smaller tumors than control mice did (figure 65).

Cannabinoid solution efficacy.

Graph 66 shows the progress of tumor growth in the groups treated with the solutions. Not only THC solution but also CBD and CBD-THC mixture decreased tumor growth from day 14th. In view of these results, no synergistic effect between CBD and THC was noticed.

Cannabinoid microparticles efficacy.

The results obtained with the microparticles are illustrated in figure 67. In this case, as already observed with the cannabinoid solutions, the effect of cannabinoids on tumor growth reduction was observed from day 14th. Furthermore, no differences were observed between the different formulations.

Efficacy of CBD solution *versus* CBD microparticles.

These results are depicted in figure 68. As already reported, CBD did reduce the tumor growth from day 14th. Moreover, this graph shows that no differences in tumor growth were observed between the CBD solution treated group (daily administration) and the CBD-microparticles treated group (administration every 5 days).

Efficacy of Δ^9 -THC solution versus Δ^9 -THC microparticles.

The tumor growth progression in mice treated with Δ^9 -THC, either in solution or microencapsulated is presented in figure 69. As already reported for CBD, it was found that the THC solution (daily administered) and the THC-loaded microparticles (administered every 5 days) showed similar efficacy.

Efficacy of CBD- Δ^9 -THC mixture in solution, and CBD and THC microparticles mixture.

These results are presented in figure 70. Similarly to CBD and THC results, no differences were observed between the solution and the microparticles-treated groups.

Results evaluation at the end of the study.

The last day of the experiments, mice were sacrificed and gliomas were removed. Subsequently, gliomas were measured and weighed. Tumor volumes (% from day 0) at the end of the experiments are listed in table 53. Their weights are presented in table 55.

Statistical analysis (table 54) showed great differences between tumor volumes in the control groups and the cannabinoid-treated groups (p -value <0.05), thus, confirming the cannabinoids antitumoral potential. Moreover, no differences were observed between the groups treated with CBD solution, THC solution or their 50% mixture solution. Furthermore, no significant differences in tumor growth were observed when comparing the cannabinoid in solution group with its microencapsulated counterpart group.

Tumor weights are presented in figure 71. In all cases, tumor weight after a 21-day cannabinoid treatment was lower than tumor weight when vehicle was administered. Statistical evaluation of tumor weight results is presented in table 55. As shown with tumor volumes, there was a statistically significant difference between the vehicle treated-groups and the cannabinoid-treated groups. Moreover, no differences in tumor weight were observed between the cannabinoid in solution group and the microencapsulated counterpart group.

Photographs of the removed gliomas are presented in figure 72. It can be observed that tumor size was considerably smaller in the cannabinoid-treated groups than in the vehicle-treated groups.

As a result, it can be concluded that cannabinoid administration (CBD, Δ^9 -THC or their 50% mixture) decreased tumor size from the second week of treatment. Furthermore, no differences were observed between the daily administration of the cannabinoid in solution and the administration of cannabinoid-loaded microparticles every 5 days.

Then, after mice slaughter, remaining microparticles were removed from the administration site in order to evaluate if there were changes in their morphology and to quantify the remaining drug content. SEM pictures of freshly prepared THC-PCL 5% vitamin acetate microparticles, the same formulation after the *in vitro* release tests, and the remaining microspheres at the administration site are presented in figure 73. Recently prepared microparticles showed a smooth surface, and the microspheres from the *in vitro* release tests showed slight erosion. However, the microparticles from the *in vivo* studies showed a rough surface, and some of the particles –presumably those administered at day 1- were completely eroded due to the chemical hydrolysis of the polymer. In fact, poly- ϵ -caprolactone is a bioerodable and biocompatible polymer, which is widely used for controlled drug release (Chen *et al.*, 2000; Grignard *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Several authors have reported that *in vivo* the presence of enzymes can accelerate the PCL degradation process (Blanco *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2000; Darwis *et al.*, 1998; Hombreiro Pérez *et al.*, 2000; Persenaire *et al.*, 2001; Wnek *et al.*, 2004), what would explain the differences observed in our studies (figure 73b-c). In fact, it has also been reported that implantation of polycaprolactone-b-poly(-ethylene glycol) copolymer in the back or small intestine of rats shows a faster degradation than in *in vitro* assays in the presence of lipase due to the physiological conditions of the sample being implanted in the body of animals (Blanco *et al.*, 2003).

Finally, cannabinoid content in the remaining CBD and THC-loaded microspheres was determined by HPLC. These results are presented in table 56. These analyses revealed that CBD content in the remaining microspheres was about 5 mg CBD/100 mg MPs (initial drug loading was about 9 mg CBD/100 mg MPs). In the case of THC-loaded microparticles, the remaining drug content was about 5 mg THC/100 mg MPs (initial drug loading was about 8 mg THC/100 mg MPs). It is important to point out that due to the biodegradability of PCL (figure

73), no comparisons between microspheres drug content at the beginning and the end of the experiments can be established. As a matter of fact, the drug/polymer ratio will change not only due to drug release but also due to polymer bioerosion. However, in view of these results, it can be concluded that there was drug remaining in the microspheres at the end of the experiment. Therefore, these results suggest that in future experiments microparticles dosing interval could be increased to 1 week or even 10 days.

4. CONCLUSIONS.

It has been demonstrated that the placebo microparticles did not alter tumor growth progression in the animal model used.

From day 14th an antitumoral effect was observed with all the cannabinoid treatments.

Not only the THC but also the CBD and their 50% mixture antitumoral efficacy have been assessed. No differences were observed between CBD and THC antitumoral effect at the doses employed. Moreover, no synergistic effect between both cannabinoids has been observed (neither in solution nor microencapsulated).

Likewise, the obtained results demonstrate the antitumoral efficacy of the CBD and the Δ^9 -THC microparticles. They were capable of slowing down glioma growth in the animal model used. As microparticles were administered every 5 days, these results confirm their usefulness as prolonged release delivery systems for CBD and Δ^9 -THC. Furthermore, the presence of remaining cannabinoid in the microspheres at the end of the *in vivo* experiments, suggests that in future experiments the microparticles posologic interval could be increased to 1 week or even 10 days.

Future studies will be aimed at studying whether the dosing interval of the microparticles can be increased, evaluating the antitumoral efficacy of these systems in an orthotopic tumoral model, and studying the antitumoral efficacy of the microspheres in combination with other chemotherapeutic drugs.

The image features a minimalist abstract design. Three overlapping circles are arranged in a triangular pattern. Each circle is composed of three concentric layers: a dark gray inner circle, a light gray middle ring, and a medium gray outer ring. Two thin, light gray lines intersect at the center of the composition, forming an 'X' shape that passes through the circles. The background is plain white.

VIII. CONCLUSIONES
VIII. CONCLUSIONS

1. Se ha definido y puesto a punto un método analítico por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) para la cuantificación de cannabidiol y de Δ^9 -tetrahidrocannabinol como materias primas, encapsulados en micropartículas o liberados en los ensayos de cesión realizados *in vitro*. El método resultó ser específico, y lineal, preciso y exacto en un intervalo de concentraciones de 0,7 a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
2. Se han desarrollado micropartículas de poli- ϵ -caprolactona y los cannabinoides cannabidiol y Δ^9 -tetrahidrocannabinol, mediante el método de emulsión-evaporación basado en la formación de emulsiones O/A. Estas micropartículas se presentan como un producto pulverulento, de flujo libre, fácil de pesar y manipular, de fácil suspensión en medio acuoso y con un tamaño adecuado para su administración subcutánea.
3. Debido al efecto plastificante del cannabidiol y del Δ^9 -tetrahidrocannabinol sobre el polímero, al aumentar el contenido en cannabinoide en las micropartículas se produjo un incremento en la agregación de las mismas. Por ello, la carga máxima alcanzada, sin que se viera comprometida la fluidez del producto, fue de 17 mg de principio activo/100 mg de microesferas.
4. Todos los sistemas desarrollados han mostrado una liberación prolongada del principio activo *in vitro* durante al menos 2 semanas. La adición de un 5% de vitamina E acetato como antioxidante a las micropartículas de Δ^9 -tetrahidrocannabinol pareció aumentar la estabilidad del fármaco, no influyendo en los perfiles de cesión.
5. Los ensayos realizados en cultivos celulares pusieron de manifiesto la eficacia de las micropartículas de cannabidiol y de Δ^9 -tetrahidrocannabinol como sistemas de liberación prolongada, al mostrar un efecto citotóxico sobre las líneas celulares MDA-MB-231, RBL-2H3 y Caco-2 durante al menos 7 días.
6. Los estudios realizados *in vivo*, en un modelo ectópico de glioblastoma humano en ratón, han demostrado la eficacia antitumoral de las micropartículas de cannabidiol y de Δ^9 -tetrahidrocannabinol como sistemas de

liberación prolongada. A partir del día 14 de estudio disminuyó de forma significativa el crecimiento tumoral en los ratones tratados con cannabinoides, no observándose diferencias entre la eficacia de la administración diaria del fármaco en solución y la administración cada 5 días de las micropartículas.

7. Por último, se puede concluir que la formulación de micropartículas de cannabidiol con una proporción de principio activo-polímero 15/150, y la formulación de micropartículas de Δ^9 -tetrahidrocannabinol con una proporción de principio activo-polímero 15/150 y 5% de vitamina E acetato serían una buena alternativa para la administración ambos cannabinoides en comparación con las opciones existentes. Estos sistemas resultan de interés tanto para la investigación de nuevos usos terapéuticos de estos compuestos, como para su empleo en clínica.

1. A reversed-phase high pressure liquid chromatography method to quantify either cannabidiol or Δ^9 -tetrahydrocannabinol as raw materials, encapsulated into microspheres or released during the *in vitro* release experiments has been defined. The method was found to be specific, linear, precise and accurate over a concentration range of 0.7-15 $\mu\text{g/mL}$.
2. Cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol poly- ϵ -caprolactone microparticles with a suitable size for their subcutaneous injection were developed by the oil-in-water emulsion-solvent evaporation method. These microparticles are presented as a free-flowing powdered product easy to handle, to weigh and to resuspend in an aqueous medium.
3. Due to the plasticant effect of cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the polymer, an increase in microparticles aggregation when increasing cannabinoid content was shown. As a result, the maximum loading of the microspheres, without jeopardizing product fluidity was 17 mg of drug/100 mg of microspheres.
4. All the systems showed a prolonged release of the drug *in vitro* for at least 2 weeks. The addition of 5% vitamin E acetate as antioxidant to the microspheres seemed to increase drug stability without affecting drug release profiles.
5. Cell culture studies revealed the efficacy of cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol microparticles as prolonged release delivery systems, as they showed a cytotoxic effect on MDA-MB-231, RBL-2H3 y Caco-2 tumor cell lines during at least 1 week.
6. *In vivo* studies performed in an ectopic mouse model of human glioblastoma, demonstrated the antitumoral efficacy of the cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol microparticles, as prolonged release delivery systems. From day 14th tumor growth significantly decreased in the cannabinoid-treated groups. No differences were observed between the daily administration of the cannabinoid in solution and the administration of cannabinoid-loaded microparticles every 5 days.

7. Finally, it can be concluded that the cannabidiol microparticles -prepared from a 15/150 drug-to-polymer ratio-, and the Δ^9 -microparticles -prepared from a 15/150 drug-to-polymer ratio and 5% vitamin E acetate- may represent a good alternative for cannabinoid administration in comparison with current options. These formulations would be useful not only for the investigation of new therapeutic uses of these compounds, but also for their clinical application.

The page features an abstract graphic design consisting of three overlapping circles of varying sizes, each with a dark gray center and a lighter gray outer ring. These circles are positioned in the upper right, middle right, and lower right areas. Two thin, light gray lines intersect to form an 'X' shape across the page, with the circles partially overlapping these lines.

IX. BIBLIOGRAFÍA
IX. REFERENCES

- Adams IB, Martin BR (1996). Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* **91**(11): 1585-1614. doi:10.1111/j.1360-0443.1996.tb02264.x.
- Agurell S, Halldin M, Lindgren J-E, Ohlsson A, Widman M, Gillespie H, Hollister LE (1986). Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol Rev* **38**(1): 21-43.
- Alexander A, Smith PF, Rosengren RJ (2009). Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Lett* **285**(1): 6-12. doi:10.1016/j.canlet.2009.04.005.
- Ali SAM, Zhong S-P, Doherty PJ, Williams DF (1993). Mechanisms of polymer degradation in implantable devices. I. Poly(caprolactone). *Biomaterials* **14**(9): 648-656. doi:10.1016/0142-9612(93)90063-8.
- Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ (2003). The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol* **2**(5): 291-298. doi:10.1016/S1474-4422(03)00381-8.
- Bealieu P (2005). Toxic effects of cannabis and cannabinoids: Animal data. *Pain Res Manag* **10**(Suppl A): 23A-26A.
- Ben Amar M (2006). Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol* **105**(1-2): 1-25. doi:10.1016/j.jep.2006.02.001.
- Benoit MA, Baras B, Gillard J (1999). Preparation and characterization of protein-loaded poly([var epsilon]-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **184**(1): 73-84. doi:10.1016/S0378-5173(99)00109-X.
- Bifulco M, Di Marzo V (2002). Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: A call for further research. *Nature Medicine* **8**: 547-550. doi:10.1038/nm0602-547.
- Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* **134**(4): 845-852. doi:10.1038/sj.bjp.0704327.
- Blanco MD, Bernardo MV, Sastre RL, Olmo R, Muñoz E, Teijón JM (2003). Preparation of bupivacaine-loaded poly(ε-caprolactone) microspheres by spray drying: drug release studies and biocompatibility. *Eur J Pharm Biopharm* **55**(2): 229-236. doi:10.1016/S0939-6411(02)00169-8.
- Brenneisen R (2001). Pharmakokinetik. In: *Cannabis und Cannabinoide. Pharmakologie, Toxikologie und Therapeutisches Potenzial.*, Grotenhermen, F, Russo, E (eds), pp 87-92. Bern: Göttingen: Hans Huber Verlag.

- Carlini EA (2004). The good and the bad effects of (-) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) on humans. *Toxicol* **44**: 461-467. doi:10.1016/j.toxicol.2004.05.009.
- Carter GT, Weydt P, Kyashna-Tocha M, Abrams DI (2004). Medicinal cannabis: rational guidelines for dosing. *IDrugs* **7**(5): 464-470.
- Clifford CJ, Downes S (1996). A comparative study of the use of colorimetric assays in the assessment of biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* **7**: 637-643.
- Costa B, Trovato AE, Comelli F, Giagnoni G, Colleoni M (2007). The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* **556**(1-3): 75-83. doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.006.
- Costa P, Sousa Lobo JM (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* **13**(2): 123-133. doi:10.1016/S0928-0987(01)00095-1.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **384**(6604): 83-87. doi:10.1038/384083a0.
- Chen DR, Bei JZ, Wang SG (2000). Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. *Polym Degr Stab* **67**: 455-459.
- D'Souza SS, DeLuca PP (2006). Methods to Assess in Vitro Drug Release from Injectable Polymeric Particulate Systems. *Pharm Res* **23**(3): 460-474. doi:10.1007/s11095-005-9397-8.
- Darwis D, Mitomo H, Enjoji T, Yoshi F, Makuuchi K (1998). Enzymatic degradation of radiation crosslinked poly(epsilon-caprolactone). *Polym Degrad Stab* **67**(62): 259-265.
- Davis MP (2008). Oral nabilone capsules in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting and pain. *Expert Opin Investig Drugs* **17**(1): 85-95. doi:10.1517/13543784.17.1.85.
- De Backer B, Debrus B, Lebrun P, Theunis L, Dubois N, Decock L, Verstraete A, Hubert P, Charlier C (2009). Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography B* **877**(32): 4115-4124. doi:10.1016/j.jchromb.2009.11.004.
- De Meijer EPM, Hammond KM, Sutton A (2009). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (IV): cannabinoid-free plants *Euphytica* **18**(1): 95-112. doi:10.1007/s10681-009-9894-7.

- De Petrocellis L, Di Marzo V (2009). An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **23**(1): 1-15. doi:10.1016/j.beem.2008.10.013.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**(5090): 1946-1949. doi: 10.1126/science.1470919.
- Dewey WL (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* **38**(2): 151-178.
- Dhanaraju MD, Vema K, Jayakumar R, Vamsadhara C (2003). Preparation and characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones. *Int J Pharm* **268**(1-2): 23-29. doi:10.1016/j.ijpharm.2003.08.011.
- Di Marzo V (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* **7**(5): 438-455. doi:10.1038/nrd2553.
- Di Marzo V, Bifulco M, Petrocellis LD (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* **3**(9): 771-784. doi:10.1038/nrd1495.
- Dubernet C (1995). Thermoanalysis of microspheres. *Termochim Acta* **248**: 259-269.
- Durán N, De Oliveira AF, De Azevedo MM (2006). In vitro studies on the release of isoniazid incorporated in poly(epsilon-caprolactone). *J Chemother* **18**(5): 473-479.
- ElSohly MA, Little Jr TL, Hikal A, Harland E, Stanford DF, Walker L (1991). Rectal bioavailability of delta-9-tetrahydrocannabinol from various esters. *Pharmacol Biochem Behav* **40**(3): 497-502. doi:10.1016/0091-3057(91)90353-4.
- Fairbairn JW, Liebmann JA, Rowan MG (1976). The stability of cannabis and its preparations on storage. *J Pharm Pharmacol* **28**: 1-7.
- FDA. *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*. (1994) Washington DC: Food and Drug Administration.
- Flora KP, Craddock JC, Davignon JP (1981). Determination of delta 9-tetrahydrocannabinol in pharmaceutical vehicles by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **206**(1): 117-123.
- Flygare J, Sander B (2008). The endocannabinoid system in cancer--Potential therapeutic target? *Seminars in Cancer Biology* **18**(3): 176-189.
- Freimuth N, Ramer R, Hinz B (2009). Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*: -. doi:10.1124/jpet.109.157735.

- Freitas S, Merkle HP, Gander B (2005). Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release* **102**(2): 313-332. doi:10.1016/j.jconrel.2004.10.015.
- Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M (2000). Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Medicine* **6**: 313-319. doi:10.1038/73171.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*: 1636-1647.
- Garrett ER, Hunt A (1974a). Physicochemical properties, solubility, and protein binding of D9-Tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci* **63**: 1056-1064.
- Garrett ER, Tsau J (1974b). Stability of Tetrahydrocannabinols I. *J Pharm Sci* **63**(10).
- Gill EW, Jones G (1972). Brain levels of Δ^1 -THC and its metabolites in mice. *Biochem Pharmacol* **21**: 2237- 2248.
- Grant I, Cahn BR (2005). Cannabis and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges. *Clin Neurosci Res* **5**(2-4): 185-199. doi:10.1016/j.cnr.2005.08.015.
- Grignard B, Stassin F, Calberg C, Jérôme R, Jérôme C (2008). Synthesis of Biodegradable Poly-epsilon-caprolactone Microspheres by Dispersion Ring-Opening Polymerization in Supercritical Carbon Dioxide. *Biomacromolecules* **9**(11): 3141-3149. doi:10.1021/bm800730m.
- Grotenhermen F (2005). Cannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**(5): 507-530.
- Grotenhermen F (2006). Cannabinoids and the Endocannabinoid System. *Cannabinoids* **1**(1): 10-14.
- Grotenhermen F (2004). Cannabinoids for Therapeutic Use. Designing Systems to Increase Efficacy and Reliability. *Am J Drug Deliv* **2**(4): 229-240.
- Grotenhermen F (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin pharmacokinet* **42**(4): 327-360.
- Grotenhermen F (2001). Review of Unwanted Actions of Cannabis and THC. In: *Cannabis und Cannabinoide. Pharmakologie, Toxikologie und Therapeutisches Potenzial.*, Grotenhermen, F, Russo, E (eds) Vol. 87-92, pp 233-243. Bern: Göttingen: Hans Huber Verlag.

- Guzmán M (2003). Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* **3**(10): 745-755. doi:10.1038/nrc1188.
- Guzmán M, Duarte MJ, Blazquez C, Ravina J, Rosa MC, Galve-Roperh I, Sanchez C, Velasco G, Gonzalez-Feria L (2006). A pilot clinical study of [Delta]9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Br J Cancer* **95**(2): 197-203. doi:10.1038/sj.bjc.6603236.
- Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I (2002). Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther* **95**(2): 175-184. doi:10.1016/S0163-7258(02)00256-5.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998). Cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(14): 8268-8273.
- Harvey D (1984). Chemistry, metabolism, and pharmacokinetics of the cannabinoids. In: *Marihuana in science and medicine*, Naha, G (ed), pp 37-107. New York: Raven Press.
- Harvey DJ (1990). Stability of cannabinoids in dried samples of cannabis dating from around 1896-1905. *J Ethnopharmacol.* **28**(1): 117-128. doi:10.1016/0378-8741(90)90068-5.
- Harvey DJ, Brown NK (1991). Comparative in vitro metabolism of the cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav* **40**(3): 533-540. doi:10.1016/0091-3057(91)90359-A.
- Hazekamp A, Peltenburg A, Verpoorte R, Giroud C (2005). Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *J Liquid Chromatography & Related Tech* **28**: 2361-2382. doi:10.1080/10826070500187558.
- Hazekamp A, Verpoorte R (2006). Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated [beta]-cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci* **29**(5): 340-347. doi:10.1016/j.ejps.2006.07.001.
- Hernán D (2007). Los cannabinoides en terapéutica: ventajas de su formulación en sistemas de liberación controlada. Madrid: DEA Universidad Complutense de Madrid.
- Higuchi T (1963). Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci* **52**: 1145-1149.
- Higuchi T (1961). Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J Pharm Sci* **50**: 874-875.
- Hombreiro Pérez M, Zinutti C, Lamprecht A, Ubrich N, Astier A, Hoffman M, Bodmeier R, Maincent P (2000). The preparation and evaluation of poly(epsilon-caprolactone)

- microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *Journal of Controlled Release* **65**(3): 429-438. doi:10.1016/S0168-3659(99)00253-9.
- Howlett AC (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 619-631.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev* **54**(2): 161-202. doi:10.1124/pr.54.2.161.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* **47**(Supplement 1): 345-358. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.07.030.
- Huestis M (2005a). Pharmacokinetics and Metabolism of the Plant Cannabinoids Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Cannabinol. In: *Cannabinoids*, Pertwee, RG (ed) Vol. 168, pp 657-690. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- Huestis M (1999). Pharmacokinetics of THC in inhaled and oral preparations. In: *Marihuana and medicine*, G.G. Nahas, DH, S. Agurell (ed), pp 105-116. Totowa, NJ: Humana Press.
- Huestis MA (2007). Human Cannabinoid Pharmacokinetics. *Chem Biodivers* **4**(8): 1770-1804. doi:10.1002/cbdv.200790152.
- Huestis MA (2005b). Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids, delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Handb Exp Pharmacol* **168**: 657-690.
- ICH Q2 (R1)*. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 1994. London: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.
- Iuvone T, Esposito G, De Filippis D, Scuderi C, Steardo L (2009). Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neurosci Ther* **15**: 65-75. doi:10.1111/j.17555-5949.2008.00065.x.
- Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R (2009). Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci* **30**(10): 515-527. doi:10.1016/j.tips.2009.07.006.
- Jarho P, Pate DW, Brenneisen R, Jarvinen T (1998). Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and its combination with hydroxypropyl-methylcellulose increases aqueous solubility of delta9-tetrahydrocannabinol. *Life Sci* **63**(26): PL381-384.

- Järvinen T, Pate DW, Laine K (2002). Cannabinoids in the treatment of glaucoma. *Pharmacol Ther.* **95**(2): 203-220. doi:10.1016/S0163-7258(02)00259-0.
- Jeong J-C, Lee J, Cho K (2003). Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *J Control Release* **92**(3): 249-258. doi:10.1016/S0168-3659(03)00367-5.
- Kim BK, Hwang SJ, Park JB, Park HJ (2005). Characteristics of felodipine-located poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *J Microencapsul* **22**(2): 193 - 203. doi:10.1080/02652040400015346.
- Kissel T (2006). In: *Microencapsulation. Methods and Industrial Applications. Drugs and The Pharmaceutical Sciences.*, Benita, S (ed) Vol. 158, p 99. New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002). The WHO Classification of Tumors of the Nervous System *J Neuropathol Exp Neurol* **61**(3): 215-225.
- Klein TW, Newton CA (2007). Therapeutic potential of cannabinoid-based drugs. *Adv Exp Med Biol* **601**: 395-413.
- Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA (1983). Mechanisms of soluble release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm* **15**: 25-35.
- Lastres-Becker I, Fernandez-Ruiz J (2006). An Overview of Parkinson's Disease and the Cannabinoid System and Possible Benefits of Cannabinoid-Based Treatments *Curr Med Chem* **13**(30).
- Li Z, Li Q, Simon S, Guven N, Borges K, Youan B-BC (2007). Formulation of spray-dried phenytoin loaded poly(ϵ -caprolactone) microcarrier intended for brain delivery to treat epilepsy. *J Pharm Sci* **96**(5): 1018-1030. doi:10.1002/jps.20935.
- Lichtman AH, Peart J, Poklis JL, Bridgen DT, Razdan RK, Wilson DM, Poklis A, Meng Y, Byron PR, Martin BR (2000). Pharmacological evaluation of aerosolized cannabinoids in mice. *Eur J Pharmacol* **399**(2-3): 141-149. doi:10.1016/S0014-2999(00)00321-6.
- Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V (2006). Antitumor Activity of Plant Cannabinoids with Emphasis on the Effect of Cannabidiol on Human Breast Carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* **318**(3): 1375-1387. doi:10.1124/jpet.106.105247.
- Lodzki M, Godin B, Rakou L, Mechoulam R, Gallily R, Touitou E (2003). Cannabidiol--transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *J Control Release* **93**(3): 377-387. doi:10.1016/j.jconrel.2003.09.001.

- Mackie K (2008a). Cannabinoid Receptors: Where They are and What They do. *J Neuroendocrinol* **20**(s1): 10-14. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01671.x.
- Mackie K (2008b). Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol Cell Endocrinol* **286**(1-2 Suppl 1): S60-65. doi:10.1016/j.mce.2008.01.022.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* **15**(11): 1311-1333. doi:10.1101/gad.891601.
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, Feldmann M (2000). The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritis therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(17): 9561-9566.
- Mannila J, Järvinen T, Järvinen K, Jarho P (2007). Precipitation complexation method produces cannabidiol/beta-cyclodextrin inclusion complex suitable for sublingual administration of cannabidiol. *J Pharm Sci* **96**(2): 312-319. doi:10.1002/jps.20766.
- Mannila J, Järvinen T, Järvinen K, Tarvainen M, Jarho P (2005). Effects of RM- β -CD on sublingual bioavailability of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rabbits. *Eur J Pharm Sci* **26**(1): 71-77. doi:10.1016/j.ejps.2005.04.020.
- Mannila J, Järvinen T, Järvinen K, Tervonen J, Jarho P (2006). Sublingual administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol/ β -cyclodextrin complex increases the bioavailability of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rabbits. *Life Sci* **78**(17): 1911-1914. doi:10.1016/j.lfs.2005.08.025.
- Martin BR, Compton DR, Little PJ, Martin TJ, Beardsley PM (1987). Pharmacological evaluation of agonistic and antagonistic activity of cannabinoids. *NIDA Res Monogr* **79**: 108-122.
- Martin BR, Lichtman AH (1998). Cannabinoid Transmission and Pain Perception. *Neurobiol Dis* **5**(6): 447-461. doi:10.1006/nbdi.1998.0218.
- Massi P, Vaccani A, Ceruti S, Colombo A, Abbracchio MP, Parolaro D (2004). Antitumor Effects of Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid, on Human Glioma Cell Lines. *J Pharmacol Exp Ther* **308**(3): 838-845. doi:10.1124/jpet.103.061002.
- Mathew ST, Devi SG, KV S (2007). Formulation and evaluation of ketorolac tromethamine-loaded albumin microspheres for potential intramuscular administration. *AAPS PharmSciTech* **8**(1): 14. doi:10.1208/pt0801014.

- Mathew ST, Gayathri Devi S, Prasanth VV, Vinod B (2009). Formulation and in vitro-in vivo evaluation of ketoprofen-loaded albumin microspheres for intramuscular administration. *J Microencapsul* **26**(5): 456-469. doi:10.1080/02652040802420367.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**(6284): 561-564. doi:10.1038/346561a0.
- Mattes RD, Shaw LM, Edling-Owens J, Engelman K, Elsohly MA (1993). Bypassing the first-pass effect for the therapeutic use of cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav* **44**(3): 745-747. doi:10.1016/0091-3057(93)90194-X.
- McAllister SD, Chan C, Taft RJ, Luu T, Abood ME, Moore DH, Aldape K, Yount G (2005). Cannabinoids selectively inhibit proliferation and induce death of cultured human glioblastoma multiforme cells. *J Neurooncol* **74**(1): 31-40. doi:10.1007/s11060-004-5950-2.
- McGilveray IJ (2005). Pharmacokinetics of cannabinoids. *Pain Res Manag* **10**(A): 15A-22A.
- McPartland J, Russo EB (2001). Cannabis and cannabis extracts: Greater than the sum of their parts? . *J Cannabis Ther* **1**(3-4): 103-132.
- Mechoulam R (1981). Chemistry of Cannabis. *Handbook Exp Pharmacol* **55**: 119-134.
- Mechoulam R (1970). Marihuana chemistry. *Science* **168**(936): 1159-1166.
- Mechoulam R, Hanus L (2002a). Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. *Chem Phys Lipids* **121**(1-2): 35-43. doi:10.1016/S0009-3084(02)00144-5.
- Mechoulam R, Hanus L, Fride E (1998). Towards cannabinoid drugs-revisited. *Prog Med Chem* **35**: 199-243.
- Mechoulam R, Parker L, Gallily R (2002b). Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol* **42**(90110): S11-19.
- Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO (2007). Cannabidiol - Recent Advances. *Chem Biodivers* **4**(8): 1678-1692. doi:10.1002/cbdv.200790147
- Mechoulam R, Shvo Y (1963). Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* **19**: 2073-2078.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

- Mundargi RC, Srirangarajan S, Agnihotri SA, Patil SA, Ravindra S, Setty SB, Aminabhavi TM (2007). Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly([epsilon]-caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: In vitro and in vivo studies. *J Control Release* **119**(1): 59-68. doi:10.1016/j.jconrel.2007.01.008.
- Munjal M, ElSohly MA, Repka MA (2006a). Chemical stabilization of a Delta9-Tetrahydrocannabinol prodrug in polymeric matrix systems produced by a hot-melt method: Role of microenvironment pH. *AAPS PharmSciTech* **7**(3). doi:10.1208/pt070371.
- Munjal M, ElSohly MA, Repka MA (2006b). Polymeric systems for amorphous Delta-9-tetrahydrocannabinol produced by a hot-melt method. Part II: Effect of oxidation mechanisms and chemical interactions on stability. *J Pharm Sci* **95**(11): 2473-2485. doi:10.1002/jps.20711.
- Munjal M, Stodghill SP, ElSohly MA, Repka MA (2006c). Polymeric systems for amorphous Delta-9-tetrahydrocannabinol produced by a hot-melt method. Part I: Chemical and thermal stability during processing. *J Pharm Sci* **95**(8): 1841-1853. doi:10.1002/jps.20667.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**(6441): 61-65. doi:10.1038/365061a0.
- Munson AE, Harris LS, Friedman MA, Dewey WL, Carchman RA (1975). Antineoplastic activity of cannabinoids. *J Natl Cancer Inst* **55**(3): 597-602.
- Naef M, Russmann S, Petersen-Felix S, Brenneisen R (2004). Development and pharmacokinetic characterization of pulmonary and intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans. *J Pharm Sci* **93**(5): 1176-1184. doi:10.1002/jps.20037.
- Nocerino E, Amato M, Izzo AA (2000). Cannabis and cannabinoid receptors. *Fitoterapia* **71**(Supplement 1): S6-S12. doi:10.1016/S0367-326X(00)00171-4.
- Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK (1980). Plasma delta-9-tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clin Pharmacol Ther* **28**: 409-416.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G (2006). The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* **58**(3): 389-462. doi:10.1124/pr.58.3.2.
- Parolaro D, Massi P (2008). Cannabinoids as potential new therapy for the treatment of gliomas. *Expert Rev Neurother* **8**(1): 37-49. doi:10.1586/14737175.8.1.37.

- Patsos HA, Hicks DJ, Greenhough A, Williams AC, Paraskeva C (2005). Cannabinoids and cancer: potential for colorectal cancer therapy. *Biochem Soc Trans* **33**(4): 712-714.
- Pérez J (2006). Combined cannabinoid therapy via an oromucosal spray. *Drugs of today* **42**(8): 495. doi:10.1358/dot.2006.42.8.1021517.
- Persenaire O, Alexandre M, Degee P, Dubois P (2001). Mechanisms and Kinetics of Thermal Degradation of Poly(ϵ -caprolactone). *Biomacromolecules* **2**(1): 288-294. doi:10.1021/bm0056310.
- Pertwee R (2008). The diverse CB₁ and CB₂ receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* **153**(2): 199-215. doi: 10.1038/sj.bjp.0707442.
- Pertwee RG (2006). Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* **147**(S1): S163-S171. doi: 10.1038/sj.bjp.0706406.
- Pertwee RG (2009). Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br J Pharmacol* **156**(3): 397-411. doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00048.x.
- Pertwee RG (2004) The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. In: *Cannabinoids*, Di Marzo, V (ed). Dordrecht (Netherlands): Kluwer Academic Publishers.
- Pertwee RG (1997). Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol Ther* **74**(2): 129-180. doi:10.1016/S0163-7258(97)82001-3.
- Pertwee RG (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* **6**(8): 635-664.
- Pertwee RG, Ross RA (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **66**(2-3): 101-121. doi:10.1054/plef.2001.0341.
- Pisanti S, Bifulco M (2009). Endocannabinoid system modulation in cancer biology and therapy. *Pharmacol Res* **60**(2): 107-116. doi:10.1016/j.phrs.2009.03.011.
- Pitt CG (1990). Biodegradable Polymers as drug delivery systems, pp 71-120. New York: Marcel Dekker.
- Pitt CG, Chasalow FI, Hibionada YM, Klimas DM (1981). Aliphatic polyesters I: The degradation of Poly- ϵ -caprolactone In Vivo *J Polymer Appl Sci* **26**: 3779-3787. doi:10.1002/app.1981.070261124.
- Pitt CG, Gratzl MM, Jeffcoat AR, Zweidinger R, Schindler A (1979a). Sustained drug delivery systems II: Factors affecting release rates from poly(ϵ -caprolactone) and related biodegradable polyesters. *J Pharm Sci* **68**(12): 1534-1538.

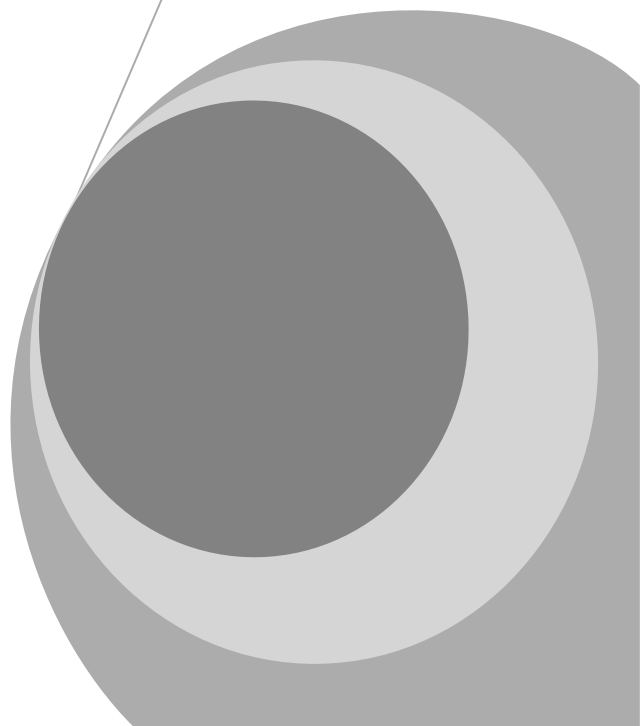
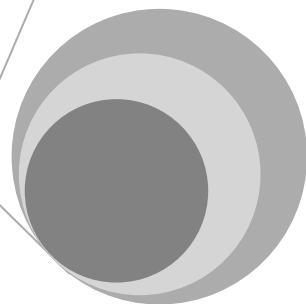
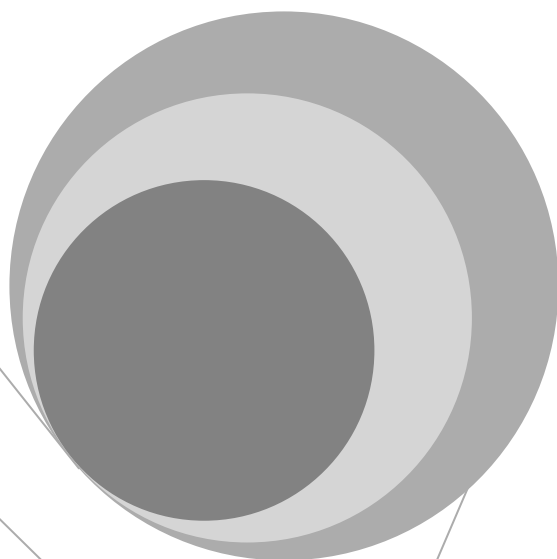
- Pitt CG, Jeffcoat AR, Zweidinger RA, Schindler A (1979b). Sustained drug delivery systems. I. The permeability of poly(epsilon-caprolactone), poly(DL-lactic acid), and their copolymers. *J Biomed Mater Res* **13**(3): 497-507.
- Rashidi H, Duetz WA, Verpoorte R (2005). Production of more soluble cannabinoids by bacterial biotransformation. In: *IACM 3rd Conference on Cannabinoids in Medicine*. Leiden University.
- Razdan RK (2009). The cannabinoid receptors. In: *The cannabinoid receptors*, Reggio, PH (ed), p 402: Humana Press.
- Razdan RK (1972). Cannabinoids. *Experientia* **28**(2): 121-122.
- Repka MA, Munjal M, ElSohly MA, Ross SA (2006). Temperature Stability and Bioadhesive Properties of Delta-9-Tetrahydrocannabinol Incorporated Hydroxypropylcellulose Polymer Matrix Systems. *Drug Dev Ind Pharm.* **32**(1): 21 - 32. doi: 10.1080/03639040500387914.
- Russo E, Guy GW (2006). A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses* **66**(2): 234-246. doi:10.1016/j.mehy.2005.08.026.
- Russo EB, McPartland J (2003). Cannabis is more than simply Δ^9 -tetrahydrocannabinol *Psychopharmacology* **165**(4): 431-432. doi:10.1007/s00213-002-1348-z.
- Sacerdote P, Martucci C, Vaccani A, Bariselli F, Panerai AE, Colombo A, Parolaro D, Massi P (2005). The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. *J Neuroimmunol* **159**(1-2): 97-105. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.10.003.
- Samara E, Bialer M, Mechoulam R (1988). Pharmacokinetics of cannabidiol in dogs. *Drug Metab Dispos* **16**(3): 469-472.
- Scuderi C, De Filippis D, Iuvone T, Blasio A, Steardo A, Esposito G (2008). Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders. *Phytother Res.* **23**(5):597-602. doi:10.1002/ptr.2625.
- Scully C (2007). Cannabis; adverse effects from an oromucosal spray. *Br Dent J* **203**(6): E12-E12.
- Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Liu J-P (1998). In Vitro Dissolution Profile Comparison—Statistics and Analysis of the Similarity Factor, *f2 Pharm Res* **15**(6): 889-896. doi:10.1023/A:1011976615750.

- Shi Y, Li LC (2005). Current advances in sustained-release systems for parenteral drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2**(6): 1039-1058. doi:10.1517/17425247.2.6.1039.
- Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A (2004). Poly-[epsilon]-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm* **278**(1): 1-23. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.01.044.
- Smith RN, Vaughan CG (1977). The decomposition of acidic and neutral cannabinoids in organic solvents. *J Pharm Pharmacol* **29**(5): 286-290.
- Srivastava MD, Srivastava BIS, Brouhard B (1998). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology* **40**(3): 179-185. doi:10.1016/S0162-3109(98)00041-1.
- Stinchcomb AL, Valiveti S, Hammell DC, Ramsey DR (2004). Human skin permeation of Delta8-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *J Pharm Pharmacol* **56**: 291-297. doi:10.1211/0022357022791.
- Stott CG, Guy GW (2004). Cannabinoids for the pharmaceutical industry. *Euphytica* **140**: 83-93. doi:10.1007/s10681-004-4757-8.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006). Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* **45**(5): 405-446. doi:10.1016/j.plipres.2006.03.003.
- Szallasi A, Di Marzo V (2000). New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends Neurosci* **23**(10): 491-497 doi:10.1016/S0166-2236(00)01630-1
- Tewes F, Boury F, Benoit JP (2006). In: *Microencapsulation. Methods and Industrial Applications. Drugs and The Pharmaceutical Sciences*, Benita, S (ed) Vol. 158, p 2. New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* **150**(5): 613-623. doi:10.1038/sj.bjp.0707133.
- Thomas BF, Compton DR, Martin BR (1990). Characterization of the lipophilicity of natural and synthetic analogs of delta 9-tetrahydrocannabinol and its relationship to pharmacological potency. *J Pharmacol Exp Ther* **255**(2): 624-630.
- Thumma S, Majumdar S, ElSohly MA, Gul W, Repka MA (2008a). Chemical stability and bioadhesive properties of an ester prodrug of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in poly(ethylene oxide) matrices: effect of formulation additives. *Int J Pharm* **362**(1-2): 126-132. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.06.025.

- Thumma S, Majumdar S, ElSohly MA, Gul W, Repka MA (2008b). Preformulation studies of a prodrug of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. *AAPS PharmSciTech* **9**(3): 982-990. doi:10.1208/s12249-008-9136-7.
- Turner C, ElSohly M (1979). Constituents of *Cannabis sativa* L. XVI. A possible decomposition pathway of Δ^9 -tetrahydrocannabinol to cannabinol. *J Heterocyclic Chemistry* **16**: 1667-1668. doi:10.1002/jhet.5570160834.
- The United States Pharmacopeia 31 NF26* (2008). United States Pharmacopeial Convention: Rockville.
- Vaccani A, Massi P, Colombo A, Rubino T, Parolaro D (2005). Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol* **144**(8): 1032-1036. doi:10.1038/sj.bjp.0706134.
- Valiveti S, Hammell DC, Earles DC, Stinchcomb AL (2004). In vitro-in vivo correlation studies for transdermal Δ^8 -THC development. *J Pharm Sci* **93**(5): 1154-1164. doi:10.1002/jps.20036.
- van Drooge D-J, Hinrichs WLJ, Dickhoff BHJ, Elli MNA, Visser MR, Zijlstra GS, Frijlink HW (2005). Spray freeze drying to produce a stable Δ^9 -tetrahydrocannabinol containing inulin-based solid dispersion powder suitable for inhalation. *Eur J Pharm Sci* **26**(2): 231-240. doi:10.1016/j.ejps.2005.06.007.
- van Drooge DJ, Hinrichs WLJ, Wegman KAM, Visser MR, Eissens AC, Frijlink HW (2004). Solid dispersions based on inulin for the stabilisation and formulation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Eur J Pharm Sci* **21**(4): 511-518. doi:10.1016/j.ejps.2003.11.014
- Varvel SA, Bridgen DT, Tao Q, Thomas BF, Martin BR, Lichtman AH (2005). Delta-9-Tetrahydrocannabinol Accounts for the Antinociceptive, Hypothermic, and Cataleptic Effects of Marijuana in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* **314**(1): 329-337. doi:10.1124/jpet.104.080739.
- Velasco G, Carracedo A, Blazquez C, Lorente M, Aguado T, Haro A, Sanchez C, Galve-Roperh I, Guzman M (2007). Cannabinoids and gliomas. *Mol Neurobiol* **36**(1): 60-67. doi:10.1007/s12035-007-0002-5.
- Velasco G, Galve-Roperh I, Sánchez C, Blázquez C, Guzmán M (2004). Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas? *Neuropharmacology* **47**(3): 315-323. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.04.016.
- Voth EA, Schwartz RH (1997). Medicinal Applications of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Marijuana. *Ann Intern Med* **126**(10): 791-798.

- Walsh D, Nelson K, Mahmoud F (2003). Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology. *Support Care Cancer* **11**(3): 137-143. doi:10.1007/s00520-002-0387-7.
- Watson SJ, Benson JA, Jr., Joy JE (2000). Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. *Arch Gen Psychiatry* **57**(6): 547-552.
- Watts PJ, Davies MC, Melia CD (1990). Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **7**(3): 235-259.
- Wilson DM, Peart J, Martin BR, Bridgen DT, Byron PR, Lichtman AH (2002). Physiochemical and pharmacological characterization of a Δ^9 -THC aerosol generated by a metered dose inhaler. *Drug Alcohol Depend* **67**(3): 259-267. doi:10.1016/S0376-8716(02)00078-9.
- Wnek GE, Bowlin GL (2004). In: *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* Vol. 3, 2nd edn. New York: Marcel Dekker.
- Zhang Y, Zhang Y, Guo S, Huang W (2008). Tyrosine kinase inhibitor loaded PCL microspheres prepared by S/O/W technique using ethanol as pretreatment agent. *Int J Pharm* **369**(1-2): 19-23. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.10.032.
- Zoller O, Rhyn P, Zimmerli B (2000). High-performance liquid chromatographic determination of delta9-tetrahydrocannabinol and the corresponding acid in hemp containing foods with special regard to the fluorescence properties of delta9-tetrahydrocannabinol. *J Chromatogr A* **872**(1-2): 101-110.
- Zuardi AW (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr* **28**(2): 153-157. doi:10.1590/S1516-44462006000200015.
- Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Moreira FA, Guimaraes FS (2006). Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res* **39**(4): 421-429. doi:10.1590/S0100-879X2006000400001.

ANEXO
APPENDIX



Pharmacokinetics of subcutaneous CBD administered in solution and encapsulated into (controlled-release) polymeric microparticles.

Dolores Hernán-Pérez de la Ossa^a, Justin L. Poklis^b, Aron H. Lichtman^b,
Billy R. Martin^b, M^a Esther Gil-Alegre^a, Ana Isabel Torres-Suárez^a.

^aDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Complutense University, Madrid, Spain.

^bDepartment of Pharmacology and Toxicology, School of Medicine, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA.

Cannabis sativa has been used in medicine since ancient times. During the last few years, resurgence into the therapeutic potential of cannabinoids has arisen. However, despite their interesting clinical potential no suitable dosage forms have been marketed so far. Thus, sustained release cannabidiol-loaded poly- ϵ -caprolactone microparticles were prepared by the oil-in-water emulsion-solvent evaporation technique. Cannabidiol in solution or cannabidiol-loaded microspheres were subcutaneously injected in the back of ICR mice in order to compare their CBD pharmacokinetic profiles. Determination of blood and brain CBD concentrations by LC-MS showed no drug in blood or brain 72h after CBD solution administration. However, drug levels were detected both in blood and brain for more than 10 days when 15/150 drug-loaded microspheres were administered. Pharmacokinetically, a significant increase of MRT (up to 7 times) of CBD with regard to the administration of the drug in solution was observed with the 30/150 microparticles

Therefore, cannabidiol-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres could be considered as a device to be used for long-term cannabinoid administration.

1. Introduction.

Cannabis sativa L. is one of the first plants to have been used as a medicine, for religious ceremonies or recreationally. In fact, references to the use of this plant date back over 12,000 years [1]. Despite a long history of medicinal use, the introduction of cannabinoids into modern medicine is only beginning.

The plant *Cannabis sativa* produces about 80 different terpenophenolic compounds named phytocannabinoids, including the psychoactive component Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), and other major non-psychoactive components, such as cannabidiol, cannabinol and cannabigerol [2-5]. The main limitation of the therapeutic utility of Cannabis and Δ^9 -THC, is the occurrence of psychoactive effects due to the activation of brain cannabinoid CB₁ receptors [6]. In contrast, cannabidiol (CBD) represents one of the main promising candidates for clinical utilization due to its remarkable lack of any cognitive and psychoactive actions together with its extremely safe profile in humans [3, 6-8]. In fact, it has been reported that CBD exerts several positive pharmacological effects that make it a highly attractive therapeutic entity in inflammation, nausea, pain, diabetes, ischemia, cancer and affective or neurodegenerative diseases, among others [2, 3, 6, 9, 10].

In spite of the promising pharmacological profile and the increasing clinical interest in cannabinoids, there are important practical difficulties associated with their use. Firstly, the high lipophilicity of these compounds (i.e. THC's solubility in 0.15M NaCl is only 0.77 mg/L) makes the use of nonaqueous solvents or dispersing agents necessary to prepare liquid formulations for their administration [11-15]. Secondly, most phytocannabinoids present a viscous sticky tar-like nature, which difficults their handling. This, together with their tendency to bind avidly to plastic, metal and glassware, makes difficult to accurately weigh small amounts and prepare solutions or suspensions for injection [16, 17]. Hence, one of the main challenges for the medicinal use of

cannabinoids is the development of a safe and effective method of administration [18, 19].

To date, the only commercially-available cannabinoid formulations are Marinol® (Solvay Pharmaceuticals), which is a soft gelatine capsule for oral administration that contains sesame oil in which THC is dissolved; and the oromucosal spray Sativex® (GW Pharmaceuticals) which contains THC and CBD in a 2.7:2.5 ratio. Marinol® shows a low and irregular bioavailability (6-20%) [20-22] due to the poor aqueous solubility of THC, its slow and erratic absorption and its extensive first pass metabolism [21, 23, 24]. In addition, one of its indications is for nausea and emesis in patients requiring chemotherapy, but swallowing capsules when nauseated is not extremely practical because of the difficulty in swallowing or keeping a pill down [25-28]. Relating to Sativex®, although the sublingual administration of cannabinoids is a useful method to bypass hepatic first-pass metabolism, it is difficult not only to dissolve the dose into the small volume of saliva (<1 ml) [29] but also to keep the dose at the intended site for a desirable duration [30].

Over the past two decades, much attention has been paid to biodegradable polymeric microspheres for parenteral drug administration. Microspheres are administered as an extemporaneous aqueous suspension prepared from a free-flowing easy to weigh powder. Biodegradable polymeric microspheres can control the drug release rate, thus prolonging the biological activity and decreasing the administration frequency as well as the drug side effects [31-34].

The aim of the present work was to evaluate the pharmacokinetics of subcutaneously administered CBD, either in solution or encapsulated into polymeric microspheres.

Although CBD pharmacokinetics after intravenous, oral or sublingual administration have been studied [23, 35, 36], to the best of our knowledge no

pharmacokinetic data relating to subcutaneous administration of cannabinoids have been published.

2. Materials and Methods.

Poly(ϵ -caprolactone) ($M_w=42,500$ g/mol), polyvinyl alcohol (PVA) and Sigmacote[®] were purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). Dichloromethane (HPLC grade), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), disodium hydrogen phosphate dihydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), Tween[®]-80 and acetic acid were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Cannabidiol and deuterated- Δ^9 -tetrahydrocannabinol were kindly supplied by THC-Pharm (Frankfurt, Germany) and Cerilliant (Texas, USA), respectively.

Acetonitrile and methanol HPLC grade were supplied by Lab-Scan (Dublin, Ireland).

Milli-Q[®] water (Millipore, Madrid, Spain) was used.

All chemicals and reagents were used as received.

2.1. Preparation and in vitro characterization of cannabidiol-loaded microspheres.

CBD-loaded microspheres were prepared by the oil-in-water emulsion-solvent evaporation method. Briefly, poly(ϵ -caprolactone) (500mg) and cannabidiol were dissolved in dichloromethane (5mL). The obtained solution was quickly poured into 250 mL of a 0.5% (w/v) PVA aqueous solution and kept agitating at a rate of 3,000 rpm (Polytron PT 3000, Kinematica[®] AG, Lucern, Switzerland) to form an O/W emulsion. The resulting emulsion was stirred with a double-bladed propeller (IKA[®] Laboratory Technology, Staufen, Germany) at 200 rpm for 3 h under ambient pressure for dichloromethane evaporation. Finally, the

microspheres formed were collected by filtration, washed three times with 50 mL of distilled water, and freeze-dried.

Two CBD-loaded formulations were prepared from different drug-to-polymer ratios, namely 15 or 30 mg CBD per 150 mg PCL.

The CBD microspheres were characterized in terms of size (by laser diffraction-Microtrac® SRA 150 Particle Size Analyser, Leeds & Northrup Instruments, Ireland), morphology (by scanning electron microscopy-Jeol-JSM-6400, Tokyo, Japan-), drug content (by a validated HPLC method) and *in vitro* drug release. *In vitro* drug release studies were performed by the sample and separate method. Briefly, fifteen milligrams of freeze-dried cannabinoid-loaded microparticles were suspended in 30 mL of release medium (PBS pH 7.4-Tween®80 0.1% w/v) in closed glass vials, and then immersed in a thermostatic shaking water bath (Clifton® NE5-28, United Kingdom) adjusted at 37°C, with continuous agitation at a rate of 100 rpm. At specific time intervals, the supernatants were withdrawn, filtered through 0.45 µm nylon filters (Teknokroma®, Barcelona, Spain) and analyzed for cannabinoid content by HPLC. The withdrawn volume was immediately replenished with an equal volume of fresh and pre-warmed buffer. From the *in vitro* release results, the $t_{x\%}$ parameters, corresponding to the time necessary for the release of a determined percentage of drug, and the dissolution efficiencies (ED_x) were calculated.

2.2. Animal experimental procedure.

Male ICR mice (Harlan Sprague Dawley Laboratories, Indianapolis, IN) weighing between 25 and 30 g served as subjects. Mice were housed in a temperature (20–22°C) and humidity-controlled, Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care-approved facility of Virginia Commonwealth University, in stainless steel cages in groups of four to six mice per cage on a 12-h light/dark cycle. Food and water were available ad libitum.

Prior to drug administration, the animals were randomly divided into 3 groups.

Group 1: animals subcutaneously injected in the back with one 50mg/kg dose of CBD in solution. Injections were given at a volume of 10 mL/kg. One of the most widely used procedures to dissolve cannabinoids for pharmacological animal studies is that described by Olson et al (1973) [37]. This procedure was followed to prepare the CBD solution. So, CBD was dissolved in a 1:1 mixture of absolute ethanol and Emulphor-620, and saline (0.9% NaCl) was added to this mixture to produce a 1:1:18 ratio of ethanol/Emulphor/saline.

Groups 2 and 3: Different vehicles were assayed to obtain a homogeneous dispersion of CBD-loaded microspheres. The best results were obtained with PBS pH 7.4 containing 1% Pluronic F-68. Thus one dose of 150 mg of cannabidiol-loaded poly(ϵ -caprolactone) 15/150 microspheres, or 75 mg of 30/150 CBD-PCL microspheres dispersed in 0.5 mL of the mentioned solution were subcutaneously injected in the back of the mice. These amounts of microspheres contained 12 mg of the drug, which was equivalent to a dose of 350 mg/kg.

At predetermined time periods 6 animals per group were sacrificed to determine the drug blood and brain levels. When CBD was administered in solution (group 1), blood and brain were collected at 30 min, 1, 3, 6, 8, 12.5, 24, 48 and 72 h after the injection. However, when microparticles were injected (groups 2 and 3), samples were collected at 3h, 1, 3, 5, 7 and 10 days after the administration.

At predetermined times mice were anaesthetized with carbon dioxide and blood was collected by intracardiac puncture with heparinized syringes. Subsequently, mice were decapitated and brains were extracted. Immediately after extraction, brains were snap-frozen in dry ice and stored at -80°C until the time of processing.

2.3. Analytical procedure to determine CBD Blood and Brain Levels

Then analysis of cannabinoids presents some difficult challenges because of their high lipophilicity. Moreover, care must be taken to avoid low recoveries of cannabinoids due to their high affinity to glass and plastic containers, and to alternate matrix-collection devices. In addition, complex specimen matrices, i.e., blood or brain, may require multi-step extractions to separate cannabinoids from endogenous lipids and proteins. [38].

In this study, methods for extraction and LC-MS quantification of CBD from whole blood and brain tissue were modified from a previously described procedure for Δ^9 -THC [39].

Calibration standards were prepared for each assay from mouse whole blood and brains obtained from untreated animals. Fifty nanograms of deuterated Δ^9 -THC -internal standard- and varying quantities (0.5-400 ng) of CBD were added to the blood and brain preweighed samples to prepare the calibration curves.

Following an equilibration period, blood and brain samples were homogenized with 1 mL of ice-cold Tris-HCl 50 mM pH 7.4 (Bio-Rad). Subsequently, 2.5 mL of cold acetonitrile were added drop-wise to the homogenates while vortexing. The samples were then centrifuged (Precision Vari-Hi-Speed Centricone; Precision Scientific) for 15 min at 2500 rpm and 4°C to precipitate solids and then stored in a freezer (-20°C) for 12h, allowing the acetonitrile layer to separate from the aqueous layer. The next day the acetonitrile layer was removed and evaporated to dryness under nitrogen. Finally, the dried samples were resolubilized in 0.1 mL of acetonitrile and placed in autosample vials for analysis.

In the case of samples from treated mice, fifty nanograms of deuterated Δ^9 -THC were added to the samples and the extraction protocol described above for the calibration samples was followed.

LC-MS-MS identification was used for CBD quantification in blood and brain matrices using a 1 mM Ammonium Formate:Methanol (10:90) mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min. A guard column was used inline with a Zorbax eclipse XDB-C18, 4.6 x 75 mm, 3.5 micron (Agilent Technologies, USA) column. The equipment consisted on a Waters Alliance 2690 separation module (Waters, Milford, MA, USA) with a Quattro II quadrupole mass spectrometer (MS/MS) using an electrospray in positive mode (ESI+) (Micromass, Altrincham, England) controlled by MassLynx 3.5 software system. Ions were analyzed in a Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode and the following transitions were monitored: (315>193) for CBD and (318>196) for deuterated Δ^9 -THC.

A calibration curve was constructed based on linear regression using the peak area ratios of CBD to deuterated Δ^9 -THC of the extracted calibration samples. No peaks were detected above background in the blank control samples, blank blood samples, or blank brain samples. The extracted standard curves ranged from 25 to 5000 ng CBD/g sample and were included in each run for the determination of CBD concentrations in blood and brain.

2.4. Pharmacokinetics and statistical analysis.

The non-compartmental method was used to determine pharmacokinetic parameters without deciding on a particular compartmental model. The peak drug concentrations (C_{max}) and the time to reach C_{max} (t_{max}) were estimated directly from the blood and brain CBD concentration plots.

The elimination constant (k_e) and the corresponding half-life ($t_{1/2}=\ln 2/k_e$) were derived from the terminal slope of the semilogarithmic plots of blood concentration versus time after CBD solution administration.

Moreover, from blood data the AUC_0^∞ , the $AUMC_0^\infty$ and the MRT were calculated. The area under the blood concentration-time curve (zero moment) was calculated as $AUC_0^\infty=AUC_0^t+C_t/K_e$, where t was the time of the last

quantifiable concentration, and C_t was the blood concentration of the last sample. AUC_{0^t} was calculated by the trapezoidal rule with linear interpolation. The AUCM (first moment curve) is the area under the concentration times time versus time curve. It was also calculated by the trapezoidal rule and extrapolated to infinity from the equation $AUMC_{0^\infty} = AUMC_{0^t} + C_t \cdot t / K_e$. Mean residence time was calculated as $MRT = AUMC / AUC$ [40].

As there were not intravenous data available, the availability of CBD solution after subcutaneous administration could not be calculated. Therefore, the apparent blood clearance (Cl/F) after subcutaneous administration was estimated by the equation $dose / AUC$, and the volume of distribution (V_d) was calculated as $MRT \cdot Cl$.

3. Results and discussion.

3.1. Microparticles characterization.

The obtained microparticles were spherical in shape with a smooth surface, and an average size of $54 \mu m$, appropriate for their subcutaneous administration with a hypodermic needle (figure 1 a and b). Drug loadings were $8.99 \pm 0.31\%$ for the 15/150 formulation, and $17.08 \pm 1.61\%$ for the 30/150 microspheres. Encapsulation efficiencies were close to 100%.

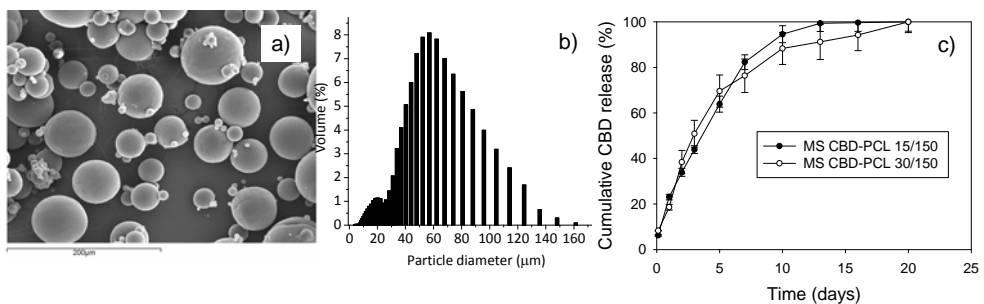


Fig. 1. (a) Scanning electron micrograph of 15/150 MPs, (b) particle size distribution of 15/150 MPs and (c) *in vitro* release profiles of 15/150 and 30/150 MPs.

In vitro drug release profiles are depicted in figure 1c, and the calculated model independent parameters are summarized in table 1. Both formulations of

microspheres exhibited a prolonged release of cannabidiol. *In vitro* dissolution results showed a biphasic profile being the drug release faster during the first five days of the experiment, followed by a slower release phase. Nevertheless, there were small differences between the *in vitro* release profiles of both formulations. The 15/150 formulation showed a slower initial release, and the CBD release went on until day 15. However, the 30/150 formulation showed a faster initial release, and the drug release was prolonged until day 20. These small differences were revealed by the model independent parameters calculated for the first days of the release studies ($t_{10\%}$, $t_{50\%}$ and $ED_{5\text{days}}$).

According to FDA and EMEA recommendations the similarity factor f_2 was calculated to assess the similarity between the two *in vitro* dissolution profiles [41]. As the calculated similarity factor was 63.21 and the FDA and the EMEA suggest that two dissolution profiles are declared similar if f_2 is between 50 and 100, it was concluded that the *in vitro* dissolution profiles of both formulations of microspheres were similar. However, the value obtained was close to the lower limit established by the authorities.

Table 1. Model independent parameters obtained from the *in vitro* dissolution experimental curves of CBD-loaded microparticles ($n=3$).

Formulation	$t_{10\%}$ (h)	$t_{50\%}$ (days)	$t_{90\%}$ (days)	ED_5 days (%)	$ED_{13\text{ days}}$ (%)	f_2
MPs CBD-PCL 15/150	7,74	4	10	37,67	68,52	63.21
MPs CBD-PCL 30/150	6,49	3	10	41,17	66,78	Similar

The release of CBD from poly(ϵ -caprolactone) microspheres may be controlled by diffusion through the polymeric matrix due to the small molecular weight of the drug (MW 314.46). Moreover, after the *in vitro* release tests microspheres were still spherical in shape and no significant erosion was observed (figure 2), supporting the diffusion hypothesis.

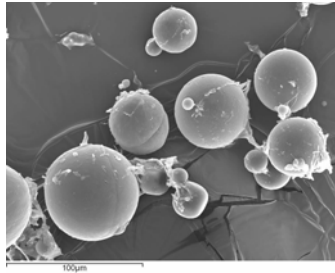


Fig. 2. SEM photograph of CBD microspheres 15/150 after the *in vitro* release tests (day 20).

3.2 *In vivo* studies.

The dose of CBD administered in this study was 50 mg/kg when drug in solution was used. This dose was chosen in view of the doses administered to mice for pharmacological studies by other researchers [42-44].

The amount of microspheres to be administered was calculated based on the results from the *in vitro* release tests. From these studies it was estimated that the amount of 15/150 microspheres which would release a daily dose of 50 mg/kg (during the first days) would be 150 mg/35 g mice, and the equivalent amount of 30/150 microspheres would be 75 mg/35 g mice.

After CBD administration either in solution or microencapsulated into PCL microparticles, the levels of CBD in blood and brain at predetermined time points were determined.

The mean blood and brain concentrations of CBD-time profiles after subcutaneous administration of CBD in solution at a dose of 50 mg/kg are illustrated in figure 3, and the calculated pharmacokinetic parameters from blood and brain concentration-time data are presented in tables 2 and 3, respectively.

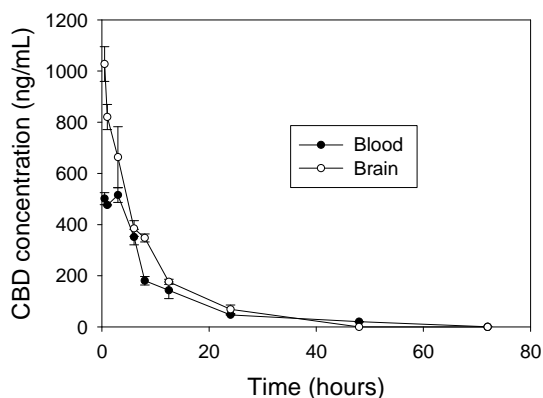


Fig. 3. Blood and brain CBD concentrations after subcutaneous injection of a solution of CBD. Dose 50 mg CBD per kg of body weight.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of cannabidiol subcutaneously administered either in solution or encapsulated into poly(ϵ -caprolactone) microspheres (blood data).

Parameter	CBD in solution	MP 15/150	MP 30/150
K_e	0.035 h ⁻¹		
$t_{1/2\beta}$	19.8 h		
Cl/F	4.846 mL/min		
Vd	3.02 L		
C_{max} (ng/mL)	521.7	40.22	38.33
t_{max}	30 min	3 day	3 day
AUC ^{0-10days} (ng·day/mL)		321.89	66.86
AUC ^{0-∞} (ng·day/mL)	250.76	-	85.581
AUMC ^{0-t}		1761.18	261.74
AUMC ^{0-∞} (ng·day ² /mL)	126.71	-	355.347
MRT (days)	0.505	-	3.91

According to figure 3, subcutaneous administration of the solution of CBD at 50 mg/kg resulted in a maximum blood concentration (C_{max}) of 521 ng/mL 30 min after injection (t_{max}), followed by a rapid decrease of blood levels. The blood-time curve showed a biexponential profile, with a first phase of rapid distribution to peripheral tissues. This rapid distribution has also been observed for THC by

other authors [36,45-47]. In fact, due to the high lipophilic nature of cannabinoids, they tend to migrate to lipophilic tissues, resulting in higher brain than blood drug concentrations. By 10 hours after CBD solution administration, the blood concentration began to fall log-linearly with time, indicating that distribution equilibrium with most tissues had been reached. This slower elimination phase was due to the drug return from peripheral tissues to blood. No CBD was detected in blood 72h after CBD solution administration.

The elimination rate constant (K_e) of CBD solution subcutaneously administered was calculated from the terminal phase of the blood curve. CBD K_e was 0.035 h^{-1} , and CBD half life ($t_{1/2\beta}$) was 19.8h (table 2). This $t_{1/2}$ value is in accordance with the data published by other authors who have reported that CBD $t_{1/2}$ in man after intravenous administration is between 18-33h [36, 48]. The obtained volume of distribution (V_d) was 3L (85 L/kg), similar to the value reported for THC V_d . However, although it has been reported that the pharmacokinetics of other cannabinoids resemble the kinetics of THC, it has also been published that CBD distribution volume in man after intravenous administration is about 30 L/kg [36, 48]. Anyway, the large volume of distribution of CBD indicates the presence of a “deep compartment”, due to the fact that CBD was sequestered out of the plasma into various organs and tissues, brain amongst them [49].

However, the obtained apparent clearance (Cl/F) value (4.846 mL/min, equivalent to 138.457 mL/min·kg) is higher than the clearance value previously reported by other authors. Ohlsson *et al.* [48] reported a plasma clearance of CBD of $1,240 \pm 240 \text{ mL/min}$ (equivalent to 17.71 mL/min·kg) after iv administration to man, and Samara *et al.* [49] reported a total body clearance of 283.33 mL/min after iv administration to dogs. To make comparisons it was taken into account that, in humans, whole blood cannabinoid concentrations are approximately one-half the concentration found in plasma specimens, due to the high plasma protein binding and the low partition coefficient of cannabinoids into erythrocytes [50, 51], and therefore, Blood clearance = $1,5 \times$ plasma clearance. Nevertheless, despite

these considerations no similarity was found between the obtained apparent clearance value and the clearance values found in the literature.

The mean residence time after subcutaneous injection of CBD solution to mice was found to be 12.12h. The MRT value for CBD after iv administration to dogs was reported to be 7h [49]. Indeed, the MRT values after administration by routes other than intravenous bolus injection are always greater than MRT_{iv} .

During CBD distribution to peripheral tissues, CBD reached the brain, showing a high affinity for this tissue. These results are consistent with those observed for THC [52], where it was reported no correlation between blood and brain THC concentrations, being brain levels always higher than blood concentrations. In fact, brain levels after subcutaneous administration of CBD solution (figure 3) reached a maximum concentration of 1027 ng/mL 30 min after its administration (table 3), being approximately 2 times higher than blood levels. Then, brain levels started to decrease, and at 48h no CBD was detected in brain.

Table 3. Pharmacokinetic parameters of cannabidiol subcutaneously administered either in solution or encapsulated into poly(ϵ -caprolactone) microspheres (brain data).

Parameters	CBD solution	15/150 MPs	30/150 MPs
C_{max} (ng/mL)	1027	59	238
t_{max}	0.5 h	3 day	3h

The plasma and brain concentration of CBD released from microspheres CBD-PCL 15/150 and 30/150 are shown in figures 4 and 5, respectively. The calculated pharmacokinetic parameters are given in tables 2 (blood) and 3 (brain).

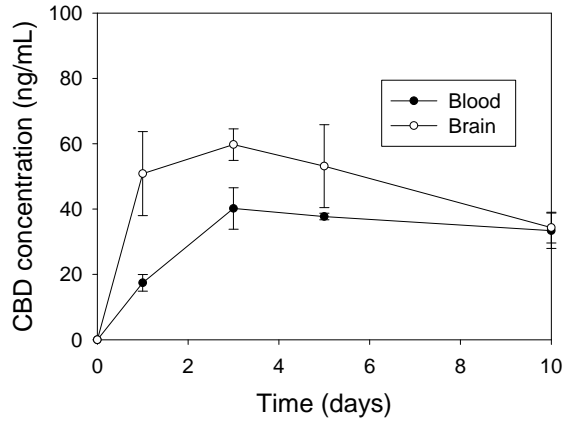


Fig. 4. Blood and brain CBD concentrations after subcutaneous injection of 150 mg of CBD-PCL MPs 15/150.

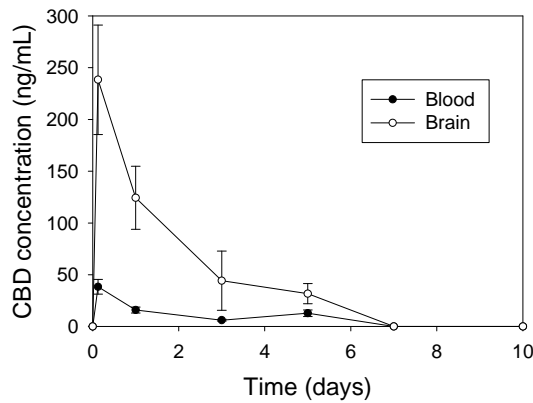


Fig. 5. Blood and brain CBD concentrations after subcutaneous injection of 75 mg of CBD-PCL MPs 30/150.

The drug was slowly released from poly(ϵ -caprolactone) microspheres. The maximum CBD plasma concentration, the decrease rate of the drug plasma concentration and the total time that the drug was detected in plasma depended on the type of injected microspheres (figure 6).

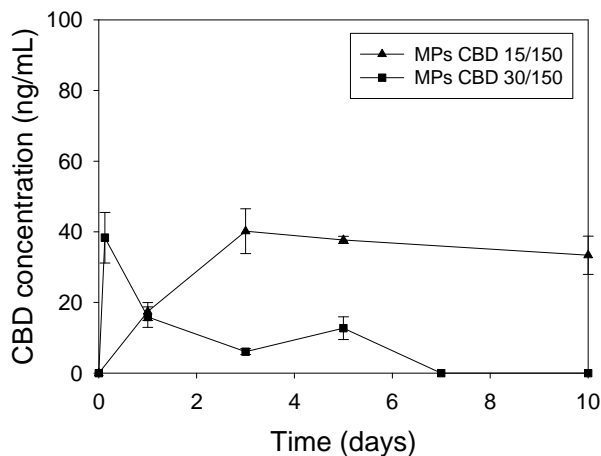


Fig. 6. Blood CBD concentrations after subcutaneous injection of 15/150 and 30/150 microspheres.

The maximum blood concentration (C_{\max}) of CBD after 15/150 microspheres injection (figure 4) was around 40 ng/mL and it was reached 3 days after implantation (t_{\max}). From this time blood CBD levels were constant during the 10-day study period.

On the other hand, blood C_{\max} after 30/150 microspheres injection (figure 5) was also around 40 ng/mL, but it was reached 3 hours after implantation (t_{\max}). From this time, blood drug concentration gradually decreased and the drug was not detected after 7 days.

Interestingly, blood t_{\max} was found to be 3 days with the 15/150 microspheres instead of the 3h found for the CBD solution or 30/150 microspheres (table 2). Moreover, the C_{\max} obtained with the microspheres was significantly lower than the CBD solution (40 ng/mL versus 500 ng/mL).

The mean residence time (MRT) can be considered an average time of residence of the drug in the organism. This parameter showed a larger value when CBD was subcutaneously administered in microspheres. In fact, the MRT was up to 8 or 10 times higher when the drug was administered by drug-loaded microspheres with respect to the subcutaneous injection of CBD solution (table 2). These data indicate that the developed microparticles supply CBD to the systemic

circulation for a prolonged period.

Regarding brain pharmacokinetic data, the C_{\max} was higher when CBD in solution was administered in comparison with microparticles administration (table 3).

In the case of the 15/150 formulation, during the first days of the study the CBD brain concentrations were almost two times higher than the CBD blood concentrations (figure 4). Moreover, the maximum CBD brain concentration was reached 3 days (t_{\max}) after 15/150 microparticles administration, being similar to blood t_{\max} . Brain concentrations started to decrease very slowly from day 3, being detectable during the 10-day study period.

When administering the 30/150 microspheres, brain levels, like blood levels, reached a maximum 3h after injection (t_{\max}) (figure 5). In this case, CBD brain levels at t_{\max} were 7 times higher than CBD blood levels. Subsequently, drug brain levels decreased and no CBD was detected in brain 7 days after the injection.

Therefore, similarly to the results observed in blood, brain t_{\max} was reached at 3days when administering the 15/150 formulation, but when using the 30/150 microparticles or the CBD solution it was reached at 3h.

In view of these results it can be stated that the slight differences observed between the *in vitro* release profiles of CBD from both formulations of microspheres were much more noticeable in the *in vivo* pharmacokinetic studies. Thus, during the first days the *in vitro* CBD release from the formulation 15/150 was slower than the CBD release from the 30/150 formulation; but during the *in vivo* pharmacokinetic studies these differences were even higher, being CBD release from 15/150 microparticles much slower than CBD release from 30/150 microparticles. As a matter of fact, drug release from 15/150 microparticles went on for more than 10 days. Indeed, drug absorption from polymeric drug delivery systems after subcutaneous administration depends on the release of the drug from the system, the dissolution of the drug under physiological conditions, and the permeability across the tissues barriers.

4. Conclusions.

To the best of our knowledge, this paper reports the first pharmacokinetic study of subcutaneously administered CBD.

After subcutaneous administration of CBD in solution the drug was rapidly distributed, followed by a prolonged elimination phase with a $t_{1/2\beta}$ of 19.8 h.

The small differences observed in the *in vitro* CBD release from 15/150 or 30/150 formulations were more noticeable in the *in vivo* pharmacokinetic studies. The formulation 15/150 showed a more sustained release of the drug. In fact, the pharmacokinetic studies of the 15/150 formulation should be extended, as at the end of the study period (10 days), CBD was still present in both blood and brain.

Significant differences in MRT values were observed between the subcutaneous administration of CBD solution or CBD microparticles. Furthermore, as the MRT and t_{\max} values were higher when administering the microparticles in comparison with the solution, it can be concluded that the developed microparticles maintain the amount of CBD in the administration site much longer than the injection of CBD solution.

This preliminary study outlines the major interest of developing controlled release delivery systems for cannabinoids, and opens interesting perspectives for further studies, particularly those related to cannabinoid chronic administration. Furthermore, this study suggests that the prolonged release exhibited by CBD-loaded microspheres, may result in a good antitumoral effect against glioma tumors. As a matter of fact, the design of anticancer drug sustained-release delivery systems may offer important improvement in cancer therapy by increasing mean residence time of the drug in plasma and allowing higher specificity in the delivery of the drug to the tumour target cells. In fact, an investigation into the therapeutic antitumoral potential of the cannabinoid loaded microspheres has been carried out, and the results will be discussed in a forthcoming paper.

Acknowledgements.

This work was founded by a grant from Complutense University to A.I. Torres and M.E. Gil, and a NIH grant DA 002396 to Billy R. Martin. The authors wish to thank Qing Tao for her technical assistance, and the Spanish Ministry of Education and Science for the FPU fellowship to DH.

REFERENCES

- [1]. Adams IB & Martin BR (1996) Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* **91**(11):1585-1614. doi:10.1111/j.1360-0443.1996.tb02264.x
- [2]. Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, & Mechoulam R (2009) Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci* **30**(10):515-527. doi:10.1016/j.tips.2009.07.006
- [3]. Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, & Hanus LO (2007) Cannabidiol - Recent Advances. *Chem Biodivers* **4**(8):1678-1692. doi:10.1002/cbdv.200790147
- [4]. Mechoulam R & Hanus L (2000) A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids* **108**(1-2):1-13. doi:10.1016/S0009-3084(00)00184-5
- [5]. Pertwee R (2008) The diverse CB₁ and CB₂ receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* **153**(2):199-215. doi: 10.1038/sj.bjp.0707442
- [6]. Borrelli F, *et al.* (2009) Cannabidiol, a safe and non-psychoactive ingredient of the marijuana plant *Cannabis sativa*, is protective in a murine model of colitis. *J Mol Med*. doi:10.1007/s00109-009-0512-x
- [7]. Scuderi C, *et al.* (2008) Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders. *Phytother Res*. doi:10.1002/ptr.2625
- [8]. Cunha JM, *et al.* (1980) Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology* **21**(3):175-185.

- [9]. Ligresti A, *et al.* (2006) Antitumor Activity of Plant Cannabinoids with Emphasis on the Effect of Cannabidiol on Human Breast Carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* **318**(3):1375-1387. doi:10.1124/jpet.106.105247
- [10]. Massi P, *et al.* (2004) Antitumor Effects of Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid, on Human Glioma Cell Lines. *J Pharmacol Exp Ther* **308**(3):838-845. doi:10.1124/jpet.103.061002
- [11]. Garrett ER & Hunt A (1974) Physicochemical properties, solubility, and protein binding of D9-Tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci* **63**:1056-1064.
- [12]. Howlett AC, *et al.* (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev* **54**(2):161-202. doi:10.1124/pr.54.2.161
- [13]. Howlett AC (2002) The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:619-631.
- [14]. Lichtman AH, *et al.* (2000) Pharmacological evaluation of aerosolized cannabinoids in mice. *Eur J Pharmacol* **399**(2-3):141-149. doi:10.1016/S0014-2999(00)00321-6
- [15]. Mechoulam R & Hanus L (2001) The cannabinoids: an overview. Therapeutic implications in vomiting and nausea after cancer chemotherapy, in appetite promotion, in multiple sclerosis and in neuroprotection. *Pain Res Manag* **6**(2):67-73.
- [16]. Dewey WL (1986) Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* **38**(2):151-178.
- [17]. Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol Ther* **74**(2):129-180. doi:10.1016/S0163-7258(97)82001-3
- [18]. Hall W, Christie M, & Currow D (2005) Cannabinoids and cancer: causation, remediation, and palliation. *Lancet Oncol* **6**(1):35-42. doi:10.1016/S1470-2045(04)01711-5
- [19]. Mannila J, Järvinen T, Järvinen K, Tervonen J, & Jarho P (2006) Sublingual administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol/ β -cyclodextrin complex increases the bioavailability of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rabbits. *Life Sci* **78**(17):1911-1914. doi:10.1016/j.lfs.2005.08.025
- [20]. Doyle E & Spence AA (1995) Cannabis as a medicine? *Br J Anaesth* **74**(4):359-361. doi:10.1093/bja/74.4.359

- [21]. Mattes RD, Shaw LM, Edling-Owens J, Engelman K, & Elsohly MA (1993) Bypassing the first-pass effect for the therapeutic use of cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav* **44**(3):745-747. doi:10.1016/0091-3057(93)90194-X
- [22]. Perlin E, *et al.* (1985) Disposition and bioavailability of various formulations of tetrahydrocannabinol in the rhesus monkey. *J Pharm Sci* **74**(2):171-174.
- [23]. Grotenhermen F (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin pharmacokinet* **42**(4):327-360.
- [24]. Ohlsson A, *et al.* (1980) Plasma delta-9-tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clin Pharmacol Ther* **28**:409-416.
- [25]. Stinchcomb AL, Valiveti S, Hammell DC, & Ramsey DR (2004) Human skin permeation of Delta8-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *J Pharm Pharmacol* **56**:291-297. doi:10.1211/0022357022791
- [26]. Thumma S, Majumdar S, ElSohly MA, Gul W, & Repka MA (2008) Chemical stability and bioadhesive properties of an ester prodrug of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in poly(ethylene oxide) matrices: effect of formulation additives. *Int J Pharm* **362**(1-2):126-132. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.06.025
- [27]. Watson SJ, Benson JA, Jr., & Joy JE (2000) Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of Medicine report. *Arch Gen Psychiatry* **57**(6):547-552.
- [28]. Wilson DM, *et al.* (2002) Physiochemical and pharmacological characterization of a Δ^9 -THC aerosol generated by a metered dose inhaler. *Drug Alcohol Depend* **67**(3):259-267. doi:10.1016/S0376-8716(02)00078-9
- [29]. Mannila J, Järvinen T, Järvinen K, Tarvainen M, & Jarho P (2005) Effects of RM- β -CD on sublingual bioavailability of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rabbits. *Eur J Pharm Sci* **26**(1):71-77. doi:10.1016/j.ejps.2005.04.020
- [30]. Thumma S, Majumdar S, ElSohly MA, Gul W, & Repka MA (2008) Preformulation studies of a prodrug of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. *AAPS PharmSciTech* **9**(3):982-990. doi:10.1208/s12249-008-9136-7
- [31]. Wang S & Guo S (2008) Disodium norcantharidate-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres: II. Modification of morphology and release behavior. *Int J Pharm* **353**(1-2):15-20. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.11.007

- [32]. Freiberg S & Zhu XX (2004) Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* **282**(1-2):1-18. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.04.013
- [33]. Pekarek KJ, Jacob JS, & Mathiowitz E (1994) Double-walled polymer microspheres for controlled drug release. *Nature* **367**:258-260. doi:10.1038/367258a0
- [34]. Jeong B, Bae YH, Lee DS, & Kim SW (1997) Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature* **388**(6645):860-862.
- [35]. Mannila J, Järvinen T, Järvinen K, & Jarho P (2007) Precipitation complexation method produces cannabidiol/beta-cyclodextrin inclusion complex suitable for sublingual administration of cannabidiol. *J Pharm Sci* **96**(2):312-319. doi:10.1002/jps.20766
- [36]. Agurell S, *et al.* (1986) Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol Rev* **38**(1):21-43.
- [37]. Olsen JL, Makhani M, Davis KH, & Wall ME (1973) Preparation of 9-tetrahydrocannabinol for intravenous injection. *J Pharm Pharmacol* **25**(4):344.
- [38]. Huestis MA (2007) Human Cannabinoid Pharmacokinetics. *Chem Biodivers* **4**(8):1770-1804. doi:10.1002/cbdv.200790152
- [39]. Lichtman AH, Poklis JL, Poklis A, Wilson DM, & Martin BR (2001) The pharmacological activity of inhalation exposure to marijuana smoke in mice. *Drug and Alcohol Dependence* **63**(2):107-116. doi:10.1016/S0376-8716(00)00205-2
- [40]. Doménech J, Martínez J, & Plá J eds (1997) *Biofarmacia y Farmacocinética* (Síntesis), Vol 1, p 448.
- [41]. Costa P & Sousa Lobo JM (2001) Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* **13**(2):123-133. doi:10.1016/S0928-0987(01)00095-1
- [42]. Varvel S, *et al.* (2006) Interactions between THC and cannabidiol in mouse models of cannabinoid activity. *Psychopharmacology* **186**(2):226-234.
- [43]. Hayakawa K, *et al.* (2008) Cannabidiol potentiates pharmacological effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol via CB1 receptor-dependent mechanism. *Brain Research* **1188**:157-164. doi:10.1016/j.brainres.2007.09.090

- [44]. Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Moreira FA, & Guimaraes FS (2006) Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res* **39**(4):421-429. doi:10.1590/S0100-879X2006000400001
- [45]. Bornheim LM, Kim KY, Li J, Perotti BYT, & Benet LZ (1995) Effect of cannabidiol pretreatment on the kinetics of tetrahydrocannabinol metabolites in mouse brain. *Drug Metab Dispos* **23**(8):825-831.
- [46]. McGilveray IJ (2005) Pharmacokinetics of cannabinoids. *Pain Res Manag* **10**(A):15A-22A.
- [47]. Harvey DJ (2001) Absorption, distribution and biotransformation of the cannabinoids. *Marihuana and Medicine*, eds Nahas GG, Sutin KM, Harvey DJ, & Agurell S (Humana Press, Totowa), pp 91-103.
- [48]. Ohlsson A, Lindgren J-E, Andersson S, & Agurell S (1986) Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after intravenous administration and smoking. *Biomed Environ Mass Spectrom* **149**:495-499.
- [49]. Samara E, Bialer M, & Mechoulam R (1988) Pharmacokinetics of cannabidiol in dogs. *Drug Metab Dispos* **16**(3):469-472.
- [50]. Schwilke EW, *et al.* (2009) Intra- and Intersubject Whole Blood/Plasma Cannabinoid Ratios Determined by 2-Dimensional, Electron Impact GC-MS with Cryofocusing. *Clin Chem* **55**(6):1188-1195. doi:10.1373/clinchem.2008.114405
- [51]. Owens S, McBay A, Reisner H, & Perez-Reyes M (1981) 125I radioimmunoassay of delta-9-tetrahydrocannabinol in blood and plasma with a solid-phase second-antibody separation method. *Clin Chem* **27**(4):619-624.
- [52]. Mura P, Kintz P, Dumestre V, Raul S, & Hauet T (2005) THC can be detected in brain while absent in blood. *J. Anal. Toxicol.* **29**(8):842-843.