



## (12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :  
**MA 37112 A1**

(51) Cl. internationale :  
**A61P 1/08; B01D 11/02;  
B01D 11/00; A61K 31/352**

(43) Date de publication :  
**29.01.2016**

---

(21) N° Dépôt :  
**37112**

(22) Date de Dépôt :  
**06.06.2014**

(71) Demandeur(s) :  
**UNIVERSITE ALAKHAWAYN, AV. HASSAN II P.O BOX 104, 53000 IFRANE (MA)**

(72) Inventeur(s) :  
**SENDIDE KHALID ; ANISSI JAOUAD ; EL HASSOUNI MOHAMMED**

(74) Mandataire :  
**SENDIDE KHALID**

---

(54) Titre : **NOUVEAU PROCEDE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DE CANNABINOIDES**

(57) Abrégé : La présente application concerne une méthode de préparation d'extraits riches en cannabinoïdes à partir des plantes du genre cannabis ou de leurs sous produits ou de n'importe quel source contenant A9-tetrahydrocannabinol (A9-THC), cannabinoïl, cannabidiol leurs acides carboxyliques correspondants et le THCV. Selon la présente application, le matériel végétal est suspendu dans une solution aqueuse à un pH hautement basique, et extrait en présence d'une énergie ultrasons. La suspension ainsi obtenue et clarifiée. Un extrait est obtenu par la suite par une précipitation par pH inversion. Par la suite cet extrait est utilisé pour purifier sélectivement les cannabinoïdes individuels avec un processus chromatographique.

## Abrégé :

La présente application concerne une méthode de préparation d'extraits riches en cannabinoïdes à partir des plantes du genre *cannabis* ou de leurs sous produits ou de n'importe quel source contenant  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), cannabinol, cannabidiol leurs acides carboxyliques correspondants et le THCV. Selon la présente application, le matériel végétal est suspendu dans une solution aqueuse à un pH hautement basique, et extrait en présence d'une énergie ultrasons. La suspension ainsi obtenue et clarifiée. Un extrait est obtenu par la suite par une précipitation par pH inversion. Par la suite cet extrait est utilisé pour purifier sélectivement les cannabinoïdes individuels avec un processus chromatographique.

/ . .

28 JAN 2016

1 *Domaine de l'invention*

2 La présente invention concerne des procédés de préparation d'extraits riche en cannabinoïdes  
3 ou d'extraits hautement purifiés à partir source contenant des cannabinoïdes, notamment de la  
4 plante de cannabis et des sous-produits qui en dérivent, et ce grace anouveaux de ndes  
5 procédés d'extraction assistée par l'énergie ultrason dans un solvant aqueux. En outre, la  
6 présente invention concerne la préparation de  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), le  
7 cannabinol, le cannabidiol et éventuellement leurs acides carboxyliques correspondant et le  
8 THCV, sous des formes purifiées, pouvant server, entre autre, d'ingrédients pharmaceutiques  
9 actifs.

10 *Art antérieur*

11 Les cannabinoïdes sont des constituants actifs de la plante *Cannabis sativa*. Ce sont des  
12 métabolites secondaires appartenant à une classe des meroterpenoids, dérivés de l'alkylation  
13 d'un alkyl résorcinol olivetol-like avec une unité de monoterpène. Parmi eux,  $\Delta^9$ -  
14 tétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) est le composant psychoactif bien connu. Environ 70  
15 cannabinoïdes ont été isolés de la marijuana [Mechoulam, R. et Ben Shabat-, S. (1999). Nat.  
16 Prod. Rep 16: 131-143; C.E. Turner, M.A. Elsohly, par exemple Boeren, J. Nat. Prod. 43  
17 (1980) 169-234].

18 Depuis longtemps, le cannabis a été utilisé à des fins médicales. Dans les périodes  
19 victoriennes, il était considéré comme unique, avec des propriétés pour contrarier la  
20 résistance de la douleur aux analgésiques opioïdes dans des conditions telles que les lésions  
21 de la moelle épinière et d'autres formes de douleur neuropathiques survenant pendant la  
22 sclérose en plaques. Aujourd'hui, les applications de ces molécules se sont étendues aux tests  
23 cliniques pour le traitement de certains cancers et des symptômes liés à certains maladies  
24 neurodégénératives et neuronales.

25 Les cannabinoïdes (Fig. 1) présentent des activités pharmaceutiques, telles que l'effet anti-  
26 émétique et la stimulation de l'appétit. Les cannabinoïdes non psychoactifs, tel que le  
27 cannabidiol (CBD), le cannabichromène (CBC), et le  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabivarine (THCV),  
28 possèdent diverses activités pharmacologiques. Le  $\Delta^9$ -THC est commercialisé comme le  
29 Marinol™ et est prescrit pour les patients souffrant de nausées et vomissements sévères  
30 associés à la chimiothérapie du cancer. Les cannabinoïdes se trouvent concentrés dans les

31 parties aériennes, principalement les floraisons; en outre, leur concentration peut atteindre  
32 jusqu'à 70% de la résine de la plante (hachisch).

33 Il est connu dans la littérature qu'un extrait huileux rouge est obtenu à partir de la plante *C.*  
34 *sativa* par extraction aux solvants organiques. Les extraits obtenus sont généralement riches  
35 en  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBD et CBDA, entre autres cannabinoïdes, et qui peuvent être  
36 purifiés par des méthodes chromatographiques connues pour l'homme de l'art. Néanmoins,  
37 plusieurs difficultés surgissent avec l'utilisation de ces extractions liquide-solide classiques.

38 En général, les méthodes d'extraction qui ont été jusqu'à présent décrites, ont été utilisées  
39 pour séparer les constituants chimiques de plantes médicinales et pour produire des extraits  
40 enrichis de ces molécules inclut, sans se limiter à l'exemple, la macération, la décoction, et  
41 l'extraction avec des solvants organiques. Après une période de temps définie, la matière  
42 solide est séparée de la suspension (macérat). Des variantes du procédé comprennent  
43 l'agitation de la macération et l'utilisation de températures allant jusqu'à 50° C. De tels  
44 procédés ont été utilisés auparavant pour la préparation d'extraits de matières végétales, en  
45 utilisant diverses concentrations de solvants organiques. Ces procédés demandent beaucoup  
46 de temps et utilisent une grande quantité de solvants organiques connus comme étant nocifs  
47 pour l'homme et pour l'environnement.

48 Plusieurs brevets et articles scientifiques ont décrit différents procédés d'extraction et de  
49 purification de cannabinoïdes à partir de leurs sources naturelles. WO 2005/072719 décrit un  
50 extrait de la plante de cannabis à faible teneur en  $\Delta^9$ -THC et contenant au moins un acide  
51 cannabinoïde. Le procédé d'extraction est une extraction liquide principalement à partir des  
52 parties aériennes et utilise une grande quantité de solvants organiques.

53 CA pat. 2499492 C, a décrit un procédé utilisant le méthanol et le pentane en tant que  
54 solvants d'extraction.

55 Le brevet US. 2007/0, 060639 décrit un procédé pour la préparation d'extraits de  
56 cannabinoïdes à partir de *C. sativa* par extraction avec des solvants tels que le 2-propanol et  
57 le brevet US. 7592468/2009 décrit un procédé d'obtention de  $\Delta^9$ -THC selon des extractions et  
58 partitions multiples. Tétraèdre (1965), vol, 21 p: 1223-1229 décrit une extraction à partir de  
59 la résine du cannabis en utilisant l'éther de pétrole sous des conditions alcalines. Un processus  
60 a été décrit par WO 02/32420 pour la préparation de  $\Delta^9$ -THC et de CBD en utilisant des  
61 extractions sous ultrasons alors que le brevet US. 6365416 B1 décrit un procédé pour

62 l'extraction de cannabinoïdes à l'aide d'un procédé d'extraction d'une durée de 24 h utilisant  
63 un procédé de préparation de  $\Delta^9$ -THC en utilisant une extraction avec un solvant organique  
64 non polaire, suivie par chromatographie sur colonne successive, distillations flash et une  
65 HPLC en phase normale ou inverse. L'ensemble du processus est complexe, et demandant en  
66 énergie et temp. Dans l'art antérieur (brevet US. 7.344.736), la décarboxylation des formes  
67 acides est effectuée à une température élevée et pendant une longue période de temps, allant  
68 jusqu'à 4 heures, ce qui conduit généralement à un taux élevé de dégradation comme indiqué  
69 pour la formation de cannabinoïde (CBN) suite à la dégradation thermique du  $\Delta^9$ -THC.

70 L'isolement de ces cannabinoïdes à l'état pur dépend directement des étapes du procédé et de  
71 son efficacité. De là, la rentabilité du procédé et de son rendement, à la fois quantitativement  
72 et qualitativement, est directement liée au nombre d'étapes et de leurs complexité, incluant les  
73 produits chimiques utilisés. Certains cannabinoïdes (par exemple  $\Delta^9$ -THC), sont déjà  
74 approuvés par the Food and Drug Administration (FDA) pour leurs activités  
75 pharmacologiques potentielles dans le glaucome, l'anxiété, la migraine comme analgésique,  
76 mais en tant que molécule active dans le contrôle des nausées et des vomissements associés à  
77 la chimiothérapie. Cependant, les formes épurées de ces cannabinoïdes sont encore non  
78 disponibles sur le marché à de grandes quantités, et même lorsqu'elles le sont, leur prix reste  
79 relativement cher. Par conséquent, la nécessité d'un processus rentable pour l'extraction et la  
80 purification de ces cannabinoïdes de sources naturelles vaut le détour

81 Les auteurs de la présente invention ont montré que l'extraction de cannabinoïdes utilisant  
82 l'eau comme solvant dans des conditions alcalines, sous une énergie ultrasons et suivie par  
83 une précipitation, sous un changement de pH du milieu alcalin à un environnement acide par  
84 traitement de l'extrait avec un acide minéral permet la préparation d'un extrait riche en  
85 cannabinoïdes-et ce avec un coût bien plus réduit. Cet extrait est utilisé pour la purification  
86 des cannabinoïdes selon des procédés chromatographiques développés en se basant sur des  
87 technologies vertes.

88 En outre, les auteurs ont constaté que le traitement de l'extrait riche en cannabinoïdes (acides  
89 et non acides) active la décarboxylation des formes acides des cannabinoïdes, avec à la  
90 température optimale,

91 *Résumé de l'invention*

92 L'invention propose essentiellement un procédé d'obtention d'extraits riches en  
93 cannabinoïdes, selon les étapes suivantes:

- 94 i. Obtention d'un extrait aqueux à pH alcalin à partir de matériel végétal contenant des  
95 cannabinoïdes ou de produits dérivés du matériel végétal sous une extraction assistée  
96 par énergie ultrasons.
- 97 ii. Séparation de la solution de la matière solide.
- 98 iii. à une Précipitation différentielle de pH du filtrat aqueux obtenu.
- 99 iv. Le précipité obtenu est soumis à une séparation de la solution aqueuse.
- 100 v. Le précipité brut obtenu est soumis à des chromatographies sur colonne pour séparer  
101 les composés hydrophiles des hydrophobes, en utilisant un gradient d'eau et d'un  
102 alcool ou d'un gradient de pH de 2,0 à 12,0.
- 103 vi. Soumettre les fractions contenant des cannabinoïdes obtenus à partir de l'étape (v) à  
104 une Chromatographie flash à travers un gel de silice G.
- 105 vii. Soumettre les fractions obtenues contenant les cannabinoïdes à une chromatographie  
106 échangeuse d'ions à l'aide d'un absorbant anionique fort..
- 107 viii. les cannabinoïdes obtenus contenant des fractions et/ou d'autres composés  
108 bioactifs, qui ne se limitent pas à l'exemple, la séparation de la précédente comme en  
109 (v) et à (vi) sont purifiés en utilisant en outre une HPLC.

110 *Brève description des figures*

111 Fig. 1: structure chimique de certains cannabinoïdes.

112 Figure. 2: comparaison du rendement de l'extraction liquide/solide classique; (A), et  
113 l'extraction assistée par ultrasons en milieu aqueux; (B).

114 Fig. 3: effet de l'énergie des ultrasons, à la température optimale sur la décarboxylation des  
115 acides de cannabinoïdes

116 Fig. 4: comparaison de chromatogrammes CLHP (chromatographie liquide à haute  
117 performance) montrant la composition qualitative de (A): extraction assistée par ultrasons, et  
118 (B): extraction liquide/solide classique.

119 Fig. 5: Chromatogramme CLHP du  $\Delta^9$ -THC purifié.

120 Fig. 6: Spectre de masse du pic au niveau du chromatogramme CLHP de la figure 5 au temps  
121 de rétention 27.94 min et correspondant à  $\Delta^9$ -THC

122 Fig. 7: Chromatogramme CLHP de la CDB purifié.

123 Fig. 8: Spectre de masse du pic au niveau du chromatogramme CLHP de la figure 7, au temps  
124 de rétention de 12.50 min, correspondant à la CDB

125 Fig. 9: chromatogramme CLHP à phase inverse du  $\Delta^9$ -THCA purifié.

126 Fig. 10: Spectre de masse du  $\Delta^9$ -THCA purifié.

127 Fig. 11: Chromatogramme CLHP du CBD purifié.

128 Tableau. 1: données des spectres  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  RMN pour des cannabinoïdes sélectionnés.

129 *Description détaillée de l'invention*

130 Jusqu'à présent, les procédés d'extraction classiques reposent sur l'utilisation de grandes  
131 quantités de solvants organiques, connus comme étant toxiques pour les humains, et pour  
132 l'environnement. En outre, ces procédés génèrent de grandes quantités d'impuretés qui  
133 entravent le processus de purification. Aussi, la plupart de ces procédés sont lents. L'un objet  
134 de la présente invention est de fournir un nouveau procédé d'extraction et de purification des  
135 cannabinoïdes tels que  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBN, CBD et CBDA, qui surpasse la plupart des  
136 difficultés par rapport à ce qui est présenté par l'état de l'art antérieur.

137 La présente application décrit un procédé d'extraction, proposé pour la préparation d'extraits  
138 riches en cannabinoïdes à partir de sources contenant des cannabinoïdes ou les sous-produits,  
139 et fournit également des étapes de purification de cannabinoïdes par la préparation des  
140 fractions intermédiaires riche en cannabinoïdes, et ensuite préparer les cannabinoïdes  
141 individuels purs. Un objet de la présente invention est de fournir un procédé d'extraction des  
142 cannabinoïdes, à faible coût avec un rendement et une pureté élevés avec moins de  
143 contaminants. Selon la présente invention les soi-disant «fractions intermédiaires», désignent  
144 différents extraits riches en cannabinoïdes, avec différents rendements entre les principaux  
145 cannabinoïdes  $\Delta^9$ -THC, CBD, CBDA,  $\Delta^9$ -THCA et CBN obtenus lors des étapes d'extraction  
146 / purification,

147 Dans un aspect de la présente invention, on présente un procédé pour la préparation d'extraits  
148 riches en cannabinoïdes dans une solution aqueuse à partir de plantes *C. sativa* ou ses sous-

149 produits (comme la résine du cannabis) au moyen d'extraction assistée par ultrasons (EAU)  
150 pour accélérer le processus de l'extraction.

151 Le matériel végétal est d'abord extrait avec de l'eau à pH >7.5, sous ultrasons. Ce procédé  
152 d'extraction présente plusieurs avantages par rapport à l'extraction liquide-solide classique.  
153 En teffet, l'utilisation de l'EAU facilite la diffusion de solvants d'extraction à travers le  
154 matériel organique et par conséquent, diminue le temps d'extraction et la consommation  
155 d'énergie. L'avantage de l'utilisation de l'énergie à ultrason durant le processus de l'extraction  
156 améliore également la transformation des formes acides des cannabinoïdes en leurs formes  
157 décarboxylées, ainsi que la formation d'un émulsion temporaire dont la partie huileuse  
158 contenant principalement des cannabinoïdes acides, les formes décarboxylées et d'autres  
159 cannabinoïdes, en comptant le cannabidiol. Cette observation nous a permis d'optimiser le  
160 processus d'extraction afin de permettre l'enrichissement de l'extrait obtenu décrit ici soit par  
161 les formes acides ou par les formes décarboxylées par le contrôle de la température de  
162 l'extraction. En outre, la durée d'extraction réduite fournie par la présente réduit le coût du  
163 procédé.

164 Le procédé de l'invention peut également être utilisé pour extraire les cannabinoïdes à partir  
165 d'autres sources contenant des cannabinoïdes. Le plus typiquement, mais sans s'y limiter, la  
166 «matière végétale» peut être un sous-produit végétal, comme la résine de cannabis." et par  
167 conséquent au moins un principe actif y est dérivé. .

168 Cette définition est fournie dans "the Guidance for Industry Botanical Drug Products Draft  
169 Guidance, August 2000", publiée par "the US Department of Health et the Human Services,  
170 Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research", et elle éclaireit la  
171 définition des extraits qui s'y obtiennent comme étant *une substance médicamenteuse dérivée*  
172 *d'une ou plusieurs plantes, algues, ou des champignons macroscopiques, mais ne comprend*  
173 *pas une substance hautement purifiée ou chimiquement modifiée dérivée d'une telle source et*  
174 *préparé à partir de matières premières botaniques.*

175 Le terme "plante de cannabis" doit être interprété comme matériel végétal issu d'une ou de  
176 plusieurs espèces de plantes de cannabis, y compris les types sauvage *Cannabis sativa* et  
177 *Cannabis indica*, la sous-espèce *sativa*, les variétés var. *indica* et var. *kafiristanica*, *Cannabis*  
178 *indica* et *Cannabis ruderalis* et aussi des plantes qui seraient le résultat de croisements  
179 génétiques, auto-croisement ou de leurs hybrides. Pour éviter tout doute, dans cette  
180 application, il est à préciser que "le matériel végétal de cannabis et sous-produit» comprend la



- 181 partie aérienne de cannabis et la résine de cannabis, respectivement, et qui sont le matériel de  
182 départ pour la préparation des molécules pures et individuels.
- 183 La matière première, soit la plante entière ou des sous-produits de celle-ci est mise en  
184 suspension dans un solvant aqueux à un pH allant de 7.7 à 13.5. Dans le mode de réalisation  
185 le plus préféré, le solvant aqueux est de préférence de l'eau.
- 186 L'ajustement du pH du milieu d'extraction peut être réalisé par des produits chimiques  
187 alcalins choisi de la liste publiée dans "the Guidance for Industry Botanical Drug Products,  
188 Draft Guidance, August 2000". L'EAU est effectuée de préférence sous une amplitude  
189 comprise entre 5% et 80% pour l'énergie de sortie de 100 kW à 250 kW et une fréquence de  
190 35 kHz ou moins, plus préférentiellement à une amplitude comprise entre 45% et 75% pour  
191 l'énergie de 250 kW et une fréquence de 20 kHz.
- 192 L'extraction est réalisée dans une durée de moins de 80 min, de préférence entre 10 min et 80  
193 min.
- 194 Dans un mode de réalisation préféré, la température d'extraction a été maintenue à l'aide d'un  
195 thermostat à des valeurs entre 60°C et 90°C.
- 196 Dans un mode de réalisation préféré, le rapport liquide / solide est choisi dans la gamme de  
197  $\frac{5}{100}$  (m/v), de préférence avec un rapport de  $\frac{1}{10}$  (m/v).
- 198 Dans un mode de réalisation préféré, la suspension de l'extrait obtenu selon la présente  
199 demande est séparée de la matière solide par décantation ou par filtration par des filtres avec  
200 une taille des pores adéquate et avec une hydrophobicité spécifique, sélectionnée à partir de  
201 matériaux acceptables pour des industries, pharmaceutique et cosmétique. De préférence, la  
202 taille des pores est comprise entre 0.2 mm et 0.04 mm, plus préférentiellement avec des pores  
203 des filtres de taille avec un diamètre de pores dans la gamme de 0.05 à 0.1 mm. De  
204 préférence, les filtres doivent contenir des mélanges contenant des pores hydrophobes et  
205 hydrophiles.
- 206 La précipitation des cannabinoïdes par changement de pH est effectuée par un changement de  
207 pH depuis un environnement basique à un environnement acide, et utilisé comme une  
208 méthode de récupération des cannabinoïdes à partir du milieu d'extraction aqueux. L'addition  
209 de la solution acide est réalisée par ajout de solution d'acide minéral sélectionné à partir de la

210 liste des acides inorganiques. et dilué à une concentration de 2 N à 10 N, de préférence entre 4  
211 à 6 N. L'acide chlorhydrique (HCl) a été utilisé avec succès.

212 Dans un aspect de la présente demande, le différentiel de pH de précipitation a été effectué  
213 par addition de la solution acide avec un débit allant de 1 ml/min à 5 ml/min, de préférence à  
214 1 ml / min à 2ml / min.

215 La précipitation des cannabinoïdes est effectuée à température ambiante sous agitation. De  
216 préférence, l'agitation est maintenue entre 2 tr / min et 50 tr / min, plus préférentiellement entre 5  
217 tr / min et 10 tr / min.

218 Le précipité formé collecté par filtration conventionnelle sous vide ou sous gravité,  
219 préférentiellement par centrifugation. Dans un mode de réalisation préféré, le précipité obtenu  
220 selon la présente demande est séparé de la matière solide par filtration par des filtres adéquats  
221 creux de taille de pores, choisi à partir de matières acceptables pour les industries  
222 pharmaceutiques et cosmétiques. De préférence, la taille des pores est comprise entre 0.2 mm  
223 et 0.01 mm, plus préférentiellement avec des filtres de taille de pores de 0.05 à 0.1 mm. De  
224 préférence, les filtres doivent être un mélange du matériel hydrophobe et hydrophile.

225 Dans une pratique préférée de la présente application, le précipité récolté est lyophilisé et  
226 extrait successivement par un volume adéquat d'hexane, chloroforme et méthanol dans une  
227 unité d'extraction, à dimensions adéquate. Cet extrait riche en cannabinoïdes est considéré  
228 comme matériau de départ pour une purification supplémentaire des entités cannabinoïdes.

229 En outre, la présente demande concerne un procédé de purification des cannabinoïdes  
230 comprenant la préparation d'extraits de cannabinoïdes riche et à soumettre l'extrait de  
231 cannabinoïdes contenant à des étapes successives de Chromatographie, y compris et sans s'y  
232 limiter à l'exemple, les méthodes de chromatographie d'interactions hydrophiles et  
233 interactions hydrophobes / hydrophiles, de préférence la filtration sur gel, la chromatographie  
234 adsorption, la Chromatographie d'échange d'anions, le dessalage par ultrafiltration et / ou  
235 diafiltration.

236 L'étape chromatographique comprendra de préférence la chromatographie sur colonne, et est  
237 basée, à la fois, sur les interactions hydrophile, des interactions hydrophobes/hydrophiles et la  
238 polarité du matériel à séparer. Les supports de chromatographie préférés sont des supports  
239 chromatographiques lipophiles hydrophiles, par exemple des dextrans tels que Sephadex G-  
240 10 réticulé, G-15, G-25 et/ou dextrans hydroxypropylés réticulés tels que Sephadex LH-20.

241 Divers solvants peuvent être utilisés en association avec ce type de matrice, par exemple le  
242 diméthylsulfoxyde, la pyridine, l'eau, le méthanol, le dichlorure d'éthylène, le chloroforme, le  
243 propanol, l'éthanol, l'isobutanol, le formamide, le diméthylformamide, le dichlorure de  
244 méthylène, le butanol, l'isopropanol, le tétrahydrofurane, le dioxanne, le chloroforme, le  
245 dichlorométhane, etc

246 Dans un mode de réalisation préféré, le précipité brut a été fractionné par chromatographie  
247 sur colonne à travers le Sephadex G-10, de préférence élué en utilisant un gradient d'eau /  
248 éthanol de 100:0 à 0:100, de préférence un gradient aqueux de pH 2.0 à 11.0. Les fractions  
249 hydrophiles sont éluées avec de l'eau d'abord comme phase mobile et par la suite, les  
250 fractions hydrophobes sont éluées par augmentation de la concentration de l'alcool dans la  
251 phase mobile, ou par augmentation du pH de la phase mobile.

252 Dans un mode préféré de la réalisation de cette application, l'étape chromatographique  
253 ultérieure des fractions contenant des cannabinoïdes recueillies à partir de sephadex G-10 à  
254 G-100 chromatographie comprend une chromatographie flash sur un gel de silice.

255 Dans le mode de réalisation le plus préféré, l'étape ultérieure de chromatographie des  
256 cannabinoïdes contenant des fractions recueillies à partir de la chromatographie à travers le  
257 sephadex G-10 à G-100 comprend une chromatographie d'échange d'ions en utilisant un  
258 support solide fortement échangeur d'anions et à phase inversée.

259 Cependant, la combinaison de supports chromatographiques adéquats et de phases mobiles  
260 ayant des caractéristiques de séparation appropriées pour la séparation (fractionnement) de  
261 cannabinoïdes a été utilisée avec succès avec une haute résolution. Les fractions collectées  
262 sont testées pour la présence des cannabinoïdes (l'acide cannabinoïde/cannabinoïdes) désirée  
263 à l'aide d'une technique d'analyse appropriée, incluant soit la CCM (chromatographie sur  
264 couches minces ou CLHP) et les fractions contenant des quantités de cannabinoïdes désirée  
265 ou acide cannabinoïde choisi pour un traitement ultérieur. Le solvant est ensuite éliminé des  
266 fractions choisies, de préférence sous vide, ou par lyophilisation.

267 Les fractions ainsi sélectionnées sont purifiées par chromatographie flash selon une  
268 combinaison de phase mobile appropriée. Toutes les fractions contenant des cannabinoïdes  
269 ont montré une pureté très élevée et qui facilite les étapes en aval de purification et qui  
270 impliquent principalement des CLHP préparatoires.

271 Le procédé de l'invention est particulièrement avantageux, car il permet des étapes  
272 d'extraction/purification économiques, qui limitent l'utilisation de larges quantités de produits  
273 chimiques toxiques pour l'Homme et pour l'environnement. Le procédé de l'invention atteint  
274 une pureté de la molécule extraite, allant jusqu'à 98%; la capacité de purifier de grandes  
275 quantités de cannabinoïdes pharmaceutiquement actifs sur l'échelle de production et avec un  
276 rendement global d'au moins 90% (m/m) des cannabinoïdes.

277 Nous avons obtenu avec succès CDB, CBDA,  $\Delta$ 9-THCV, CBN, 9-THC, CBC, 9 THCA avec  
278 une grande pureté selon le procédé de la présente invention.

279 *Les modes de réalisation de l'application*

280 *Exemple 1*

281 *Le matériel végétal*

282 Des plantes de cannabis et résines de cannabis provenant de différents sols ont été recueillies.

283 *Exemple 2*

284 *Analyse du matériel végétal*

285 Un extrait composé de cannabinoïdes de chaque échantillon de résine de cannabis est préparé  
286 par extraction selon les modes de réalisation de la présente demande. Ces extraits ont été  
287 systématiquement analysés par CLHP. Une telle analyse semble utile pour déterminer la  
288 stratégie de la purification en aval des cannabinoïdes individuels en fonction de leur  
289 composition

290 *Exemple 3*

291 *Optimisation du procédé d'extraction à partir de la résine du cannabis et la préparation*  
292 *d'extrait riche en cannabinoïdes.*

293 Une résine du cannabis a été utilisée comme matériel de départ pour l'extraction/purification  
294 des cannabinoïdes individuels. Cet exemple est également applicable pour les résines de  
295 cannabis de toutes les plantes du genre *cannabis* contenant des cannabinoïdes. Pour la  
296 comparaison, deux méthodes sont utilisées pour préparer un extrait de résine de cannabis. 50  
297 g de résine de cannabis sont extraits, selon deux méthodes, dans 500 ml du solvant constitué

298 d'eau à un pH de 12,5, ajusté avec une solution de NaOH. L'extraction liquide/solide  
299 classique a été utilisée sous agitation (250 tr/min, à 55°C pendant 24 h) ; la même extraction,  
300 dans les mêmes conditions qu'auparavant a été réalisée sous une énergie ultrasons. Un  
301 appareil à ultrasons numérique a été utilisé. L'extraction été réalisée par impulsion de 1 min  
302 ON et 10 s Off pendant 10 min, avec une amplitude de (55%) à partir d'une puissance  
303 électrique entrante de 250 W, et à une température de 45°C. Les conditions de l'EAU ont  
304 montré un effet important sur le rendement de l'extraction, calculé comme étant le  
305 pourcentage de la masse d'extrait sec brut sur la masse initiale de la matière végétale, et  
306 également sur la décarboxylation des acides cannabinoïdes déterminée comme étant le  
307 rapport  $\frac{\Delta 9\text{-THCA}}{\Delta 9\text{-THC}}$ .

308 Les auteurs de la présente demande ont observé le fait que le phénomène de cavitation (200 à  
309 250 W, et à basse fréquence,  $\leq 25$  kHz, à des températures entre 50°C à 90°C provoque une  
310 activation de la décarboxylation des acides cannabinoïdes. l'effet de l'énergie ultrasons qui  
311 affectent à la fois, le rendement en cannabinoïdes totales dans le milieu d'extraction et de  
312 l'état de décarboxylation est représenté sur la fig. 2 et fig.3, respectivement.

313 La figure 4 montre la comparaison entre les chromatogrammes issues des extraits préparés à  
314 l'aide d'une extraction classique solide/liquide dans l'eau à un pH de 12,5, et sous agitation  
315 pendant 24 h (Fig. 4 (A)), ou en utilisant l'EAU, dans les conditions optimisées, comme  
316 mentionné ci-dessus, dans l'eau à pH 12,5 (Fig. 4 (B)). Les extraits obtenus après filtration  
317 selon les modes préférés de cette application sont utilisés comme extraits brutes.

### 318 *Exemple 3*

#### 319 Préparation de l'extrait brut riche en cannabinoïdes

320 Le filtrat recueilli de l'étape de clarification dans l'exemple 2 a été précipitée par une  
321 inversion du pH de 12,5 à 2,0 en utilisant une solution d'acide chlorhydrique (5 N) sous une  
322 agitation de 10 tr/min et à température ambiante de 25°C. La solution acide est ajouté goutte  
323 à goutte à un débit de 0,5 ml/min. Par la suite, le précipité formé est séparé de la solution  
324 aqueuse au moyen d'une centrifugation et/ou filtration. Le précipité brut est lyophilisé et  
325 ensuite utilisé comme extrait sec brut riches en cannabinoïdes pour les purification en aval.

326 *Exemple 4*

## 327 Chromatographie sur Sephadex G-10

328 De l'extrait brut (5 g) les constituants polaires ont été séparés des composés moins polaires à  
329 l'aide de Sephadex G-10 support chromatographique. L'élution a été réalisée en utilisant 1  
330 litre d'eau à pH 6.5 à 7.0 et un gradient de 100% d'eau à 100% de méthanol dans un volume  
331 total de 2 L. les fractions contenant des cannabinoïdes ont été sélectionnées à la suite  
332 d'analyses chromatographiques, incluant CLHP et CCM avec le colorant fast bleu BB  
333 comme indicateur, servant pour localiser les différentes fractions contenant des cannabinoïdes  
334 spécifiques.

335 *Exemple 5*

## 336 Chromatographie flash

337 les fractions (5 g), contenant les cannabinoïdes CDB, CBDA,  $\Delta^9$ -THCV, CBN,  $\Delta^9$ -THC,  
338 CBC,  $\Delta^9$ -THCA de l'exemple 4, ont encore été purifiés par chromatographie flash en utilisant  
339 une phase mobile de préférence chloroforme: méthanol (99.7:0.3) aussi

340 *Exemple 6*

## 341 Des analyses HPLC, CCM et spectroscopie

342 Le système HPLC est composée d'un Surveyor LC connecté à un Finnigan Thermo Scientific  
343 LCQ Advantage MAX piège à ions de masse LC-ESI-MS avec Photo Diode Array (PDA) et  
344 3D UV-Vis comme détecteurs fixés à 220 nm, 310 nm et 280 nm. La séparation  
345 chromatographique a été effectuée sur une colonne BDX-C<sub>18</sub> (150 mm x 4.6 mm de diamètre  
346 intérieur, 5  $\mu$ m). La phase mobile était constituée de méthanol (A) et d'acétonitrile (B). Le  
347 programme suivant, d'élution en gradient a été utilisé pour la séparation: 0-6 min, 66% (A);  
348 6-8 min, 66 à 55% (A); 8-13 min, 55% (A); 13-14 min, 55 à 66% (A); 14-17 min, 66% (A).  
349 Le débit est fixé à 0.7 ml/min pour un volume d'injection de 10  $\mu$ l et une température de  
350 colonne de 25°C. cela permet l'élution de la CDB, CBDA,  $\Delta^9$ -THCV, CBN,  $\Delta^9$ -THC, CBC,  
351  $\Delta^9$ -THCA, respectivement.

352 Les spectres <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C RMN ont été enregistrés dans le CD<sub>3</sub>OD en utilisant un Bruker DPX  
353 300 spectromètre. Pour chaque échantillon, 64 balayages ont été enregistrés avec les  
354 paramètres suivants: 32 K points de données, la largeur d'impulsion de 4.0 ms et un délai de

355 relaxation de 1 seconde. FID (Free induction decay) ont été transformées de Fourier avec une  
356 valeur de LB (line broadning) de 0,5 Hz. Pour l'analyse quantitative, la surface du pic a été  
357 utilisée après correction de base. Un aliquote de 5  $\mu$ l d'une solution de 50 mg/ml de la  
358 fraction séchée est repéré sur une plaque de CCM, gel de silice F254 nm (Sigma), à côté des  
359 échantillons de référence appropriés (par exemple, au mieux, pour  $\Delta^9$ -THC et CBD). Le  
360 développement de la plaque de CCM a été effectué en utilisant la phase mobile suivante:  
361 éther de pétrole 80% et 20% de l'éther diéthylique (60:80). La révélation a été effectuée à  
362 l'aide du réactif Fast-Blue B (réa 0.1% m/v aqueuse sel Fast Bleu BB BN (Sigma Corp) (100  
363 mg dans 100 ml d'eau bi-distillée). distinguées des acides par comparaison des valeurs Rf  
364 (rapport frontal) celles des molécules standard.

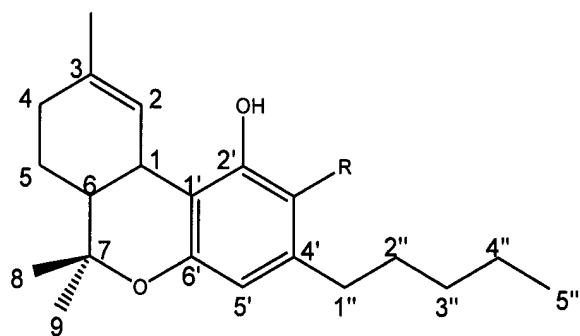
365 des préparations pures pure de cannabinoïdes ont été obtenus selon l'une des revendications  
366 mentionnées ci-dessus ayant les cannabinoïdes contenu supérieur à 75%, de préférence  
367 encore supérieure à 80%, de préférence encore supérieure à 85% selon les profils HPLC  
368 normalisées (voir figures 5 à 11 pour les chromatogrammes CLHP et les spectres de masse  
369 des exemples typiques. Le tableau 1 présente les données  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  RMN de certains  
370 cannabinoïdes.

## Revendications:

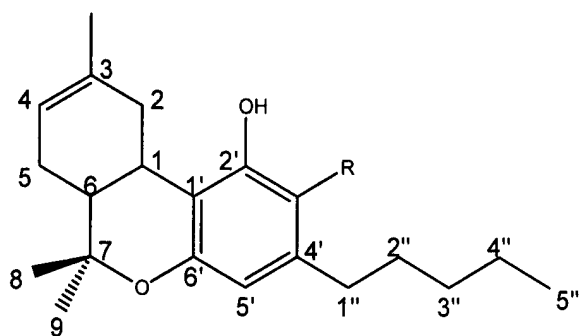
- 1) Procédé pour obtenir un extrait cannabinoïdes et/ou des cannabinoïdes acide pratiquement pur à partir de des plantes ou de sous-produits végétaux comprenant les étapes suivantes:
  - i. l'obtention d'un extrait aqueux contenant au moins une molécule de cannabinoïdes, en soumettant la matière végétale ou de sous-produits de celle-ci en mélange avec un solvant d'extraction sous une énergie ultrasonore;
  - ii. soumettre l'extrait contenant des cannabinoïdes ou cannabinoïdes acides de l'étape (i) à une clarification pour éliminer les débris végétaux;
  - iii. précipitation de cannabinoïdes à partir de l'extrait aqueux alcalin par une inversion de pH;
  - iv. récupération du précipité par filtration ou centrifugation ou toutes autres opérations à objectif similaire;
  - v. obtenir l'extrait sec à part de l'étape (iv) par lyophilisation ;
  - vi. soumettre l'extrait riche en cannabinoïdes de l'étape (iv) à une chromatographie au sur un support chromatographique de dextrane réticulé;
  - vii. soumettre les fractions contenant les cannabinoïdes, à partir de l'étape (vi) à une chromatographie le dextrane réticulé hydroxypropylé comme support chromatographique;
  - viii. purification additionnelle par chromatographie sur gel de silice C<sub>18</sub> en phase inverse;
  - ix. Les fractions purifiées à partir de (viii) sont purifiés par HPLC préparatoire.
- 2) Procédé selon la revendication 1, dans lequel la matière première est la plante de cannabis ou tout sous-produit, comprenant la résine de cannabis.
- 3) Procédé selon la revendication 1, dans lequel le rapport  $\frac{\Delta 9\text{-THCA}}{\Delta 9\text{-THC}}$  diminue avec l'augmentation de l'amplitude de l'énergie ultrasonore et à température modérément élevée.
- 4) Procédé selon la revendication 3, dans lequel la température de l'extraction est maintenue dans l'intervalle de 60 ° C à 90 ° C, plus préférentiellement entre 70°C et 85°C.
- 5) Procédé selon la revendication 1, dans lequel le solvant d'extraction est un solvant aqueux d'un pH allant de 8.0 à <14.0.
- 6) Procédé selon les revendications mentionnées ci-dessus, dans laquelle les cannabinoïdes dans l'extrait aqueux sont précipités par inversion de pH par un acide minéral.
- 7) Procédé selon la revendication 6, dans lequel le précipité a été récolté et/ou filtré, lavé et lyophilisé.
- 8) Procédé selon les revendications mentionnées ci-dessus, dans lequel l'extrait sec brut obtenu est soumis à des étapes chromatographique qui comprennent au moins une étape de chromatographie sur colonne.
- 9) Procédé selon la revendication 8, dans lequel l'étape chromatographique est basée sur le dimensionnement moléculaire, la polarité et le degré d'ionisation.
- 10) Procédé selon la revendication 8, dans lequel le support de chromatographie est un échange d'anions forts et les activités de phase inversée.



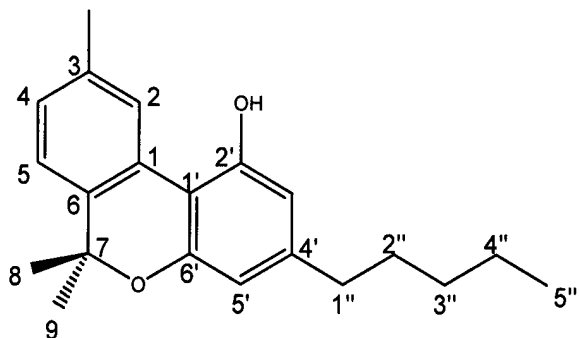
1  
2  
3  
4  
5  
6



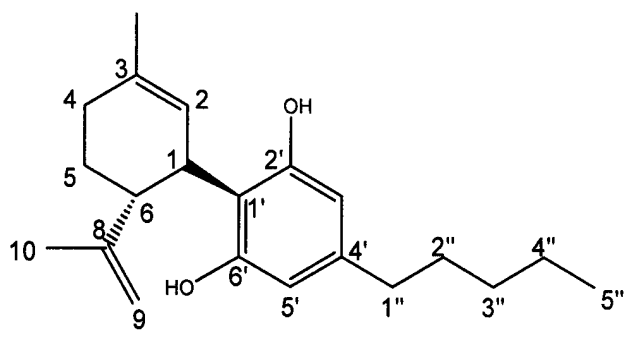
R=H, D9 tetrahydrocannabinol  
R=COOH, D9-tetrahydrocannabinol acid



R=H, D8 tetrahydrocannabinol  
R=COOH, D8-tetrahydrocannabinol acid



Cannabinol



Cannabidiol

7  
8

9

Fig. 1

10

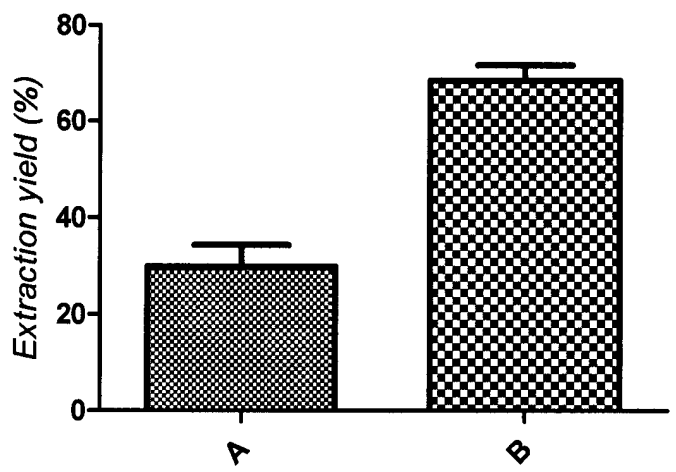
11

12

13

14

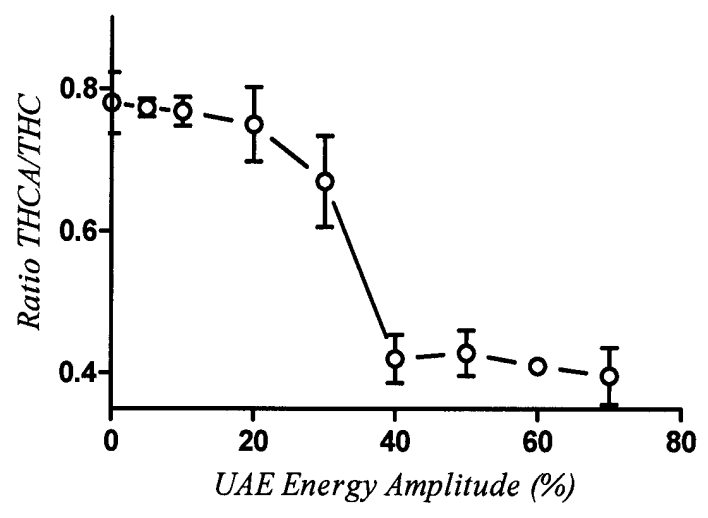
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23



24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

*Fig. 2*

33  
34  
35  
36  
37  
38  
39



40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

*Fig. 3*

1. 3

51

52

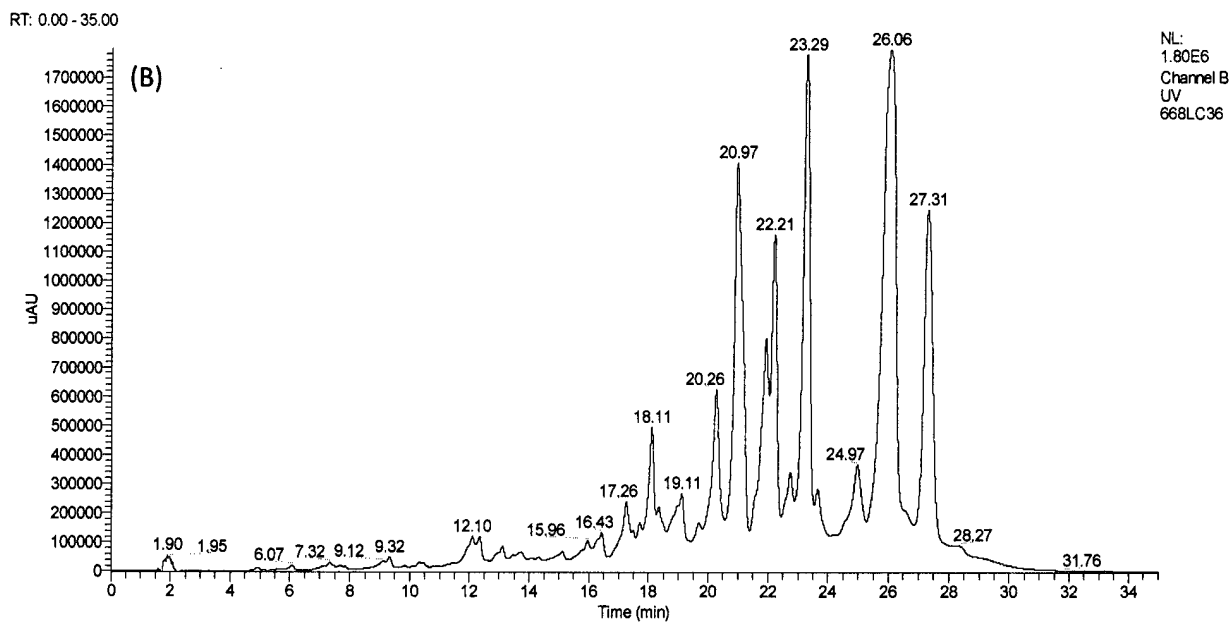
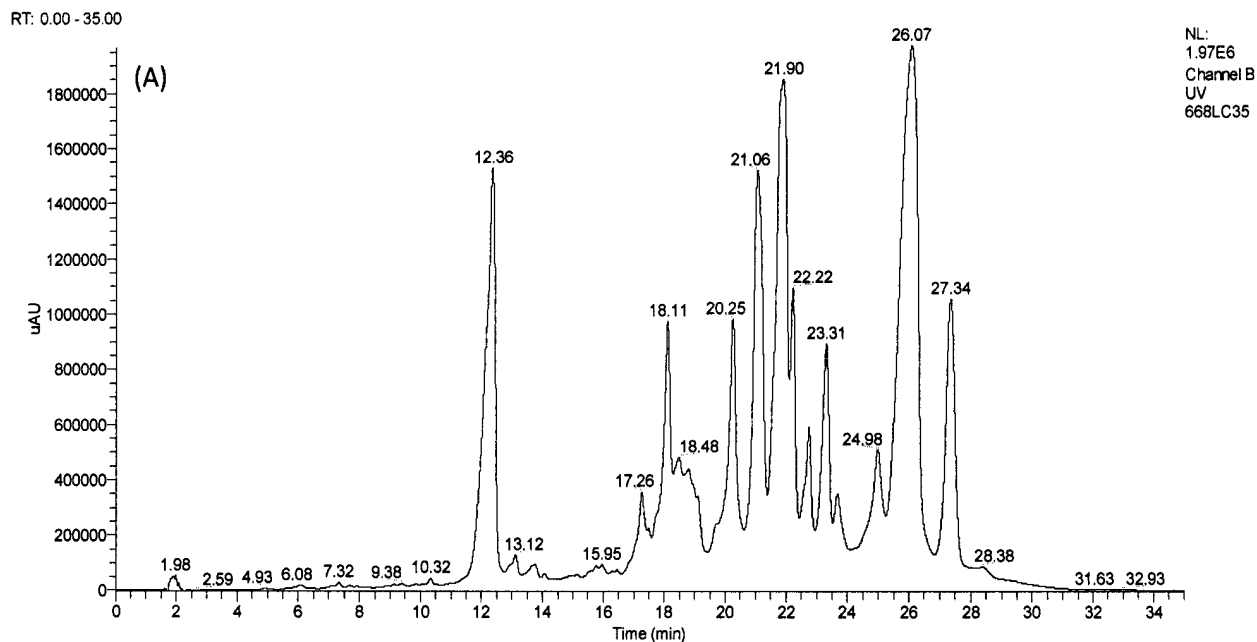


Fig. 4

53

54

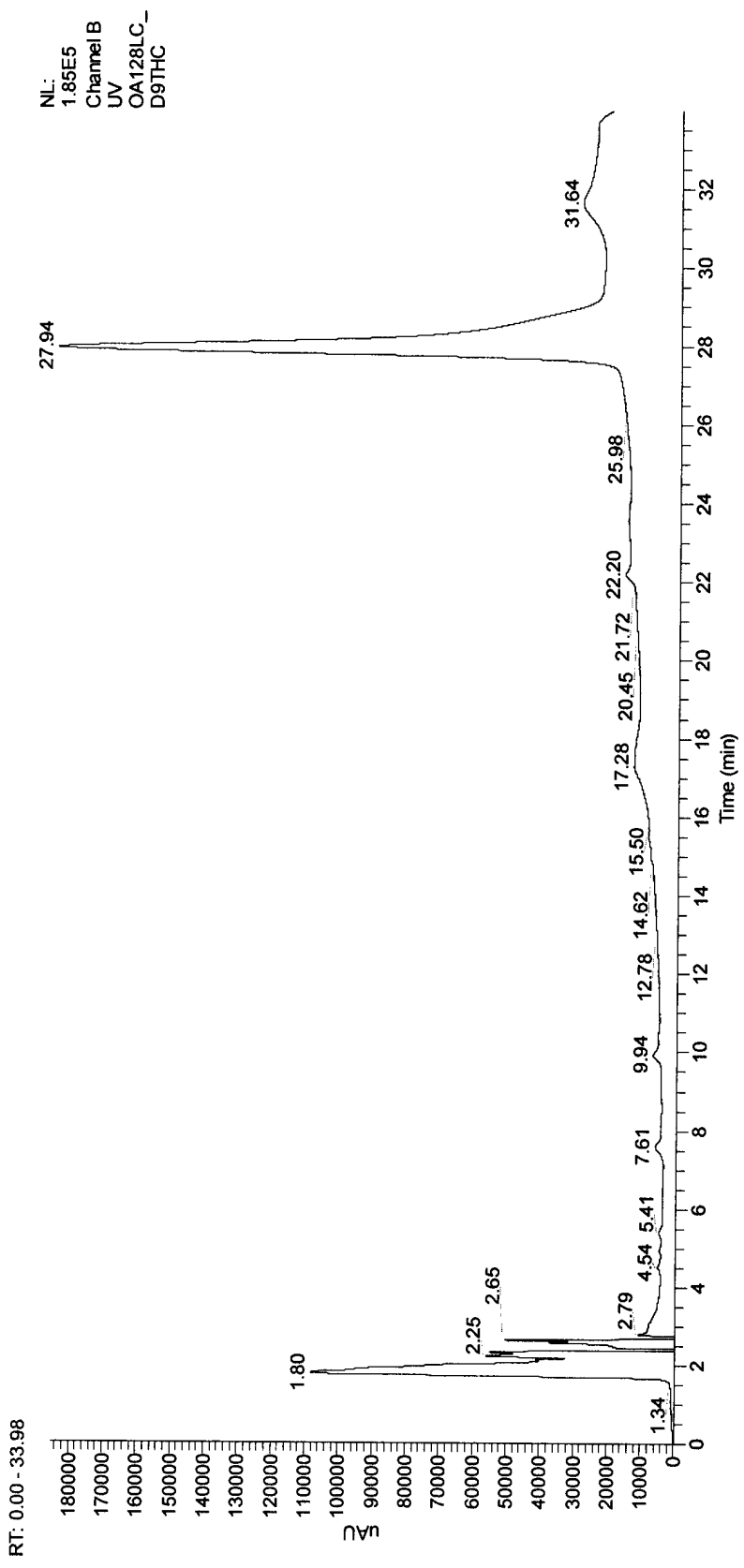


Fig. 5

*Handwritten signature*

55

56

57

58

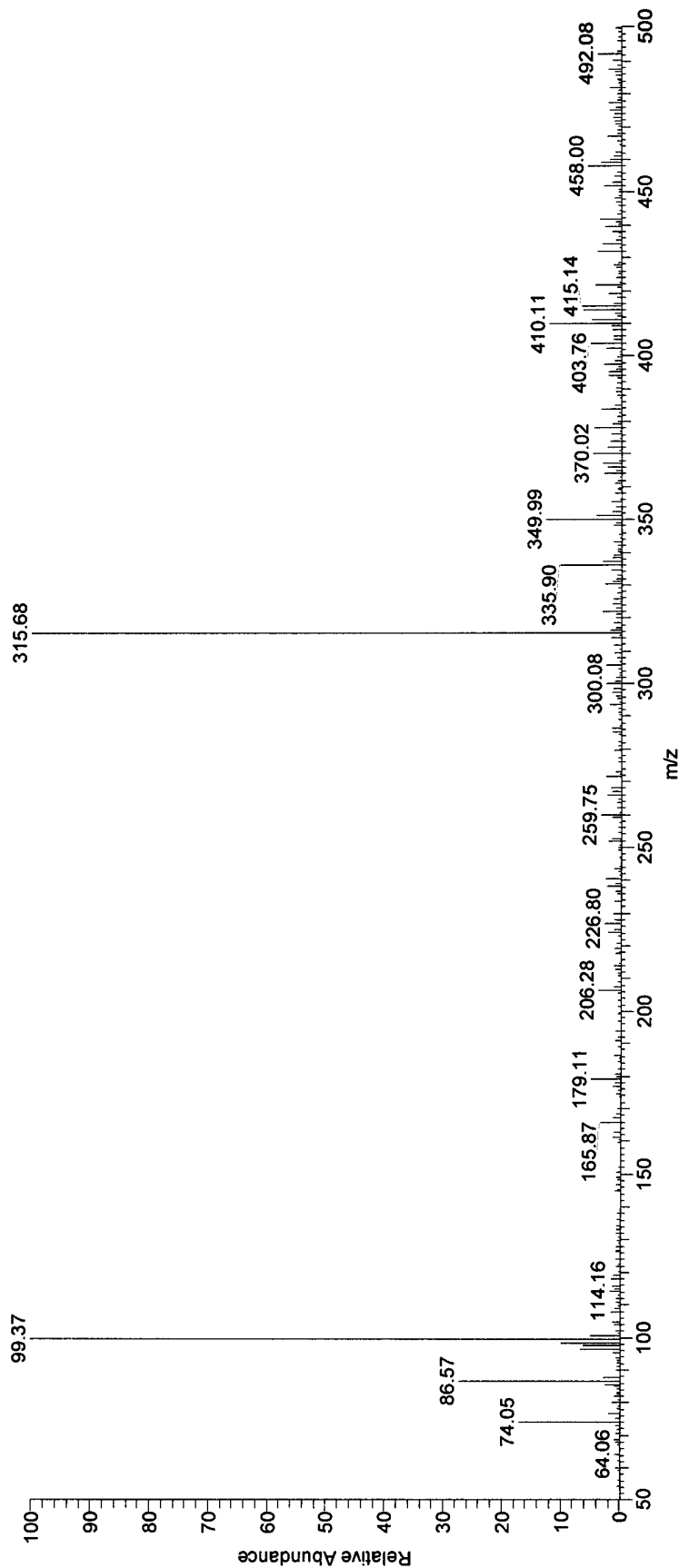
59

60

61

62

OA128LC\_D9THC\_Pur #2305 RT: 27.94 AV: 1 NL: 6.69E6  
T: + c ESI Full ms [50.00-500.00]



63

64

65

66

Fig. 6

*img 4/c*

NL:  
1.26E6  
Channel A  
UV  
F370LC\_C  
BD

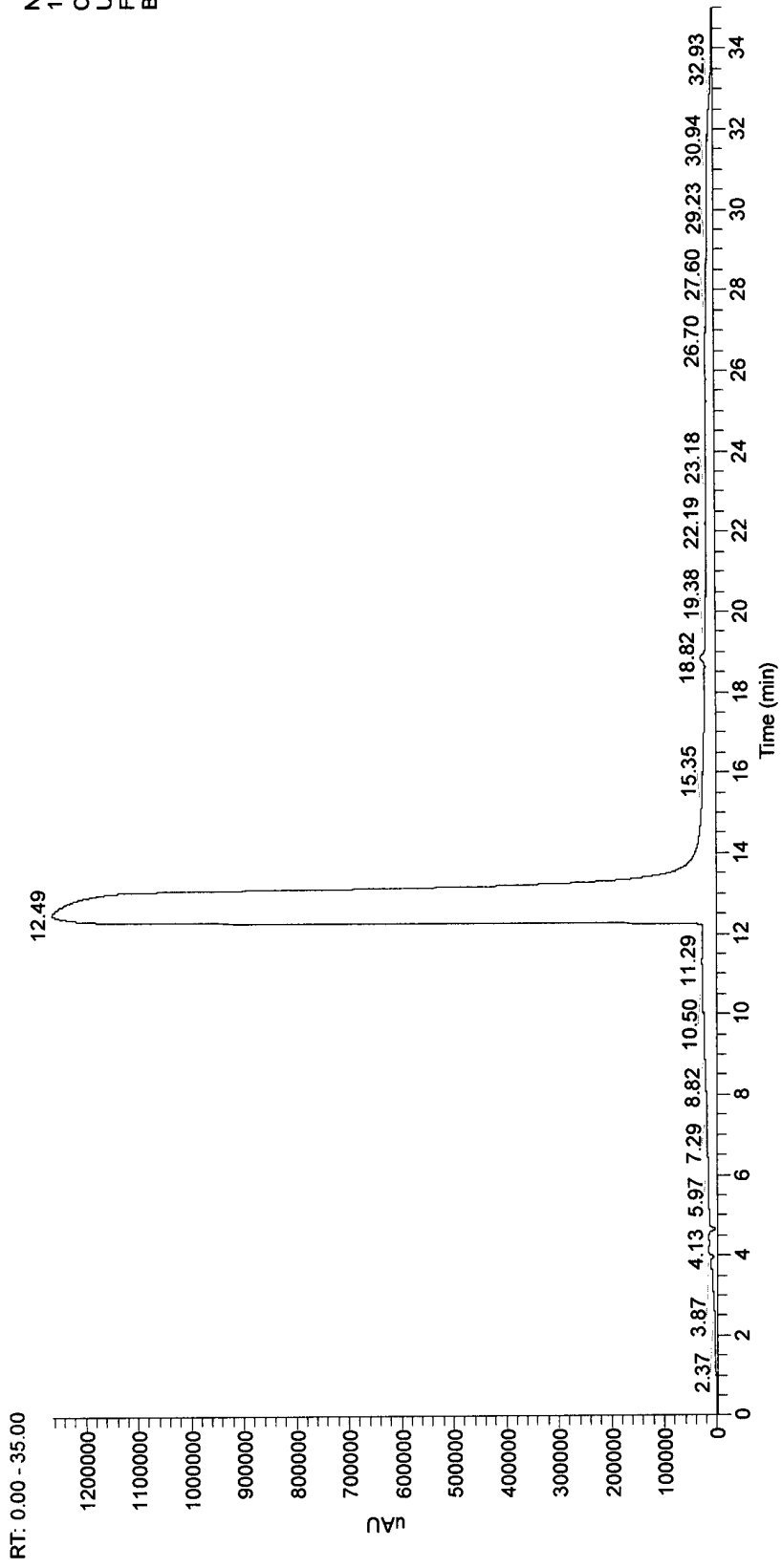


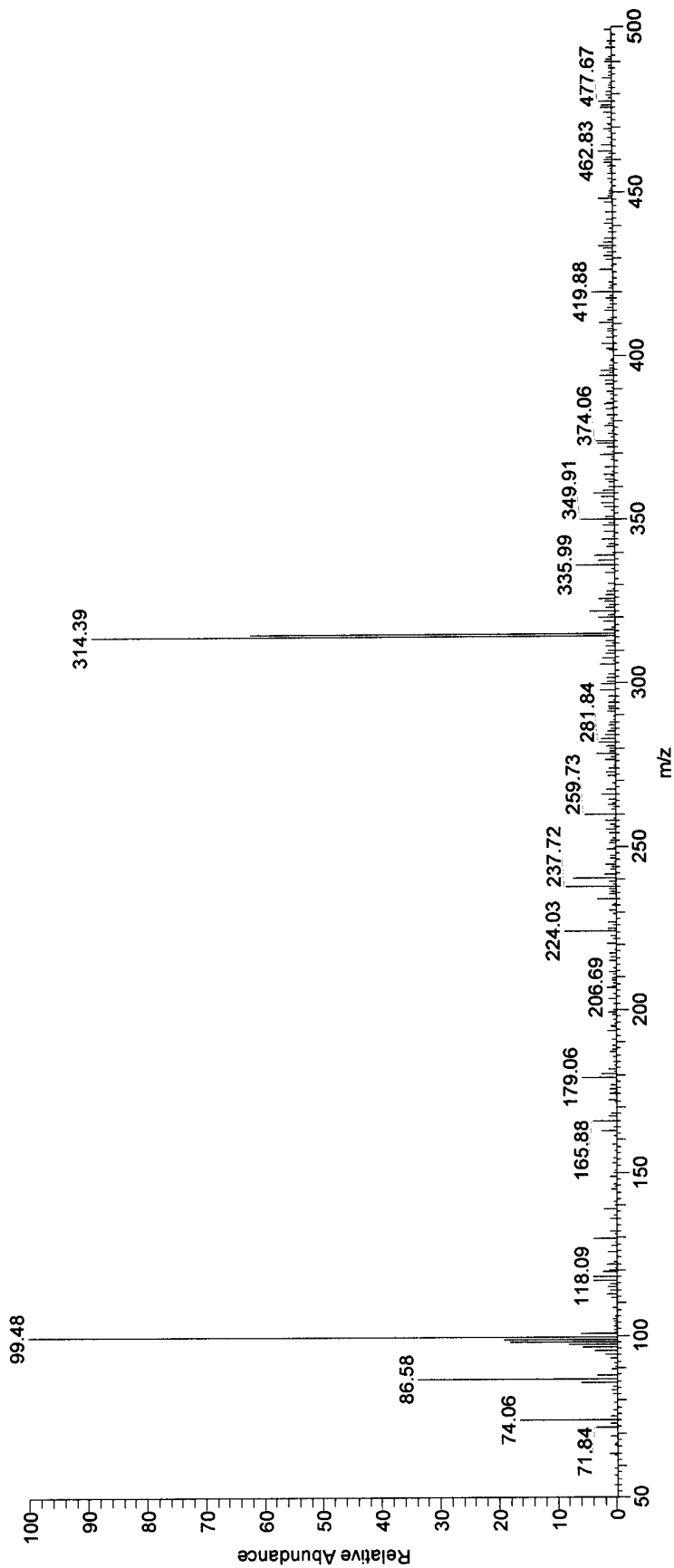
Fig. 7

*Handwritten signature*  
5/10

73

74

OA128LCP\_CBD #1031 RT: 12.49 AV: 1 NL: 5.27E6  
T: + c ESI Full ms [50.00-500.00]



75

76

77

78

Fig. 8

*Handwritten signature*



NL  
1.05E6  
Channel A  
UV  
OA128LC\_  
D9THCA

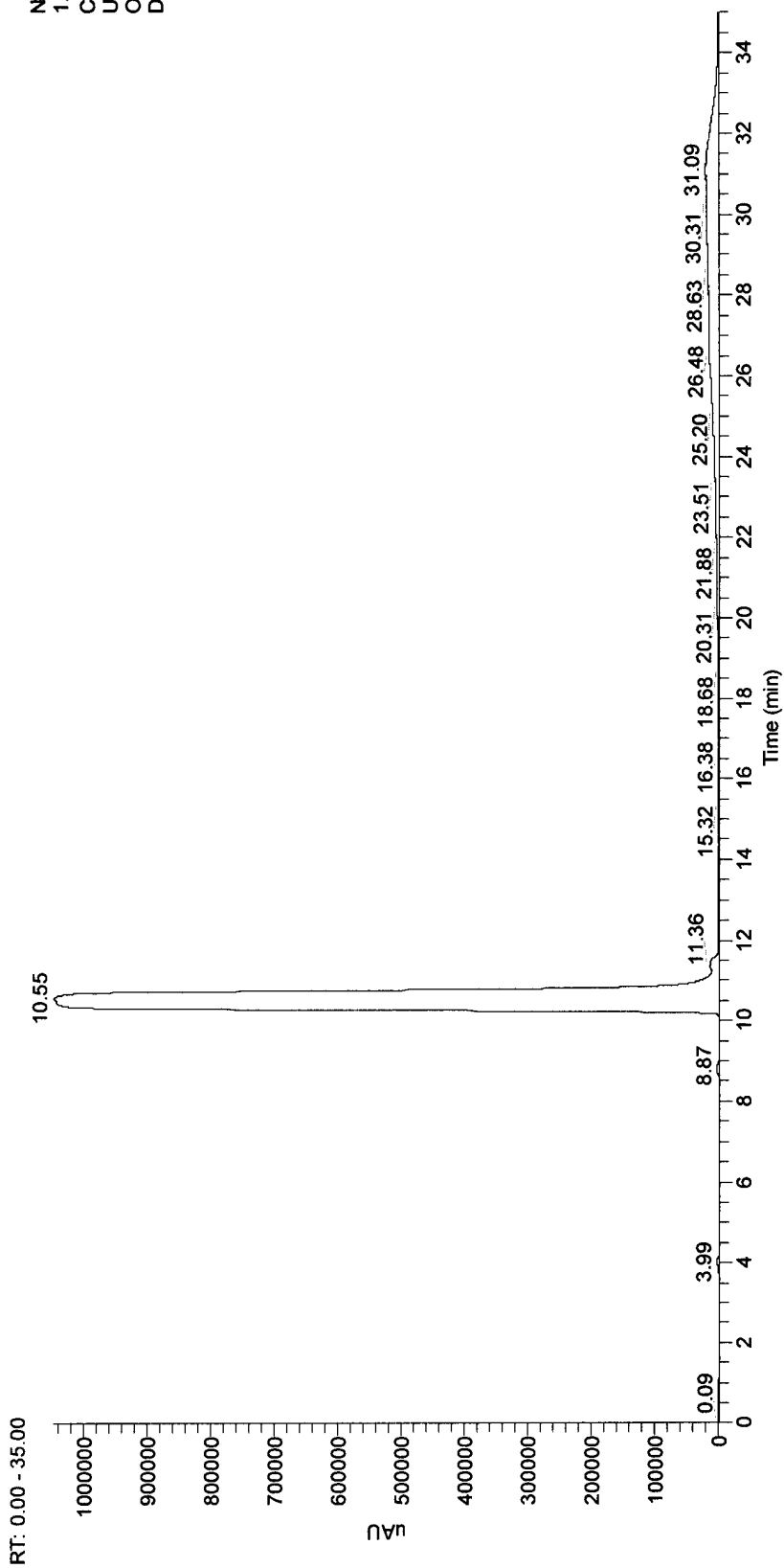


Fig. 9

*Handwritten signature*

79

80

81

82

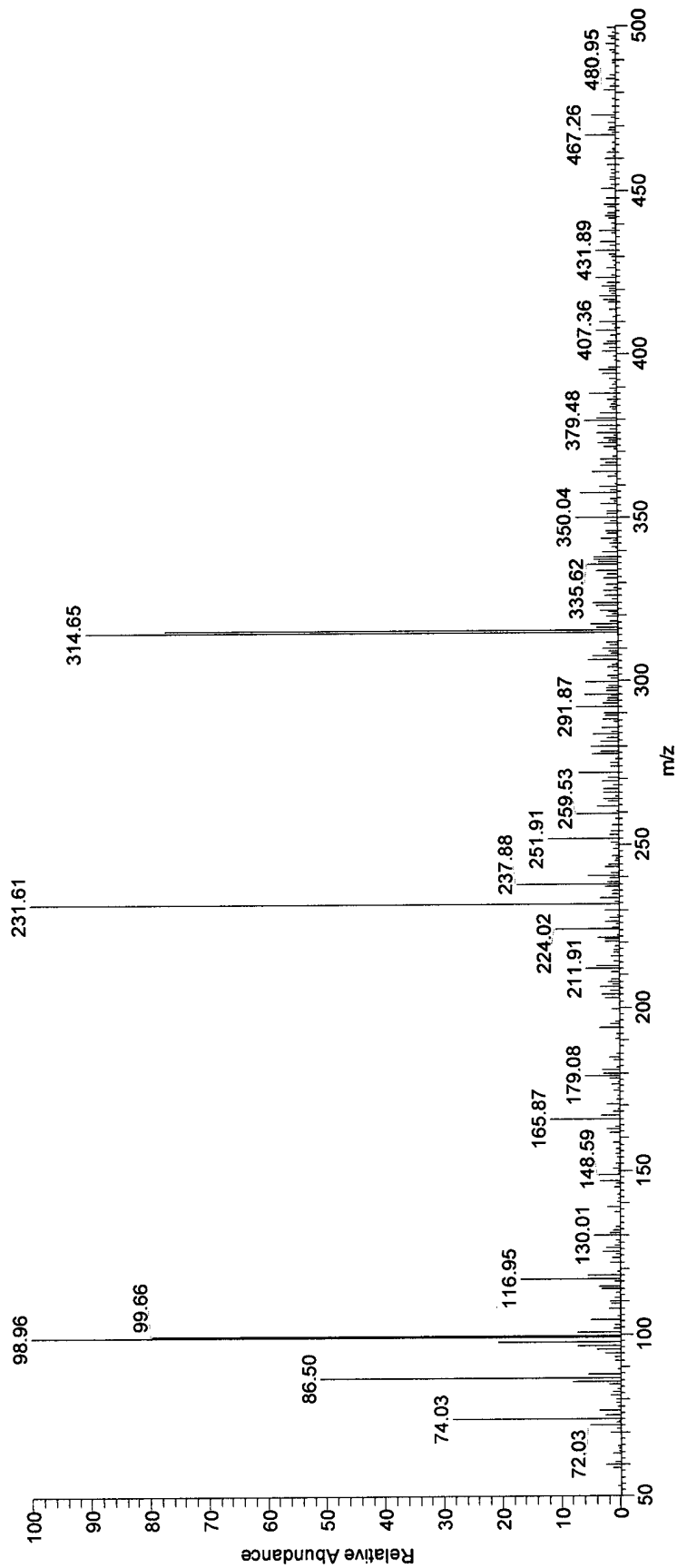
83

84

85

86

OA128LCP\_D9-THCA #873 RT: 10.57 AV: 1 NL: 3.55E6  
T: +c ESI Full ms [50.00-500.00]



87

88

89

90

Fig. 10

*Handwritten signature*

NL:  
1.91E6  
Channel A  
UV  
668LC33

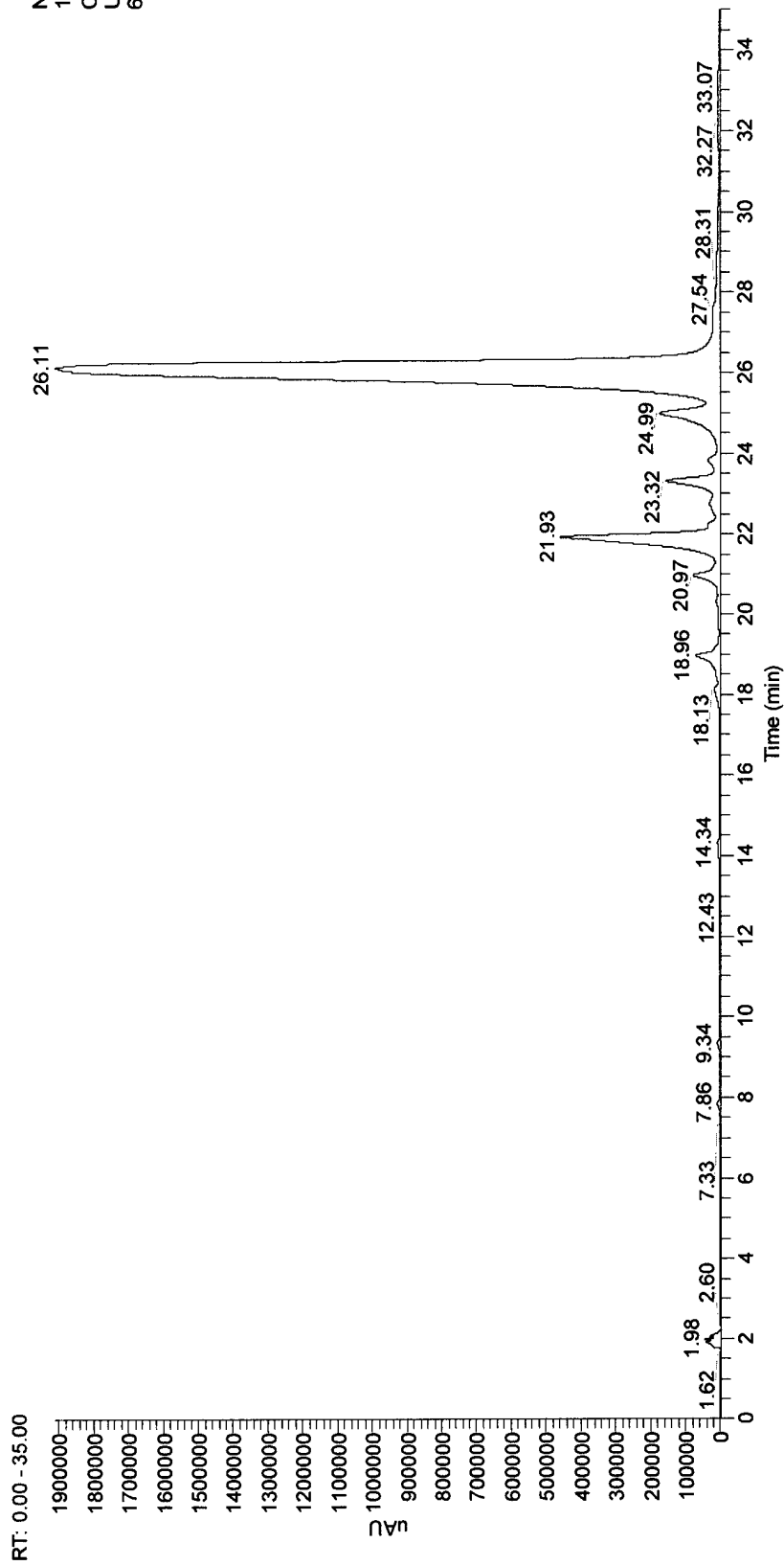


Fig. 11

*Time 6/c*

97

98

Cannabidiol <sup>a</sup>		A9-Tetrahydrocannabinol <sup>a</sup>			
Position	<sup>1</sup> H NMR in CD <sub>3</sub> OD (400 MHz)	<sup>13</sup> C NMR in CD <sub>3</sub> OD (100 MHz)	Position	<sup>1</sup> H NMR in CDCl <sub>3</sub> (400 MHz)	<sup>13</sup> C NMR in CDCl <sub>3</sub> (100 MHz)
1	3.87 (1H, <i>dm</i> , 11.8 Hz)	-	1	3.21 (1H, <i>dm</i> , 10.8 Hz)	33.6
2	5.43 (1H, <i>s</i> )	-	2	6.3 (1H, <i>q</i> , 1.6 Hz)	123.6
3	-	134.32	3	-	134.3
4	2.28 (1H, <i>m</i> ), 2.11 (1H, <i>m</i> )	-	3-Me	1.67 (3H, <i>s</i> )	23.6
5	1.71 (2H, <i>m</i> )	32.01	4	2.16 (2H, <i>m</i> )	31.3
6	2.78 (1H, <i>td</i> , 14.8 Hz, 5.03 Hz)	46.5	5	1.93 (1H, <i>m</i> ), 1.41 ( <i>m</i> )	25.2
7	1.64 (3H, <i>s</i> )	23.4	6	1.69 ( <i>m</i> )	45.7
8	-	150.2	7	-	76.6
9	4.38 ( <i>trans</i> , 1H, <i>m</i> )	110.2	8	1.41 (3H, <i>s</i> )	27.6
10	1.65 (3H, <i>s</i> )	19.8	9	1.09 (3H, <i>s</i> )	19.3
1'	-	115.3	1'	-	110.9
2'	-	157.3	2'	-	154.7
3'	6.06 (1H, <i>bbs</i> )	108.1	3'	6.12 (1H, <i>d</i> , 1.6 Hz)	107.5
4'	-	142.5	4'	-	142.8
5'	6.01 (2H, <i>s</i> )	108.1	5'	6.30 (1H, <i>d</i> , 1.6 Hz)	110.1
6'	-	150.2	6'	-	154.2
1''	2.39 (2H, <i>t</i> , 7.5 Hz)	36.5	1''	2.43 (2H, <i>td</i> , 7.3 Hz, 1.6 Hz)	35.4
2''	1.55 (2H, <i>q</i> , 7.5 Hz)	32.0	2''	1.56 (2H, <i>q</i> , 7.8 Hz)	30.6
3''	1.28 ( <i>m</i> )	32.5	3''	1.30 ( <i>m</i> )	31.6
4''	1.28 ( <i>m</i> )	23.4	4''	1.30 ( <i>m</i> )	22.5
5''	0.87 (3H, <i>t</i> , 7.11 Hz)	14.3	5''	0.87 (3H, <i>t</i> , 7.1 Hz)	14.0
2'-OH	-	-	2'-OH	4.83 (1H, <i>s</i> )	-
6'-OH	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>): spectra determined at 400 MHz

100

Tab. 1

/ *Wang &*



**RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE AVEC  
 OPINION SUR LA BREVETABILITE**

**Renseignements relatifs à la demande**

N° de la demande : 37112

Date de dépôt : 06/06/2014

Déposant : UNIVERSITE AL AKHAWAYN

Intitulé de l'invention : NOUVEAU PROCEDE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DE CANNABINOIDES.

Le présent document est le rapport de recherche préliminaire avec opinion écrite sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément à l'article 43 et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17/97 relative à la protection de la propriété industrielle.

- Les documents cités par l'examineur dans la partie Rapport de recherche sont joints au présent document

Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :

Partie 1 : Considérations générales

- Cadre 1 : Base du présent rapport
- Cadre 2 : Priorité
- Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés

Partie 2 : Rapport de recherche

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité

- Cadre 4 : Remarques de clarté
- Cadre 5 : Déclaration motivée quand à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle
- Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée
- Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention

Examineur: TELLAA REDOUANE

Téléphone: 0522586414

Email : tellaa@ompic.ma

Date d'établissement du rapport : 10/10/2014

**Partie 1 : Considérations générales**

Cadre 1 : basé du présent rapport

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description  
Pages 1-13
- Revendications  
1 - 10
- Planches de dessin  
Pages 16 -27

**Partie 2 : Rapport de recherche****Classement de l'objet de la demande :**

CIB: A61K31/352; B01D11/00; B01D11/02; A61P1/08.

CPC: A61K31/352; B01D11/00; B01D11/02.

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

**EPOQUE, Espacenet, Orbit**

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
A	US20040138293 ; JAEGGY CHRISTOPH [CH]; SCHALLER GERHARD [CH]; WERNER MICHAEL FORSCH HISCIA VER FUER KREBSFO [CH]; 12/09/2002.	1 - 10
A	EP2311475; GW PHARMA LTD [GB]; 20/04/2011	1 - 10
A	WO03064407; RESOLUTION CHEMICALS LTD [GB]; GOODWIN NEIL JOHN [GB]; ARCHER NICOLAS JAMES [GB]; MURRAY CHRISTOPHER [GB]; GREENWOOD ALAN KENNETH [GB]; MCHATTIE DEREK [GB]; 07/08/2003.	1 - 10

**\*Catégories spéciales de documents cités :**

-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément  
-« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier  
-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent  
-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs  
-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

**Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité**

Cadre 5 : Déclaration motivée quand à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté (N)	Revendications 1 - 10 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1 - 10 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1 - 10 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

- D1 : US20040138293 ; JAEGGY CHRISTOPH [CH]; SCHALLER GERHARD [CH]; WERNER MICHAEL FORSCH HISCIA VER FUER KREBSFO [CH]; 12/09/2002.  
 D2 : EP2311475; [GB GW PHARMA LTD ; 20/04/2011  
 D3 : WO03064407; RESOLUTION CHEMICALS LTD [GB]; GOODWIN NEIL JOHN [GB]; ARCHER NICOLAS JAMES [GB]; MURRAY CHRISTOPHER [GB]; GREENWOOD ALAN KENNETH [GB]; MCHATTIE DEREK [GB]; 07/08/2003.

**1. Nouveauté (N) :**

Le document D1 considéré comme l'état de la technique le plus proche divulgué, un procédé pour l'obtention d'extrait de cannabinoïdes à partir de plante de cannabis. Le procédé contient les étapes suivantes :

- Mettre en contact la matière végétale découpée et séchée avec deux à trois fois la quantité en poids d'un solvant organique qui insoluble dans l'eau.
- Soumettre l'extrait obtenu contenant les cannabinoïdes à une filtration pour éliminer les débris végétaux.
- Le filtrat est ensuite extrait deux fois à l'aide d'une solution hydro-alcoolique d'hydroxyde à de sodium 2%, l'alcool utilisé est de préférence l'éthanol.
- La phase aqueuse/éthanolique est ensuite mélangée avec une solution d'acide sulfurique à 5% pour obtenir une valeur acide à PH de l'ordre de 2 à 4
- Récupération du précipité par distillation du solvant sous vide à basse température.
- Le résidu est ensuite soumis à une séparation chromatographique sur gel de silice hydrophobe.
- L'identification et la détermination de la pureté des fractions à lieu à l'aide d'une HPLC.
- Le produit final est ensuite chauffé à environ 110°C à 135°C dans un autoclave, pendant environ 40 minutes à l'abri de l'oxygène.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 est nouveau conformément à l'article 26 de la loi N° 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

## **2. Activité inventive (AI) :**

L'objet de la revendication 1 de la présente demande diffère de D1 en ce que le procédé d'extraction des cannabinoïdes utilise de l'eau lors de la première étape d'extraction assistée d'une énergie ultrasonore.

L'effet technique de cette différence est que l'énergie ultrasonore va permettre la diffusion de solvant d'extraction à travers le matériel organique, et au même temps active la décarboxylation des formes acides cannabinoïdes.

Le problème technique que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme fournir une technique alternative pour l'extraction des cannabinoïdes.

La solution que la présente demande propose n'est pas évidente pour l'homme de métier à l'égard de l'art antérieur pour les raisons suivantes :

l'utilisation de l'eau assistée d'une énergie ultrasonore dans la première étape d'extraction n'est pas divulgué dans l'art antérieur, l'homme de métier ne s'attendrait pas à un effet technique comme celui démontré dans la description (exemple 3 page 10 ; figure 2, 3 et 4), ce qui aura pour cause la réduction de temps d'extraction et la consommation d'énergie ainsi que la quantité de solvants organiques toxiques utilisés lors de l'extraction.

Par conséquent, l'objet des revendications 1 implique une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi N° 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications dépendantes 2 - 10 sont nouvelles et impliquent une activité inventive conformément à

l'article 28 de la loi N° 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

## **3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.