

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 503**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61K 31/05** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**C07C 39/23** (2006.01)  
**C07D 311/58** (2006.01)  
**C07D 311/80** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.05.2020** **PCT/CA2020/050588**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2020** **WO20223800**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2020** **E 20801549 (5)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** **EP 3962473**

54 Título: **Formulación para el manejo del dolor que comprende tetrahidrocannabinol (THC), cannabicromeno (CBC) y cannabidiol (CBD) en una proporción determinada**

30 Prioridad:

**03.05.2019 US 201962842696 P**  
**17.04.2020 US 202063011508 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.11.2024**

73 Titular/es:

**ZYUS LIFE SCIENCES INC. (100.0%)**  
**204 - 407 Downey Road**  
**Saskatoon SK S7N 4L8, CA**

72 Inventor/es:

**ZETTL, BRENTON HAROLD**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 503 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Formulación para el manejo del dolor que comprende tetrahidrocannabinol (THC), cannabicromeno (CBC) y cannabidiol (CBD) en una proporción determinada

## Campo

- 5 La presente divulgación se refiere en general a formulaciones que consisten en tetrahidrocannabinol (THC), cannabicromeno (CBC) y cannabidiol (CBD), y uno o más excipientes para uso en el tratamiento del dolor.

## Antecedentes

- 10 Las personas que controlan el dolor a menudo recurren a opciones medicinales que alivian el dolor, pero que van acompañadas de efectos secundarios no deseados, como malestar estomacal, estreñimiento y riesgo de adicción. Se necesitan con urgencia alternativas a los medicamentos opiáceos.

- 15 Los cannabinoides son un grupo de compuestos estructuralmente similares aislados de las plantas de cannabis, que activan los receptores de cannabinoides y los canales iónicos en las células. Los cannabinoides pueden sintetizarse o aislarse de plantas de cannabis o extractos de plantas (en este caso: un extracto de planta que contiene cannabinoides). Los cannabinoides se pueden aislar de plantas o extractos en la medida en que se obtengan en forma casi pura, o esencialmente pura, libre de cantidades significativas de otros compuestos naturales, tales como otros cannabinoides o moléculas derivadas de plantas tales como los terpenos. Los cannabinoides conocidos incluyen, pero no se limitan a, tetrahidrocannabinol (THC); cannabidiol (CBD), cannabicromeno (CBC); tetrahidrocannabidivarina (THCV); ácido tetrahidrocannabinólico (THCA); cannabigerol (CBG); cannabidivarina (CBDV), cannabinol (CBN) y ácido cannabidiólico (CBDA). Las plantas de cannabis se pueden cultivar para que tengan diferentes cantidades de un determinado cannabinoide, según sea deseable para diferentes propósitos. Hasta la fecha, el THC y el CBD se han considerado los cannabinoides de interés predominantes.

- 20 Del CBD se han estudiado ampliamente sus efectos medicinales. Se considera que el CBD tiene un efecto sobre la neurotransmisión mediada por el receptor 5HT<sub>1A</sub>, así como sobre el metabolismo de la anandamida y la activación de los canales del receptor TRPV1 que facilitan las respuestas mediadas por CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Crippa JS 2018).

- 25 El  $\Delta^9$ -THC ejerce una actividad agonista parcial sobre los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> con una alta afinidad de unión con el receptor CB<sub>1</sub>, lo que conduce a su actividad psicoactiva.

- 30 El cannabicromeno (CBC) es un importante cannabinoide no psicotrópico que se encuentra naturalmente en la planta de Cannabis sativa (Elsohly M 2014).

Sin embargo, la proporción de cada uno de estos cannabinoides en la planta de cannabis depende de las condiciones ambientales de crecimiento, la ubicación geográfica, la genética y el quimiotipo (Lewis MA 2017).

- 35 El CBC tiene una afinidad moderada ( $K_i \sim 100$  nanomolar) solo para los receptores CB<sub>2</sub> y se une a los receptores CB<sub>1</sub> solo en concentraciones superiores a 1 micromolar (Shinjo N 2013). Se ha sugerido que la principal actividad del CBC en el cerebro depende en parte de la activación indirecta del receptor CB<sub>1</sub> mediante la inhibición de la absorción celular de anandamida (De Petrocellis L 2011) y la activación de los canales TRPA1 (potencial del receptor transitorio A1) (Izzo y Capasso R 2012). De hecho, se ha encontrado que el CBC es el agonista más potente de todos los fitocannabinoides en los canales TRPA1 (Maione S 2011). El CBC también ha demostrado efectos antiinflamatorios (Izzo y Capasso R 2012).

- 40 Se ha demostrado que el CBD puede actuar sinérgicamente con  $\Delta^9$ -THC y contribuyen al efecto analgésico del extracto de cannabis de base medicinal (Russo 2011).

La actividad agonista del CBC con los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> puede ofrecer un enfoque prometedor para potenciar el efecto de otros cannabinoides que ejercen sus actividades mediante la unión y activación de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>.

- 45 Se conocen los usos medicinales de los cannabinoides y se han descrito formulaciones específicas para tratar el dolor. El documento WO2007/083098 A1 (GW Pharma Ltd) describe extractos de plantas que contienen cannabinoides para el tratamiento de la degeneración neural. La publicación de patente de EE. UU. No. US2016/0106705 (United Cannabis Corp.) describe extractos de cannabis que tienen al menos cuatro cannabinoides y un terpeno o flavonoide para su uso en el alivio de la ansiedad, el dolor y los trastornos relacionados. El documento WO2016/044370 A1 (India Globalization Capital Inc.) enseña una formulación tópica para aliviar el dolor que contiene una combinación de THC, CBD y cobalamina. El documento WO2013/165251 A1 (ECHO Pharmaceuticals BV) describe un método de evaporación de película fina para obtener aislados que contienen THC, que pueden tener sólo trazas de CBN o CBD. En el documento WO2012/144892 A1 (Fitagoras BV), se describe el uso de cannabinoides ácidos como THC, CBD y otros

cannabinoides para mejorar la resistencia celular natural de un animal a las enfermedades. Además, en el documento WO2012/160358 A1 (GW Pharma Ltd.), se describe el uso de al menos uno de CBG, CBC, CBDV y THCV como tratamiento del dolor neuropático.

El potencial de las combinaciones de cannabinoides para usos medicinales no se ha explorado completamente. Es deseable proporcionar una formulación de cannabinoides con propiedades beneficiosas para su uso en el manejo del dolor.

#### Resumen

La invención se establece en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Los métodos de tratamiento deben leerse como la formulación para su uso en el método de tratamiento.

- 10 Un objeto de la presente divulgación es obviar o mitigar al menos una desventaja de formulaciones anteriores para el manejo y tratamiento del dolor.

- 15 La formulación incluye cannabidiol (CBD), (-)-trans-delta-9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC, o "THC" en el presente documento), y cannabicromeno (CBC) en cantidades destinadas a controlar o tratar el dolor en personas que lo necesitan. La formulación comprende THC, CBC y CBD como cannabinoides primarios, junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos. Los cannabinoides primarios comprenden o consisten en, en porcentaje en peso del total de cannabinoides primarios: 30 % - 45 % THC; 9 % - 35 % CBC; y 30 % - 45 % CBD. Los tipos de dolor que se controlarán con la formulación incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento del dolor debido a cáncer, lesión, accidente, cirugía, inflamación, daño tisular, artritis, dolor en las articulaciones, dolor por infección, dolor gastrointestinal, diabetes, neuropatía diabética, neuralgia postculebrilla, dolor neuropático, neuropatía periférica o esclerosis múltiple. La proporción de los cannabinoides primarios es: 1:1:1 de THC:CBC:CBD en función del peso.

Otros aspectos y características de la presente divulgación resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas.

#### Breve descripción de las figuras

- 25 A continuación se describirán realizaciones de la presente divulgación, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas.

La Figura 1 Representa el esquema de estudio para la fase conductual descrita en el Ejemplo 4.

La Figura 2 Representa el sitio de prueba utilizado para la prueba de von Frey en la pata plantar de los animales en el Ejemplo 4.

- 30 La Figura 3A Representa una fotografía de partes del cuerpo de animales relevantes para el movimiento para las observaciones de MotoRater.

La Figura 3B Es un gráfico de barras que muestra los cambios desde la línea base en los parámetros de movimiento de los animales después de una cirugía de ligadura del nervio espinal (SNL) en ratas, como modelo de dolor neuropático.

- 35 La Figura 4 proporciona una comparación de los cambios en la puntuación general de la marcha desde la línea base para el modelo simulado versus el modelo de rata SNL.

La Figura 5 Representa cambios de peso corporal a lo largo del tiempo que ilustran los efectos de distintas dosis de 1 a 3 cannabinoides en el peso corporal de ratas SD operadas con SNL.

- 40 La Figura 6 Representa el efecto de diferentes formulaciones de cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL en ratas utilizando el umbral de retirada de la pata (PWT).

La Figura 7 representa el área bajo la curva (AUC) de la Figura 6 en un subconjunto de animales que tomaron 5 mg/kg de diferentes cannabinoides y la significancia estadística de los grupos de tratamiento frente al vehículo para la prueba electrónica de von Frey.

- 45 La Figura 8 Representa los efectos de múltiples dosis distintas de cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL medida por los cambios del evF. El Panel A compara diferentes grupos de tratamiento en un período de tiempo común, mientras que el Panel B muestra comparaciones dentro de un grupo de tratamiento a lo largo del tiempo.

- 50 La Figura 9 representa la puntuación general de la marcha entre el día 7 y el día 9 después del tratamiento en tasas de SNL. El Panel A compara diferentes grupos de tratamiento en un período de tiempo común, mientras que el Panel B muestra comparaciones dentro de un grupo de tratamiento a lo largo del tiempo.

La Figura 10A Representa un gráfico de barras vectoriales discriminantes que presenta el fenotipo motor inducido por SNL, basado en el análisis de componentes principales (PCA) de línea base (BL) y las diferencias D7 en todos los grupos de estudio.

La Figura 10B es una ilustración anatómica del sitio de ligadura del nervio espinal.

- 5 La Figura 10C Representa un diagrama de flujo del protocolo y los parámetros del análisis cinemático de la marcha motora fina.

La Figura 11 representa el área bajo la curva (AUC) para un subconjunto de animales que toman 10 mg/kg de diferentes formulaciones de cannabinoides. El panel superior ilustra el porcentaje desde la línea base dentro de un grupo de tratamiento a lo largo del tiempo.

- 10 La Figura 12 describe los efectos de múltiples dosis distintas de cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL medida por el evF. El panel A representa una comparación de diferentes tratamientos en cada momento; El panel B representa comparaciones dentro de un grupo de tratamiento a lo largo del tiempo.

- 15 La Figura 13 describe los efectos de múltiples dosis distintas de formulaciones de cannabinoides sobre la hipersensibilidad mecánica utilizando evF, comparados a lo largo del tiempo. El panel A representa una comparación entre grupos de tratamiento, mientras que el panel B representa una comparación dentro de un grupo de tratamiento a lo largo del tiempo.

La Figura 14 representa los efectos de múltiples dosis distintas de cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL medida por el evF.

- 20 La Figura 15 Representa puntuaciones generales de la marcha de animales con SNL. El Panel A compara entre grupos de tratamiento, mientras que el Panel B compara dentro de un grupo de tratamiento a lo largo del tiempo.

La Figura 16 Representa representantes de los parámetros cinemáticos de la marcha que ilustran el impacto de agregar CBC al CBD+THC en la línea base, D7, D8-5h, D8-9h y D9 después de la dosificación.

- 25 La Figura 17 Representa una traza representativa de la corriente producida por la aplicación de aceite de mostaza 3000  $\mu$ M.

La Figura 18 proporciona un esquema de ciertos aspectos del diseño del estudio del canal iónico.

La Figura 19A proporciona representación gráfica e información numérica de la actividad de los compuestos en los receptores TRPA1 que muestran una curva de respuesta de la concentración de CBD+THC de los efectos agonistas en los Paneles A al F.

- 30 La Figura 19B proporciona una representación gráfica e información numérica de la actividad de los compuestos en los receptores TRPA1 que muestran una curva de respuesta de la concentración de CBD+THC de los efectos agonistas en los Paneles G a L.

La Figura 20A muestra gráficos e información numérica de la actividad de los compuestos en los receptores TRPA1 para una curva de respuesta de CBC de los efectos agonistas en los Paneles A al F.

- 35 La Figura 20B proporciona gráficos e información numérica de la actividad de los compuestos en los receptores TRPA1 para una curva de respuesta de CBC de los efectos agonistas en los Paneles G a L.

#### Descripción detallada

Generalmente, la presente divulgación proporciona una formulación para usar en el tratamiento del dolor.

- 40 La formulación contiene tres ingredientes cannabinoides principales, aunque también pueden estar presentes otros cannabinoides. Para los tres ingredientes cannabinoides principales, las proporciones de los tres entre sí se han optimizado entre sí. Los siguientes ingredientes cannabinoides principales están presentes en la formulación: (-)-trans-delta-9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), que en el presente documento se denomina "THC", cannabicromeno (CBC) y cannabidiol (CBD). La cantidad (porcentaje peso/peso) de THC:CBC: CBD presente en la formulación, expresada entre sí como porcentaje de estos ingredientes cannabinoides primarios, puede ser de 30 % - 45 % de THC; 9 % - 35 % CBC y 30 % - 45 % CBD.

Cuando dichos rangos se expresan como proporciones, la proporción de THC, CBC y CBD es 1:1:1.

- 50 Las dosis dentro de estas proporciones, en cantidad en mg, pueden ser, por ejemplo: 5 mg de THC, 5 mg de CBC y 5 mg de CBD por dosis. Una cantidad mayor por dosis, pero en proporciones similares, puede ser una cantidad de 8 mg de THC, 8 mg de CBC y 8 mg de CBD por dosis. Es el contenido de cannabicromeno (CBC) el que varía principalmente en esta formulación, mientras que el contenido de THC y CBD se proporciona en

cantidades similares que generalmente son iguales a la cantidad de CBC. Los tres ingredientes cannabinoides principales están presentes en cantidades aproximadamente similares.

Por consiguiente, en el presente documento se proporciona una formulación para uso en un método de manejo del dolor por parte de un sujeto que lo necesita, dicha formulación comprende tetrahidrocannabinol (THC), cannabicromeno (CBC) y cannabidiol (CBD) como cannabinoides primarios, y un excipiente; en el que los cannabinoides primarios comprenden o consisten en, en porcentaje en peso:

30 % - 45 % THC;

9 % - 35 % CBC; y

30 % - 45 % CBD.

La formulación así utilizada se puede emplear para el tratamiento del dolor debido a cáncer, lesión, accidente, cirugía, inflamación, daño tisular, artritis, dolor en las articulaciones, dolor por infección, dolor gastrointestinal, diabetes, neuropatía diabética, neuralgia postculebrilla, dolor neuropático, neuropatía periférica o esclerosis múltiple.

Los cannabinoides primarios están presentes en la formulación en cantidades de acuerdo con una proporción de THC:CBC:CBD de 1:1:1.

La formulación se puede preparar en una forma de dosificación seleccionada del grupo que consiste en una píldora, tableta, cápsula de gel, jarabe, aerosol a base de aceite y forma de aceite líquido.

La formulación puede proporcionar una cantidad total de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg de cannabinoide primario por dosis, preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 20 mg. Por ejemplo, la formulación puede proporcionar al sujeto THC:CBC:CBD en cantidades de hasta 20:20:20 mg por dosis, preferiblemente en el intervalo de 5:5:5 a 10:10:10 mg por dosis.

Se proporciona un método para el manejo del dolor en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una formulación que comprende tetrahidrocannabinol (THC), cannabicromeno (CBC) y cannabidiol (CBD) como cannabinoides primarios, y un excipiente; en el que los cannabinoides primarios comprenden o consisten en, en porcentaje en peso:

30 % - 45 % THC;

9 % - 35 % CBC; y

y 30 % - 45 % CBD.

De acuerdo con el método, el dolor a tratar puede ser dolor debido a cáncer, lesión, accidente, cirugía, inflamación, daño tisular, artritis, dolor en las articulaciones, dolor por infección, dolor gastrointestinal, diabetes, neuropatía diabética, neuralgia postculebrilla, dolor neuropático, neuropatía periférica o esclerosis múltiple.

La formulación utilizada en los métodos puede ser una en la que los cannabinoides primarios estén presentes en cantidades de acuerdo con una proporción de THC:CBC:CBD de 1:1:1. En el método, la formulación se puede administrar en una forma de dosificación seleccionada del grupo que consiste en una píldora, tableta, cápsula de gel, jarabe, aerosol a base de aceite o forma de aceite líquido. El método puede implicar la administración de una cantidad total de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg de cannabinoide primario por dosis, preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 20 mg por dosis. La formulación se puede administrar en cantidades para proporcionar al sujeto THC:CBC:CBD en cantidades de hasta 20:20:20 mg por dosis, preferiblemente en el rango de 5:5:5 a 10:10:10 mg por dosis.

En el presente documento se describe el uso de una formulación, en la que la formulación comprende tetrahidrocannabinol (THC), cannabicromeno (CBC) y cannabidiol (CBD) como cannabinoides primarios, y un excipiente. El uso es para el tratamiento del dolor, o para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del dolor, en un sujeto que lo necesita, y los cannabinoides primarios utilizados en la formulación comprenden o consisten en, en porcentaje en peso:

30 % - 45 % THC;

9 % - 35 % CBC; y

30 % - 45 % CBD.

El uso puede ser para el tratamiento del dolor debido a cáncer, lesión, accidente, cirugía, inflamación, daño tisular, artritis, dolor en las articulaciones, dolor por infección, dolor gastrointestinal, diabetes, neuropatía diabética, neuralgia postculebrilla, dolor neuropático, neuropatía periférica o esclerosis múltiple.

Los cannabinoides primarios se utilizan en la formulación en cantidades de acuerdo con una proporción de THC:CBC:CBD de 1:1:1.

La formulación se puede usar en una forma de dosificación seleccionada del grupo que consiste en una píldora, tableta, cápsula de gel, jarabe, aerosol a base de aceite y forma de aceite líquido.

- 5 Cuando se usa como se describe en el presente documento, la formulación puede proporcionar una cantidad total de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg de cannabinoide primario por dosis, preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 20 mg. Además, la formulación se puede usar para proporcionar al sujeto THC:CBC:CBD en cantidades de hasta 20:20:20 mg por dosis, preferiblemente en el intervalo de 5:5:5 a 10:10:10 mg por dosis.
- 10 Cannabinoides primarios. El término "primario" pretende indicar los cannabinoides que son los principales responsables del efecto deseado del manejo del dolor, como se describe en el presente documento. El THC, el CBC y el CBD son los cannabinoides principales en este contexto. Si otro cannabinoide está presente en la formulación en una cantidad menor, aproximadamente similar o incluso mayor, la cantidad presente no significaría que el cannabinoide es un componente "primario" de la formulación, aunque dichos cannabinoides adicionales pueden estar presentes.
- 15

Fuentes de cannabinoides. Los cannabinoides primarios THC, CBC y CBD pueden estar presentes en la formulación a partir de fuentes naturales, tales como de una o más plantas de cannabis, y en particular de extractos de las mismas. O los cannabinoides pueden obtenerse de una o más fuentes aisladas, o de una fuente sintética donde se sintetiza uno o más de los cannabinoides deseados. Se puede usar una mezcla de cannabinoides naturales y sintéticos de modo que una fuente natural con un contenido variable (debido a las condiciones de crecimiento u otras razones) pueda estandarizarse a cantidades predeterminadas usando ajustes con fuentes sintéticas o aisladas.

Se puede obtener un extracto de una planta que esté especialmente modificada o cultivada en condiciones conducentes a la producción de una proporción de cannabinoides particularmente adecuada a la proporción de cannabinoides primarios deseada, sin necesidad de alterar o complementar dramáticamente la cantidad de cualquiera de los cannabinoides primarios presentes.

Si se desea la purificación de cannabinoides, se pueden utilizar métodos de extracción tales como la extracción con etanol o la extracción basada en CO<sub>2</sub>.

Las plantas se pueden mejorar o cultivar, o se pueden optimizar las condiciones de crecimiento para reflejar la proporción requerida de THC:CBC:CBD. Además, se pueden combinar dos o más plantas o extractos que tengan proporciones diferentes de la proporción deseada en cantidades que den como resultado la proporción predeterminada deseada.

Otros cannabinoides pueden estar presentes incidentalmente en la formulación y, si están presentes, las cantidades de dichos ingredientes cannabinoides adicionales no reducirían las características de manejo del dolor de la formulación.

El manejo del dolor. El uso previsto de esta formulación para el control del dolor puede incluir dolor relacionado con el cáncer, así como dolor no relacionado con el cáncer, tal como dolor agudo por lesión, accidente, cirugía, inflamación o por afecciones que dañan los tejidos, como artritis y dolor en las articulaciones, dolor por infección, dolor gastrointestinal, diabetes, neuropatía diabética, neuralgia postculebrilla, dolor neuropático, neuropatía periférica, esclerosis múltiple o por otras fuentes de dolor. La presente formulación puede abordar el dolor inflamatorio, el dolor neuropático o el dolor en el que la inflamación es una causa subyacente contribuyente, que puede atribuirse a una mayor excitabilidad de las fibras sensoriales nociceptivas periféricas. Se puede reducir la actividad alterada de los canales iónicos en las neuronas sensoriales, que causan dolor. Esto puede abordar una serie de afecciones asociadas con la inflamación crónica.

Sujetos y Poblaciones. La formulación puede ser utilizada por humanos o por mascotas (animales de compañía como perros o gatos), así como para animales de trabajo como caballos.

Los sujetos que necesiten un efecto terapéutico para el manejo del dolor en las indicaciones previstas pueden usar la formulación antes, durante o después de que surja el evento o la necesidad médica. El dolor del cáncer puede ser debilitante por varias razones y los tratamientos contra el cáncer también pueden provocar episodios dolorosos. El manejo con la formulación aquí descrita puede evitar problemas inherentes al uso de opiáceos, como el estreñimiento y la adicción. La adicción puede provocar un uso excesivo y, en última instancia, el abastecimiento ilegal de formulaciones de composición impredecible, lo que puede provocar una sobredosis.

Con respecto al dolor no relacionado con el cáncer, por ejemplo, antes de someterse a una cirugía donde generalmente se puede anticipar el dolor, la formulación se puede usar de manera profiláctica para disminuir el dolor que se anticipa. Para el dolor de una lesión o daño inesperado causado por un accidente, la formulación

se puede usar de forma aguda o continua en el lugar o con medicamentos analgésicos más fuertes o dañinos, como opioides o analgésicos AINE.

Modo y Formas de Entrega. La formulación es susceptible de administración oral, tal como en forma de píldora, tableta, cápsulas de gel, jarabe, aerosol a base de aceite o aceite líquido. La forma oral puede proporcionarse en un alimento o como un complemento alimenticio, que puede añadirse a un alimento para que sea más apetecible o sea más fácil de consumir por un sujeto. Es posible la absorción tópica o nasal. Se puede utilizar un vehículo soluble en grasa, o nanopartículas o micropartículas o emulsiones para que los cannabinoides altamente solubles en grasa puedan absorberse más fácilmente. La formulación se puede preparar como inyectable, para administración intravenosa, intramuscular o intraocular. La formulación se puede administrar en forma de vapor, tal como mediante vapeo, en un vaporizador o inhalador, o se puede calentar para provocar volatilización e inhalación, lo que podría considerarse como "fumar".

Dosis. La formulación se puede administrar en cantidades relativas de aproximadamente 5:5:5 (es decir, 1:1:1) en función del peso de THC, CBC y CBD. Otros cannabinoides pueden estar presentes en estas formulaciones. Por dosis, la cantidad total de cannabinoides primarios puede oscilar entre 0.1 mg y 50 mg, por ejemplo, entre 1 mg y 25 mg, o entre 5 mg y 20 mg por dosis. Si se administra en un líquido tal como un aceite, las cantidades se pueden expresar en mg/ml, tal como de 0.1 mg/ml a 50 mg/ml por dosis, por ejemplo, de 1 mg/ml a 25 mg/ml, o 5 mg/ml - 20 mg/ml por dosis. Las dosis se pueden usar según sea necesario dependiendo de la gravedad del dolor experimentado, pero es posible que una persona desee usar la formulación según sea necesario, desde una vez al día (o menos, si no es necesario) hasta más frecuentemente, tal como tomar 6 dosis al día, con una frecuencia de cada 4 horas.

Una formulación ejemplar puede ser una forma de dosificación sólida tal como una píldora, tableta o cápsula que contiene gránulos. Alternativamente, la formulación puede ser de base líquida y puede contener cannabinoides primarios aislados o sintéticos, o puede ser un extracto de cannabis a base de aceite con aproximadamente 5 mg/ml de  $\Delta^9$ -THC, aproximadamente 5 mg/ml de CBC y aproximadamente 5 mg/ml de CBD en formas líquidas como aceite y aerosol a base de aceite, o una cápsula de gel que contiene líquido (cápsula de gel blando). Si se utilizan cápsulas que contienen líquido o gel, estas pueden tener un volumen limitado, por ejemplo un volumen aproximado de 200  $\mu$ l. La cantidad de miligramos indicada anteriormente como rango de dosificación puede incluirse en cada una de dichas cápsulas, o las cápsulas pueden formularse para que estén menos concentradas en unidades de mg/ml. Cuando se utilizan cápsulas menos concentradas, la dosis adecuada se administra aumentando la cantidad de cápsulas consumidas por dosis.

Excipientes e Ingredientes de Formulación. La formulación puede incorporar cualquier excipiente aceptable conocido en la formulación de fármacos o cannabinoides. Dichos ingredientes pueden incluir almidón, celulosa, alginatos, silicio coloidal, lubricantes tales como estearatos, sales, ingredientes acuosos y no acuosos (solubles en grasa). Se tendrían en cuenta las consideraciones de formulación habituales, como entendería un experto en la técnica.

### Ejemplo 1

Formulación para uso en el tratamiento del dolor por cáncer

El dolor que acompaña al cáncer es muy variable de acuerdo con el tipo de cáncer, el tratamiento involucrado y si los tumores en sí mismos causan malestar al sujeto.

Una persona que experimente el dolor de un carcinoma en etapa 4 puede usar la formulación para controlar este dolor. Luego, el individuo puede consumir por vía oral, de forma regular, por ejemplo cada 6 horas, una dosis de la siguiente formulación de cannabinoides a base de aceite.

La formulación comprende 5 mg/ml de THC, 1 mg/ml de CBC y 5 mg/ml de CBD, en un líquido a base de aceite. En el intervalo apropiado, el individuo puede tomar 1 ml por vía oral.

Inicialmente, el individuo puede comenzar consumiendo 1 ml de la formulación con una frecuencia de dos veces al día. La dosis se puede ajustar a una cantidad mayor con el tiempo a medida que el individuo se acostumbra a la formulación, hasta alcanzar una dosis de 1 a 2 ml, tomada de 4 a 6 veces por día.

### Ejemplo 2

Manejo del dolor como resultado de la cirugía

A veces, el dolor de la recuperación de la cirugía se puede anticipar antes del procedimiento quirúrgico.

Antes de una cirugía, es posible que el individuo desee mitigar el estrés o la preocupación sabiendo que existe un alivio eficaz del dolor. Después de una cirugía, o cuando una cirugía no requiere anestesia general o ayuno extenso, tal como una cirugía oral (empastes o procedimientos de conducto radicular), el individuo puede

consumir por vía oral, antes si es posible, o después de la cirugía, una dosis de la siguiente formulación de cannabinoides a base de pastillas.

La formulación comprende 5 mg de THC, 3 mg de CBC y 5 mg de CBD, en forma de pastilla, tableta o cápsula de gel blando. El individuo puede tomar 1 o 2 pastillas, tabletas o cápsulas de este tipo por vía oral. Opcionalmente, se puede consumir simultáneamente un alimento rico en grasas para ayudar a la eficiencia de la absorción intestinal, pero sólo en un momento en el que el consumo de alimentos esté permitido de acuerdo con el régimen quirúrgico.

### Ejemplo 3

Formulación para uso en el tratamiento del dolor después de una lesión.

El dolor que acompaña a un accidente o lesión agudo e inesperado puede ser debilitante para el individuo a medida que avanza su recuperación y curación.

Una persona que experimente el dolor agudo provocado por un evento tan inesperado puede usar la formulación para controlar este dolor. Luego, el individuo puede consumir por vía oral, de forma regular o según sea necesario, una dosis de la siguiente formulación de cannabinoides encapsulados a base de aceite hasta que el dolor disminuya a un nivel tolerable.

La formulación está presente en cápsulas de gel blando que tienen un volumen aproximado de 200 µl por cápsula. Cada cápsula contiene 5 mg de THC, 2 mg de CBC y 5 mg de CBD, en un líquido a base de aceite. La cápsula de gel blando encapsula el líquido a base de aceite con una cubierta a base de gelatina que puede incorporar otros ingredientes de la cápsula de gel comúnmente conocidos, tales como glicerina o sorbitol, para permitir una fácil deglución. En el intervalo apropiado, el individuo puede tomar 1 cápsula por vía oral.

Inicialmente, el individuo puede comenzar consumiendo 1 cápsula con una frecuencia de dos veces al día. La dosis puede aumentarse a una cantidad mayor si la dosis inicial es bien tolerada y a medida que el individuo se acostumbra a la formulación. Cuando el dolor es más agudo, se puede utilizar una dosis de 1 a 2 cápsulas, tomadas de 4 a 6 veces al día. Con el tiempo, a medida que el individuo se recupera y sana, la frecuencia de uso se puede ajustar hasta una dosis de 1 cápsula dos veces al día, o incluso con menos frecuencia según sea necesario.

### Ejemplo 4

Formulación para el manejo del dolor

Introducción. A nivel mundial, hasta el 10 % de la población se ve afectada por dolor neuropático (Bouhassira D, 2008; Colloca L, 2017) como una comorbilidad con quimioterapia, diabetes, trastornos inflamatorios e infecciosos (Colloca L, 2017). Sin embargo, aún no se ha encontrado un tratamiento eficaz y seguro. Se ha demostrado que varios cannabinoides poseen eficacia como antinociceptivos. En este ejemplo, se describe una formulación única para el tratamiento del dolor crónico. El dolor neuropático se caracteriza por sensaciones de ardor y de vida eléctrica, dolor causado por estimulantes no dolorosos y, al persistir los síntomas, conduce a alteraciones del sueño, ansiedad y depresión y deterioro de la calidad de vida (Colloca L, 2017). El estudio fue diseñado para centrarse en el perfil fenotípico del dolor neuropático y abordar los desafíos para la traducción clínica.

Este estudio proporciona una evaluación fenotípica conductual integral del impacto de los tratamientos con cannabinoides en el dolor neuropático crónico. Utilizando dos medidas diferentes de pruebas de umbral mecánico, la prueba electrónica de von Frey y el ensayo cinemático mediante análisis de la marcha, se observó una reducción significativa de la hiperalgesia mecánica y la alodinia ipsilateral al nervio ligado tras el tratamiento con cannabidiol (CBD), delta 9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), Cannabicromeno (CBC) en proporción 1:1:1. CBD:THC:CBC en una proporción de 5:5:5 mg/kg o 10:10:10 mg/kg mostró una fuerte reducción de la hipersensibilidad mecánica y una fuerte reversión de la alodinia táctil y mejoró efectivamente el rendimiento cinemático del dolor neuropático inducido por SNL. Sorprendentemente, a esta formulación se le atribuyó un efecto analgésico superior en comparación con la pregabalina, un análogo del GABA (ácido gamma aminobutírico) que se encuentra entre las opciones de tratamiento de primera línea para el dolor neuropático. Este efecto analgésico parece estar mediado en gran medida por el cannabicromeno presente en la formulación.

Estos resultados ilustran que la formulación actual (CBD:THC:CBC en una proporción de 1:1:1) reduce potentemente el dolor neuropático y ofrece un nuevo reemplazo para los opioides como analgésico. Además, la adición de cannabicromeno mitiga fuertemente el efecto analgésico del CBD y el  $\Delta^9$ -THC. Este hallazgo muestra que agregar CBC permite la posibilidad de una reducción significativa en la dosis diaria y la ingesta total de CBD y  $\Delta^9$ -THC en pacientes con dolor crónico. Es importante destacar que CBD:THC:CBC en una proporción de 1:1:1 ofrece una nueva solución cuando la calidad de vida de los pacientes se ve afectada debido



al mal resultado de los opioides, el riesgo de dependencia de opioides, el aumento de la ingesta de medicamentos y varias visitas a los proveedores de atención médica.

Propósito del estudio. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de distintas dosis de 3 cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL y el rendimiento cinemático alterado como modelo validado de dolor neuropático crónico. Los cannabinoides estudiados son el cannabidiol (CBD), el cannabícromeno (CBC) y el delta 9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC). La cirugía de ligadura del nervio espinal causa denervación parcial dentro del nervio periférico (ciático), provocando así hipersensibilidad táctil (alodinia) dentro del área de inervación del nervio ciático. El modelo de rata SNL se describió originalmente en 1992 (Kim SH, 1992). Los cannabinoides poseen varias funciones de acuerdo con sus reacciones con el sistema endocannabinoide. Ellos se encuentran entre los candidatos más prometedores para estudiar diferentes tipos de dolor.

El estudio en la vida se llevó a cabo mediante las siguientes etapas:

N = 7-10 ratas por grupo

Día 7 (O Día -1 desde la cirugía):

- evaluación de la alodinia táctil de línea base (sensibilidad mecánica de las ratas sin tratamiento) mediante la prueba electrónica de von Frey (evF);

- registro de la cinemática motora fina de línea base

D0: SNL-cirugía;

D0-D6: Período de cuidados postoperatorios

D7: - evF para definir la alodinia de línea base de lesión y obtener los resultados de las pruebas previas a la dosificación;

- ensayo cinemático para definir los déficits motores de línea base de la lesión y obtener los resultados de las pruebas previas a la dosificación

D8: - administración de CBD, CBC y THC en D8

- evF a las 2 h, 4 h y 8 h después de la dosificación

- ensayo cinemático a las 5 h y 9 h postdosificación (PD)

D9: - evF a las 24 h PD

- ensayo cinemático después de la prueba evF.

- eutanasia de 9 ratas/grupo.

Materiales y métodos

Animales

Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con lo especificado en la licencia autorizada por la Junta Nacional de Experimentación con Animales de Finlandia y de acuerdo con las pautas de los Institutos Nacionales de Salud (Bethesda, MD, EE. UU.) para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

En total, se compraron 180 ratas macho Sprague-Dawley de Charles River Alemania y se sometieron a los procedimientos del estudio. El peso corporal de las ratas fue de 200 a 300 g el día de la cirugía SNL. Antes de la cirugía SNL, en las manipulaciones y pruebas de línea base, el número de animales era aproximadamente entre un 5 % y un 10 % mayor, con el fin de anticipar las situaciones raras pero posibles que requieren reemplazos de animales (por ejemplo, animales innatamente hipersensibles). Los animales se alojaron a una temperatura estándar ( $22 \pm 1$  °C) y en un ambiente con luz controlada (luces encendidas de 7 am a 8 pm) con acceso ad libitum a comida y agua.

Todos los animales fueron operados mediante ligadura del nervio espinal; todos los grupos comprendieron n = 15. Los grupos de tratamiento recibieron las siguientes administraciones de artículos de prueba:

Grupo 1: tratado en D8 con vehículo (solución salina al 0.9 %)

Grupo 2: tratado en D8 y en D9 con Pregabalina (50 mg/kg)

Grupo 3: tratado en D8 con CBD (5 mg/kg) y THC (5 mg/kg)

Grupo 4: tratado en D8 con CBD (5 mg/kg) y CBC (1 mg/kg) y THC (5 mg/kg)

Grupo 5: tratado en D8 con CBD (5 mg/kg) y CDC (5 mg/kg) y THC (5 mg/kg)

Grupo 6: tratado en D8 con CBD (10 mg/kg) y CBC (10 mg/kg)

Grupo 7 tratado en D8 con CBC (10 mg/kg) y THC (10 mg/kg)

5 Grupo 8 tratado en D8 con CBD (10 mg/kg) y THC (10 mg/kg)

Grupo 9 tratado en D8 con CBD (10 mg/kg) y CBC (10 mg/kg) y THC (10 mg/kg)

Grupo 10 tratado en D8 con CBD (10 mg/kg) y CBC (2 mg/kg) y THC (10 mg/kg)

Todas las ratas siguieron el mismo diseño de estudio hasta completar las pruebas de comportamiento D9.

Tabla 1 muestra los detalles del tratamiento.

10 Estos resultados se presentan para un subconjunto de tratamiento de 5 mg/kg. Los resultados del subconjunto de tratamiento de 10 mg/kg se presentan a continuación.

Tabla 1										
Información del grupo de dosis y tratamiento del compuesto para la fase de estudio conductual (D0-D9)										
Grupo	n	Pregab. (mg/kg)	CBD (mg/kg)	CBC (mg/kg)	THC (mg/kg)	Vol. De dosificación (mL/kg)	Vehiculo	Dosis/ rata	Prueba evF	Prueba MR
1	15	0	0	0	0			1	BL, D7, D8 (3 puntos de tiempo), D9	BL, D7, D8 (2 puntos de tiempo), D9
2		50	0	0	0		Solución líquida	2		
3		0	5	0	5		Aceite de maíz; 10% EtOH; 5% Kolliphor	1		
4		0	5	1	5					
5		0	5	5	5					
6		0	10	10	0					
7		0	0	10	10					
8		0	10	0	10					
9		0	10	10	10					
10		0	10	2	10					

15 La Figura 1 Proporciona un diagrama esquemático del paradigma de estudio. El diagrama tiene la forma de un esquema que presenta la fase de comportamiento del estudio, realizada en todos los animales del estudio hasta las pruebas D9. Los puntos de tiempo de las pruebas de Motorater en D8 no se muestran, ya que las dos rondas de prueba se llevaron a cabo primero después de terminar el evF de 4 h y la segunda después de terminar el evF de 8 h.

20 Artículos de prueba y formulación. Los artículos de prueba se manipularon y almacenaron de acuerdo con procedimientos operativos estándar. Las formulaciones de dosis se prepararon de acuerdo con las instrucciones detalladas proporcionadas por el proveedor.

25 Administración de Drogas. Se administraron artículos de prueba, su vehículo o Pregabalina (fármaco de control positivo) de acuerdo con la tabla 1 en el día 8 del estudio a todos los animales del estudio. La ruta de administración de los Cannabinoides o vehículo fue intragástrica (p.o.), mientras que la Pregabalina se administró por vía intraperitoneal (i.p.). Además del D8, se administró Pregabalina en D9, 2 h antes de la prueba evF.

30 Cirugía de ligadura del nervio espinal (SNL). Los animales se enrolaron en cirugía SNL en cohortes diarias de n=6. Las ratas recibieron primero una dosis intraperitoneal de 0.03 mg/kg de buprenorfina (Temgesic), un mínimo de 30 minutos antes de la cirugía, para aliviar el dolor operatorio y postoperatorio no relacionado con la neuropatía. Antes del procedimiento de ligadura del nervio espinal (SNL), las ratas fueron anestesiadas con isoflurano en 70 % N<sub>2</sub>O y 30 % O<sub>2</sub>; con un caudal de 300 ml/min. La anestesia se indujo en una cámara con isoflurano al 5 % durante 2-3 minutos y luego se mantuvo a través de una máscara de hocico con isoflurano al

1-2 %. Se utilizó un sistema de manta homeotérmica para controlar y mantener la temperatura rectal a  $37.0^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$  durante la operación.

Se realizó una incisión dorsal que se extendía desde L3 a S2 en el área dorsal medial de la rata utilizando una técnica aséptica. Se expuso el proceso interarticular posterior L6/S1 utilizando una combinación de disección roma y afilada. El proceso transversal L6 en la columna vertebral se visualizó y se eliminó parcialmente sin manipular los nervios, seguido de la exposición de los nervios espinales L4 y L5 distales a su salida de los agujeros intervertebrales.

El nervio L5 se ligó firmemente con sutura de seda 6-0. Luego se ubicó el nervio L6 caudal y medial a la unión sacroilíaca y se ligó firmemente con sutura de seda 6-0, de manera similar a L5. Ambas ligaduras se realizaron con nudos dobles.

Después de realizar las ligaduras, se cerraron las capas musculares, el tejido conectivo y la piel y se permitió a los animales recuperarse de la anestesia en una jaula homeotérmica. Las ratas fueron monitorizadas hasta que estuvieron completamente despiertas y moviéndose en la jaula.

El período de cuidados postoperatorios se realizó dos veces al día durante 7 días después de la cirugía e incluyó los siguientes procedimientos. Observación cuidadosa del estado general y el bienestar junto con el seguimiento de la pata operada y el modo de andar del animal. La herida quirúrgica y las suturas se revisaron (y se desinfectaron adecuadamente cuando fue necesario) dos veces al día, hasta que la herida se cerró correctamente.  $0.03\text{ mg/kg}$  de buprenorfina s.c. se administró los dos primeros días postoperatorios, aproximadamente cada 12 horas. Rehidratación con 4 ml de solución salina estéril i.p. directamente después de la cirugía, continuando dos veces al día durante 7 días, o hasta que no se produjera más pérdida de peso. Se registró cualquier signo claro de dolor, déficit motor o problemas de salud más allá del modelo y la cirugía y los animales con parálisis u otro déficit motor no relacionado con el modelo se excluyeron de pruebas adicionales.

Prueba de alodinia táctil (evF) y evF previa a la manipulación y de línea base.

En este estudio, la sensibilidad mecánica a los estímulos táctiles se definió en cuatro puntos de tiempo mediante el uso de un dispositivo electrónico von Frey (evF) junto con el software de análisis adjunto (Somedic®, Suecia).

Antes de someter a las ratas a la evF de línea base, fueron manipuladas previamente durante 2-3 minutos en dos días consecutivos, con el fin de disminuir la hipersensibilidad en la prueba. La manipulación previa se realizó como máximo 3 días antes de las pruebas de línea base. La EVF de línea base se realizó un mínimo de 5 días después de su llegada a las instalaciones para animales de CR y un máximo de 5 días antes del día de la cirugía (d0).

Las ratas que mostraban una hipersensibilidad innata fueron descalificadas del estudio. La hipersensibilidad se definió como un umbral de retirada de la pata (PWT) de línea base de  $<20\text{ g}$  con una sonda de 1 mm. Después de la prueba evF de línea base, las ratas se pesaron, numeraron y distribuyeron en grupos de tratamiento de manera uniforme con respecto al PWT de línea base y el peso corporal.

Antes de cualquier procedimiento (manipulación o prueba), a los animales se les permitió una habituación de 60 minutos en la sala donde se realizaron los procedimientos.

Para realizar la prueba evF, las ratas se colocaron en cámaras de prueba individuales de von Frey colocadas sobre una malla de acero elevada. Posteriormente, se permitió que las ratas se adaptaran en las cámaras, y la prueba se comenzó una vez que se hubieran asentado, seguido de la exploración de la cámara y el acicalamiento (aproximadamente 15 minutos). La prueba se realizó mientras los animales se acicalaban, orinaban, defecaban o dormían. A continuación se proporciona una descripción adicional del procedimiento de prueba.

Realización de la prueba evF. La alodinia mecánica se evaluó mediante la prueba evF antes de la cirugía SNL (línea de base), para definir los niveles de sensibilidad individuales de los animales del estudio. A continuación, se realizó la evF en D7 después de la SNL, para evaluar la hipersensibilidad provocada por la cirugía de SNL y para proporcionar valores de sensibilidad previos a la dosificación para comparación. En D8, los animales se sometieron a la prueba a las 2 h después de la dosificación (PD), a las 4 h PD y a las 8 h PD. Posteriormente, la prueba se realizó a las 24 h PD, es decir, en D9. En D9, el grupo 2 recibió Pregabalina (i.p) 2 h antes de la prueba.

En cualquier día de prueba, se permitió que las ratas se adaptaran en la sala de pruebas durante aproximadamente 1 hora antes de la prueba. Parte de este tiempo se utilizó para probar la adaptación de la cámara, con el fin de reducir el estrés y facilitar las pruebas. La prueba puede comenzar cuando los animales hayan explorado los alrededores, se hayan acicalado y se hayan calmado. A una rata no se le hacen pruebas en caso de que esté orinando, defecando o durmiendo.

El aparato evF se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, en cada medición, la fuerza se aplica a la superficie plantar media de la pata trasera a un ritmo linealmente creciente.

El diámetro de la sonda evF utilizada fue de 1 mm y la velocidad de ascenso elegida de la fuerza 10 g/s. La linealidad de la aplicación de fuerza se controló en tiempo real. El aparato registró la fuerza aplicada (en gramos) que provocó la retirada de la pata como resultado para el ensayo.

Durante la prueba se tomaron notas para poder distinguir los posibles efectos sedantes de los artículos de prueba de los efectos sensoriales.

En total, se aplicaron 5 mediciones repetidas a cada pata trasera en cada punto de tiempo, dejando un intervalo mínimo de 3 minutos entre las repeticiones. Se determinaron las medianas de las 5 repeticiones de medición de cada pata en cualquier momento dado. También se probaron ambas patas ipsi y contralateral cada día de prueba.

La Figura 2 Muestra el sitio de prueba de von Frey en la pata plantar.

Análisis cinemático de la marcha de motricidad fina. Las ratas fueron sometidas a un análisis de la marcha en la línea base y en los días 8, 9, 11, 14 y 17 del estudio, a un mínimo de 30 minutos después de la prueba evF. El ensayo fue llevado a cabo por MotoRater (TSE Systems, Homburg, Alemania), con el modo de caminar. Antes de comenzar la prueba, se marcaron los puntos esenciales del cuerpo (por ejemplo, articulaciones, extremidades, nariz, cola) para su seguimiento. La información del rendimiento de la marcha se capturó utilizando una cámara de alta velocidad (300 fotogramas/segundo) desde abajo y en ambos lados. A continuación, los videos capturados fueron convertidos al software SimiMotion™. Los datos brutos se obtuvieron siguiendo los puntos marcados del cuerpo en los videos grabados en las 3 dimensiones. Los datos brutos, por lo tanto, comprendían la correlación de los movimientos de diferentes puntos del cuerpo en coordenadas relacionadas con el suelo y cada tres dimensiones.

Se analizaron diferentes patrones de marcha y movimientos utilizando un sistema de análisis automatizado hecho a medida. En total se obtuvo información sobre más de cien parámetros cinemáticos. Estos comprendían, por ejemplo:

- Parámetros generales del patrón de marcha, tales como: tiempo y velocidad de zancada, ancho de zancada, tiempo de postura y balanceo durante una zancada y coordinación entre extremidades.

- Parámetros de postura y equilibrio corporal, tales como: espacio libre de los dedos de las patas, altura de la cresta ilíaca y de la cadera, protracción y retracción de las extremidades posteriores, posición y movimiento de la cola.

- Habilidades de motricidad fina, incluidas, por ejemplo, la velocidad de balanceo durante una zancada, la métrica de tirón durante la fase de balanceo, los rangos de ángulo y las desviaciones de diferentes articulaciones, y los movimientos de la cabeza verticales y horizontales.

Todos los datos de Motorater se analizaron para los distintos parámetros, así como para todos los parámetros combinados, mediante análisis de componentes principales (PCA). Los resultados obtenidos produjeron el fenotipo modelo en el análisis de la marcha, es decir, la diferencia entre los animales tratados con vehículo y cannabinoides con respecto a los parámetros individuales y la PCA.

Además de la prueba inicial, las pruebas motoras se realizaron en total cuatro veces durante el transcurso de la fase de estudio del comportamiento:

- en D7, para evaluar los defectos motores específicos del modelo antes de la dosificación
- en D8, después de finalizar el evF de 4 h
- en D8, después de finalizar el evF de 8 h.
- en D9, después de finalizar el evF de 24 h

El ensayo cinemático no se realizó a los animales antes de un mínimo de 30 minutos después de la prueba evF.

La Figura 3A y la Figura 3B muestran el fenotipo motor inducido por SNL, basado en las diferencias de PCA de BL y D7 en todos los grupos de estudio.

La Figura 3A ilustra el seguimiento de movimiento y el modelo cinemático. El seguimiento de movimiento implica el uso de MotoRater para observar al animal desde 3 lados simultáneamente (ventral, izquierdo, derecho) y proporciona lecturas detalladas de TODAS las partes del cuerpo relevantes para el movimiento, es decir, patas,

tobillos, articulaciones, cola, cabeza, cadera, cresta ilíaca, etc., lo que permite detección fiable de desviaciones sutiles, aparición temprana de síntomas y efectos del tratamiento.

La Figura 3B ilustra la dirección discriminante para la "Distancia desde la línea de base". Los gráficos de barras ilustran qué parámetros cambiaron después de SNL (cero = BL o línea de base). La longitud y la dirección de la barra indican el peso que cada parámetro aporta al puntaje general.

El fenotipo motor del modelo SNL se puede caracterizar e interpretar como la siguiente combinación de cambios en las características de la marcha:

- la velocidad general aumenta, lo que se debe principalmente a una mayor distancia de zancada (mayor longitud de paso).

- la coordinación entre las extremidades no cambia drásticamente, excepto que aumenta la asimetría en el ritmo de alternancia izquierda-derecha de las extremidades posteriores (acoplamiento L/R H).

- la altura general de la cadera y el rango vertical de movimiento de la cadera aumentan (media/máximo/rango de la base de la cola, altura de la cadera, rango de altura de la cadera, altura de la cresta ilíaca)

- la posición de la punta de la cola es más baja (punta de la cola mínima/media/máxima)

- el rango del ángulo de la cadera aumenta

- el espacio libre para los dedos de las extremidades posteriores aumenta.

Las puntuaciones generales de la marcha presentadas en las siguientes tres diapositivas reflejan todos estos cambios juntos (usando el vector de dirección discriminante como un "criterio") y se presentan de manera que la puntuación promedio en la línea base sea igual a cero. La puntuación media de todos los grupos de estudio en D7 es igual a 3.107 (puntuación z). La disminución de la puntuación general significa que el rendimiento de la marcha ha cambiado hacia el estado anterior a SNL (BL).

La Figura 4 ilustra la puntuación general de la marcha (distancia desde la línea de base), que proporciona ejemplos de parámetros de la marcha individuales que se enfatizan en el vector discriminante exhibido para el simulacro (barras más claras en el lado izquierdo de los emparejamientos) versus el modelo de rata SNL (barras más oscuras en el lado derecho de los emparejamientos). La puntuación de la marcha general depende de todos los parámetros de la marcha juntos que están vinculados al modelo SNL.

Monitorización del peso corporal. El peso corporal de los animales se registró en la prueba evF de línea base, el día de la cirugía (D0) y diariamente a partir de entonces.

Criterio de valoración, muestras de sangre y procesamiento de tejidos. En D9, después de la última prueba motorater, se completó la fase de estudio conductual eligiendo 6 ratas por grupo para continuar en la fase PK. El resto de los animales fueron sacrificados por sobredosis de CO<sub>2</sub> y decapitación.

El día del criterio de valoración de la fase PK, en D11, las ratas fueron anestesiadas terminalmente con pentobarbital (60 mg/kg de Mebunat). Se recogieron muestras de sangre mediante punciones cardíacas y se aisló el plasma mediante centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos. Las muestras de plasma separadas se transfirieron a tubos limpios y se almacenaron a -80 °C hasta su envío.

A continuación, los animales fueron perfundidos transcárdialmente primero con PBS. Los cerebros se separaron del cráneo y se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido. A partir de entonces, las muestras de cerebro se almacenaron a -80 °C hasta su envío.

Los DRG lumbares se prepararon para observar y se recolectaron desde ambos lados. Los GRD lumbares L4-L6 de cada lado se agruparon en un tubo de 2 ml preetiquetado (GRD ipsilaterales en un tubo; GRD contralaterales en otro) y se realizó la fijación posterior en formalina comercial al 10 % durante 24 h (+ 4 °C). Finalmente, las muestras de DRG se lavaron brevemente con PBS 0.1 M y se almacenaron en el tampón a + 4 °C hasta y durante el envío.

Estado de salud general y criterios de valoración humanos. Los animales fueron monitorizados diariamente por personal de laboratorio. En el caso de que el estado de salud general de un animal haya empeorado significativamente, se le sacrificará mediante una sobredosis de CO<sub>2</sub>, y decapitará. Las definiciones de criterios de valoración aceptables incluyen: ausencia de movimientos espontáneos e incapacidad para beber o comer en un período de observación de 24 h, sangrado masivo, inflamación espontánea, pérdida de anatomía, hinchazón o tumores de más de 20 mm e incapacidad para enderezarse durante un periodo de 30 s.

Además, se aplican criterios de valoración específicos del modelo:

- la sutura de la herida se abre tres veces (la primera vez se hicieron nuevos puntos; la segunda vez se puede utilizar además pegamento tisular).

- inflamación de la herida que empeora a pesar de 48h de tratamiento.

- parálisis de cualquier extensión de cualquiera de las patas traseras.

5 - automutilación que en ocasiones se asocia con modelos de dolor neuropático.

Equipos y reactivos. En el estudio se utilizaron los siguientes materiales y sustancias:

- plano de prueba de malla de acero: Ugo Basile, Alemania

- cámaras de prueba de plexiglás: Ugo Basile, Alemania

- prueba electrónica de hardware y software de von Frey: Somedic, Suecia.

10 - MotoRater: TSE Systems, Homburg, Alemania

- equipo de anestesia gaseosa: Aparato de Harvard

- líquido de isoflurano: Attane Vet

- microscopio de luz: Microscopio estereoscópico Zeiss, Stemi DV4

- termostato y sonda para manta quirúrgica homeotérmica: Aparato de Harvard

15 - sutura de Seda para las ligaduras: 6-0 Ethicon

- sutura de poliamida (5-0): Ethicon

- buprenorfina Temgesic®: Oriola Finlandia

- 0.9 % NaCl (solución salina): Braun

20 Análisis estadístico. Todos los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media. Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , utilizando GraphPad Prism (Versión 8, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Dependiendo de las características de los datos, las pruebas estadísticas se seleccionaron entre los siguientes parámetros.

25 Se realizaron comparaciones simples entre dos grupos mediante la prueba t de Student no apareada o, cuando el supuesto de normalidad fue rechazado por la prueba de D'Agostino-Pearson o Shapiro-Wilk, mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se utilizó la prueba t de Welch para comparaciones por pares si se suponía que los datos estaban distribuidos normalmente, en caso contrario con varianzas desiguales. Para las comparaciones entre dos mediciones realizadas en el mismo conjunto de sujetos, se utilizó la prueba t de Student pareada o la prueba de rangos con signos de Wilcoxon, según correspondiera.

30 Las comparaciones que involucraron a más de tres grupos independientes se llevaron a cabo mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) o, si los datos no se distribuyen normalmente, mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Si el factor grupo/tratamiento fue significativo, se realizaron comparaciones múltiples post hoc. Para comparar todas las medias con todas las demás medias, se utilizó la prueba de Tukey o la de Holm-Šidák. Las comparaciones con la media del grupo de control se realizaron mediante la prueba de Dunnett. En el caso de la prueba de Kruskal-Wallis, se realizaron múltiples comparaciones post hoc utilizando la prueba de Dunn.

35 Para observaciones repetidas en el mismo grupo, los valores coincidentes se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas (para datos distribuidos normalmente) o la prueba de Friedman (para grupos donde se rechazó el supuesto de normalidad). Las comparaciones entre dos o más grupos realizadas en diferentes puntos fueron analizadas mediante ANOVA de medidas repetidas de dos vías con grupo/tratamiento como factor "entre" y tiempo como factor "dentro". Inicialmente se determinaron los efectos principales del grupo y el tiempo y, en caso de su interacción significativa, se realizaron comparaciones múltiples relevantes post hoc.

## Resultados

No hubo diferencias significativas en el peso corporal de varios grupos de ratas SNL a lo largo del estudio. No se observó significancia estadística al comparar diferentes grupos de tratamiento con animales tratados con vehículo.

45 La Figura 5 muestra los efectos de distintas dosis de 1 a 3 cannabinoides sobre el peso corporal de ratas SD operadas con SNL. Los datos se presentan como media + SEM. Tamaños de grupo: Vehículo, n = 12; Pregabalina, n = 12; CBD+CBC 10 mg/kg, n = 9; CBC+THC 10 mg/kg, n = 9; CBD+THC 10 mg/kg, n = 9;

CBD+THC 5 mg/kg, n = 7; CBD+CBC+THC 5 mg/kg, n = 9; CBD+THC 5 mg/kg +CBC 1 mg/kg, n = 9. ANOVA de dos vías, post hoc de Tukey.

Se descubrió que CBD:THC:CBC en una proporción de 5:5:5 mg/kg reduce la hipersensibilidad mecánica debida al dolor crónico. Este fue un hallazgo importante.

5 Para evaluar la hipersensibilidad mecánica, este estudio empleó von Frey electrónico (evF) 8 días después de la cirugía, así como el umbral de retirada de la pata determinado dentro de las 24 horas posteriores a la dosificación en cada grupo de tratamiento. Los resultados se graficaron y se compararon con la línea base (tiempo 0).

10 La Figura 6 muestra el efecto de los cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL en ratas. El porcentaje desde PWT de línea base se evaluó después de una variedad de puntos de tiempo para diferentes tratamientos. El efecto de los cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL se midió el día 7 y luego 2, 4, 8 y 24 horas después del tratamiento. Los datos se presentan como media + SEM para los valores de porcentaje de la línea base en los puntos de tiempo posteriores a SNL. Las curvas del gráfico se utilizaron para analizar las AUC. Las siguientes abreviaturas se definen como D7: Día 7; D8: Día 8; D9: Día 9. CBD: cannabidiol; CBC: cannabícromeno; THC:  $\Delta$ -9 Tetrahidrocannabinol. AUC: Área bajo la curva. CBD+THC+CBC 5 mg/kg: Tratamiento con CBD 5 mg/kg y THC 5 mg/kg y CBC 5 mg/kg.

20 La Figura 7 ilustra el área bajo la curva (AUC) que representa la significancia estadística de los grupos de tratamiento vs. la medida del vehículo mediante la prueba electrónica de von Frey. El efecto de los cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL se midió a las 2, 4, 8 y 24 horas y las curvas se utilizaron para medir el área bajo la curva; Los datos se presentan como media + SEM analizada con la prueba t de Welch no apareada; \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001\*\*\*\*, p < 0.0001.

25 El tratamiento de ratas con CBD+THC+CBC a 5:5:5 mg/kg redujo significativamente la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL en comparación con el grupo de vehículos en la prueba evF (p < 0.01). Curiosamente, el tratamiento con CBD+THC+CBC a 5:5:5 mg/kg causó una reducción significativamente mayor de la hipersensibilidad mecánica en comparación con el control positivo de Pregabalina (p = 0.0186), como se evidencia en la Figura 6 y la Figura 7, así como en los datos presentados a continuación Tabla 2).

Tabla 2 - Comparación múltiple/de pares de los grupos de tratamiento en el área de von Frey electrónica

Prueba de comparaciones múltiples	Dif. Media	95% CI	¿Significancia? (Tukey)	Resumen (Tukey)	Valor P Tukey	¿Significancia? (LSD de Fisher)	Resumen (LSD de Fisher)	Valor P (LSD de Fisher)	Media 1	Media 2	Dif. Media	SE Dif.	n1	n2
Pregabalina vs. CBD+THC 5 mg/kg	-6.2	-43.77 a 31.37	No	ns	0.9898	No	ns	0.6414	271	277	-6	13.22	12	8
Pregabalina vs. CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg	-31.2	-67.50 a 5.100	No	ns	0.1228	Si	*	0.0186	271	302	-31	12.78	12	9
Pregabalina vs. CBD+THC+CBC 5:5:1 mg/kg	13.8	-22.50 a 50.10	No	ns	0.8157	No	ns	0.2858	271	257	14	12.78	12	9
Pregabalina vs. Vehículo	29.8	-3.808 a 63.41	No	ns	0.1042	Si	*	0.0154	271	241	30	11.83	12	12
CBD+THC 5:5 mg/kg vs. CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg	-25	-65.00 a 15.00	No	ns	0.3999	No	ns	0.0825	277	302	-25	14.08	8	9
CBD+THC 5 mg/kg vs. CBD+THC+CBC 5:5:1 mg/kg	20	-20.00 a 60.00	No	ns	0.6179	No	ns	0.1623	277	257	20	14.08	8	9
CBD+THC 5 mg/kg vs. Vehículo	36	-1.575 a 73.57	No	ns	0.0662	Si	**	0.0092	277	241	36	13.22	8	12
CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg vs. CBD+THC+CBC 5:5:1 mg/kg	45	6.193 a 83.81	Si	*	0.0457	Si	**	0.0019	302	257	45	13.66	9	9
CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg vs. Vehículo	61	24.70 a 97.30	Si	***	0.0002	Si	***	<0.0001	302	241	61	12.78	9	12
CBD+THC 5 mg/kg + CBC 1 mg/kg vs. Vehículo	16	-20.30 a 52.30	No	ns	0.721	No	ns	0.2169	257	241	16	12.78	9	12

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Dif. Media	95% CI	Significancia (Tukey)	Resumen (Tukey)	Valor P Tukey	¿Significancia? (LSD de Fisher)	Resumen (LSD de Fisher)	Valor P (LSD de Fisher)	Media 1	Media 2	Dif. Media	SE Dif.	n1	n2
Pregabalina vs. Vehículo	29.8	-2.223 a 61.82	No	ns	0.0721	Si	*	0.0029	271	241	30	12.99	12	12



El análisis del área bajo la curva (AUC) ilustró un marcado aumento del AUC en ratas tratadas con CBD+THC+CBC a 5:5:5 mg/kg en comparación con las ratas tratadas con CBD:THC:CBC a 5:5:1 mg/kg (Figura 6 y Figura 7) ( $p = 0.0019$ ). Por lo tanto, aumentar el cannabicromeno de 1 a 5 mg/kg cambió notablemente los umbrales de abstinencia mecánica durante un período de 24 horas.

La Tabla 2 muestra una comparación múltiple/por pares de grupos de tratamiento en el área electrónica bajo la curva (AUC) de von Frey. Fondo gris claro:  $p < 0.05$  de acuerdo con las comparaciones múltiples de Tukey; Fondo gris oscuro:  $p < 0.05$  de acuerdo con el LSD de Fisher para comparaciones por pares. Dif. Diferencia. CL: Intervalo de confianza. SE: Error estándar.

Aunque se indicó que el tratamiento de ratas con CBD:THC en una proporción de 5:5 mg/kg era eficaz para reducir la intensidad de la hipersensibilidad mecánica en la prueba evF en comparación con el vehículo ( $p < 0.05$ ), la adición de 5 mg/kg de cannabicromeno al compuesto, pareció potenciar el efecto del CBD y el THC ( $p < 0.01$ ). Para respaldar esta idea, el CBD+THC+CBC a 5:5:5 mg/kg también mostró una eficacia notablemente mayor que la Pregabalina ( $p = 0.0186$ ), mientras que el CBD+THC a 5:5 mg/kg (sin CBC) fue comparable a la Pregabalina en la reducción de la hipersensibilidad mecánica ( $p = 0.6414$ ) (Tabla 2). Comparaciones de grupos adicionales en cada punto de la prueba conductual arrojarían luz sobre el impacto de agregar cannabicromeno.

La Figura 8 muestra los efectos de múltiples dosis distintas de cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL medida por el evF. Los datos se presentan como porcentaje desde la línea de base + SEM para cada grupo. (Tamaños de grupo: Vehículo,  $n = 12$ ; Pregabalina,  $n = 12$ ; CBD+THC 5 mg/kg,  $n = 8$ ; [CBD+CBC+THC 5 mg/kg],  $n = 9$ ; [CBD+THC 5 mg/kg CBC 1 mg/kg],  $n = 9$ ). Panel A) •  $p < 0.1$ ; \*  $p < 0.05$ , vs. vehículo (comparaciones post hoc por pares simplemente entre [CBD+CBC+THC 5 mg/kg] y [CBD+THC 5 mg/kg + CBC 1 mg/kg] vs vehículo); Panel B) •  $p < 0.1$ ; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , vs. D7 (ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett).

Se probaron las diferencias entre grupos para reducir la comparación post hoc por pares. Para evaluar el efecto del CBD+THC+ CBC a 5:5:5 mg/kg, se realizaron comparaciones entre grupos (Figura 8, Panel A) y se realizaron comparaciones dentro de los grupos (Figura 8, Panel B).

Las comparaciones entre grupos revelaron una diferencia significativa cuando el tratamiento con CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg se comparó con el vehículo 2 horas después de la dosificación ( $p = 0.0494$ , ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 8, Panel A). Estos datos muestran que un efecto provocado por CBD+THC+ CBC 5:5:5 mg/kg indica una reducción de la hipersensibilidad mecánica en ratas.

Además, las ratas SNL tratadas con CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg mostraron un aumento del 33 % en el umbral de retirada de la pata (% PWT) desde la línea base a 2 horas después de la realización ( $p < 0.05$ ). 4 horas después de la dosificación, el nivel de significancia no se alcanzó del todo ( $p = 0.086$ ; ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 8, Panel A). Esta observación podría deberse al bajo número de ratas ( $n = 9$ ).

Las comparaciones dentro del grupo realizadas mediante ANOVA de dos vías mostraron un efecto temporal altamente significativo presente, caracterizado por una respuesta dinámica a la administración, que alcanza su punto máximo 2 horas después de la dosificación y regresa gradualmente al nivel previo a la dosificación.

Se encontró un cambio significativo desde la predosis hasta 2 horas después de la dosificación en todos los grupos de cannabinoides en este subconjunto, así como en el grupo de Pregabalina ( $p < 0.05$ , ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 8, Panel B). Evidentemente, CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg mostró una diferencia altamente significativa en comparación con el nivel previo a la dosificación ( $p < 0.0001$ ) (Figura 8, Panel B). As 4 horas después de la administración, CBD+THC 5:5 mg/kg y CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg todavía estaban en niveles significativamente más altos que en la dosis previa ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente, ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett)(Figura 8, Panel B). También se observó una ligera tendencia creciente, aunque no significativa, en el grupo de vehículos, ya que la prueba produce ocasionalmente cambios no significativos pero visibles, principalmente debido a la sensibilidad de la prueba combinada con las variaciones en el entorno de los animales.

De acuerdo con los resultados del ensayo evF, aumentar el CBC de 1 mg/kg a 5 mg/kg parece prolongar el efecto del CBD+THC. Es de destacar que 24 horas después de la dosificación, el valor del resultado del grupo con la concentración más alta de CBC todavía estaba por encima del nivel previo a la dosificación. Sin embargo, la diferencia con el nivel previo a la dosificación en este punto de tiempo sigue sin ser significativa. Además, lo que vale la pena señalar aquí es la forma de la respuesta dinámica a la administración que alcanza su punto máximo 2 horas después de la dosificación y se revierte gradualmente, cerca del nivel de lesión de SNL. El cambio de intensidad de la respuesta con el tiempo es claramente diferente en el grupo de dosis alta de CBC, en comparación con los grupos de dosis baja de CBC.

El efecto de agregar cannabicromeno al CBD y al THC también se evaluó en ratas SNL tratadas con el subconjunto CBD:THC 10:10 mg/kg y los resultados se reportan a continuación.

En general, los resultados de la prueba electrónica de von Frey confirman la eficacia de CBD:THC:CBC en una proporción de 5:5:5 mg/kg para reducir la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL e indican la eficacia de esta formulación para el tratamiento del dolor crónico. Una evaluación adicional del dolor crónico y el control motor mediante el análisis cinemático de la marcha a continuación explica la eficacia mejorada del CBD+THC cuando se combina con CBC.

El cannabicromeno prolonga el efecto del CBD y  $\Delta^9$ -THC y mejora notablemente la actividad locomotora general en modelos animales de dolor neuropático.

Se realizó un análisis cinemático completo mediante MotoRater de alta sensibilidad que permite la detección de cualquier cambio de marcha sutil a severo en el modelo SNL. Se realizaron observaciones y análisis tridimensionales desde ventral, lateral izquierdo y derecho para evaluar los movimientos en función de trayectorias de posiciones de unión y ángulos con propiedades respectivas, tales como velocidad y aceleración. Se reportó una puntuación general basada en la distancia desde la línea base para cada grupo de tratamiento en comparación con el vehículo o dentro de cada grupo de tratamiento. Las capacidades motoras finas y la marcha de los animales se evaluaron en la línea base y cuatro veces después de la cirugía SNL, 2h, 5h, 9 h y 24 horas posdosificación mediante el análisis del movimiento cinemático de en total 97 parámetros separados que fueron grabados.

La Figura 9 muestra la puntuación general de la marcha entre el día 7 y el día 9 después del tratamiento en ratas SNL. ANOVA mixto de dos vías: Efectos fijos (tipo III): Tiempo  $p < 0.0001$ , Grupo  $p = 0.0003$ ; Tiempo x Grupo  $p = 0.0064$ ; Panel A. Diferencia estadísticamente significativa vs. Vehículo; Prueba de Dunnett (5 familias, 4 comparaciones por familia). Panel B. Comparaciones dentro del grupo con D7; Prueba de Dunnett (5 familias, 4 comparaciones por familia).

La Figura 10A muestra un gráfico de barras vectoriales discriminantes que presenta el fenotipo motor inducido por SNL, basado en las diferencias de PCA de BL y D7 en todos los grupos de estudio. El gráfico vectorial original enfatiza con flechas y barras sombreadas de manera diferente aquellos rasgos característicos de la marcha que representan más el fenotipo motor SNL, como se resalta con las flechas.

Significancias estadísticas de los valores p ajustados: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para los datos de los parámetros para reducir el número de variables y revelar correlaciones entre parámetros separados. PCA combina todos los datos de los parámetros, revela correlaciones entre ellos y proporciona una visión general de las características motoras finas y de la marcha de las ratas operadas con SNL. Las diferencias de línea base en BL y D7 en todos los grupos de estudio se presentaron en el gráfico de barras (Figura 10A) para ilustrar qué parámetros cambiaron después de SNL (cero = BL). La longitud y la dirección de la barra indican el peso que aporta cada parámetro en la puntuación general. El fenotipo motor del modelo SNL se puede caracterizar e interpretar como la siguiente combinación de cambios en las características de la marcha (Figura 10A):

- la velocidad general aumenta, lo que se debe principalmente a una mayor distancia de zancada (mayor longitud de paso).

- la coordinación entre las extremidades no cambia drásticamente, excepto que aumenta la asimetría en el ritmo de alternancia izquierda-derecha de las extremidades posteriores (acoplamiento L/R H).

- la altura general de la cadera y el rango vertical de movimiento de la cadera aumentan (media/máximo/rango de la base de la cola, altura de la cadera, rango de altura de la cadera, altura de la cresta ilíaca)

- la posición de la punta de la cola es más baja (punta de la cola mínima/media/máxima)

- el rango del ángulo de la cadera aumenta

- el espacio libre para los dedos de las extremidades posteriores aumenta.

Este estudio reporta el fenotipo motor inducido por SNL basado en PCA y presenta la puntuación general de la marcha basada en comparaciones entre grupos y dentro de los grupos para ratas tratadas con CBD:THC 5:5 mg/kg con 0-5 mg de cannabicromeno. Los grupos se compararon con vehículo (control negativo) y Pregabalina (control positivo). A continuación se reportan más evaluaciones del fenotipo motor de ratas SNL tratadas con CBD:THC 10:10 mg/kg.

Una diferencia sorprendente entre el tratamiento con CBD:THC:CBC en una proporción de 5:5:5 mg/kg y otros grupos de tratamiento con cannabinoides o Pregabalina fue una puntuación general de la marcha muy mejorada a las 5 y 9 horas después de la dosis ( $p < 0.05$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente, ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 9, Panel A). Este hallazgo proporciona evidencias sólidas de dos contribuciones funcionales del cannabicromeno.

Como se muestra en la Figura 9, Panel A, CBD:THC 5:5 mg/kg no mejoró la puntuación general de la marcha en ratas en comparación con el vehículo. Mientras tanto, agregar cannabicromeno al CBD y  $\Delta^9$ -THC en una proporción de 1:1:1 aumentó notablemente el efecto del CBD y el THC y revirtió potentemente el tacto hasta 9 horas después del tratamiento. En particular, estos hallazgos indican que la alodinia táctil todavía existía en todos los demás grupos tratados con cannabinoides. Por lo tanto, la movilidad mejorada y la alodinia táctil revertida en ratas SNL tratadas con CBD:THC:CBC 5:5:5 mg/kg se debe a la adición de CBC y no al efecto psicoactivo enmascarante del  $\Delta^9$ -THC. La adición de cannabicromeno al CBD y THC mejoró efectivamente la movilidad general de las ratas SNL, lo que demuestra la eficacia de CBD:THC:CBC en una proporción de 5:5:5 mg/kg en el tratamiento del dolor neuropático.

Otro hallazgo importante del análisis cinemático de motricidad fina fue un efecto de duración determinada notablemente significativo mostrado en la puntuación general de la marcha de ratas tratadas con CBD:THC:CBC a 5:5:5 mg/kg. Estos datos mostraron una respuesta a la administración en todos los grupos de cannabinoides; la puntuación disminuyó cerca de la línea base o mostró un aumento detenido, en contraste con los grupos de vehículo y Pregabalina, que continuaron mostrando un puntaje general creciente, refiriéndose aquí a alejarse del puntaje inicial (Figura 9, Panel B). Evidentemente, a las 2 y 4 horas después de la dosificación, los animales tratados con CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg mostraron un mejor rendimiento de la marcha y una reversión táctil en comparación con la prueba previa a la dosificación. (Figura 9, Panel B). Aumentar el número de ratas puede mejorar el análisis estadístico y los resultados de las pruebas.

Por lo tanto, en el presente documento se proporciona evidencia de que el tratamiento con CBD:THC:CBC 5:5:5 mg/kg probó ser el compuesto más potente para revertir el tacto durante el período de 24 h posterior a la dosificación. Esta formulación redujo eficazmente el deterioro de la movilidad en ratas hasta 9 horas después de la administración ( $p < 0.0001$ ). Este efecto a largo plazo no se observó en ratas SNL tratadas con Pregabalina u otros grupos de cannabinoides.

En conjunto, este estudio proporciona una evaluación fenotípica conductual integral del impacto de los tratamientos con cannabinoides en el dolor neuropático crónico. CBD:THC:CBC en una proporción de 5:5:5 mg/kg o 1:1:1 mostró una fuerte reducción de la hipersensibilidad mecánica, así como una fuerte reversión de la alodinia y un rendimiento cinemático altamente mejorado del modelo de dolor neuropático inducido por SNL durante 9 horas después de un único tratamiento.

Este hallazgo indica que agregar una dosis adecuada de cannabicromeno al cannabidiol y  $\Delta^9$ -THC puede reducir notablemente la dosis diaria en pacientes con dolor y también disminuir la ingesta total de CBD y  $\Delta^9$ -THC como analgésicos por parte de los pacientes.

La Figura 10B muestra una ilustración anatómica del sitio de ligadura del nervio espinal.

La Figura 10C muestra una representación esquemática del análisis cinemático de la marcha con motor fino. El modelo cinemático y de seguimiento de movimiento se evalúa en cuanto a parámetros cinemáticos para determinar parámetros espaciotemporales generales (velocidad, distancia, tiempo); Coordinación entre extremidades; fase de balanceo y trayectorias de las extremidades; Postura corporal y ángulos de las articulaciones, y más de 100 parámetros en total.

Se determina una puntuación general de la marcha, que combina parámetros cinemáticos en una única puntuación. La puntuación se basa en aquellos parámetros cinemáticos que mejor caracterizan el modelo de enfermedad frente al control sano. Este enfoque es muy sensible para determinar los efectos del tratamiento específico del modelo de enfermedad.

Resultados de CBD:THC a 10:10 mg/kg. CBD:THC 10:10 mg/kg - Comparaciones de subconjuntos. En este subconjunto, el compuesto más potente para revertir el tacto durante el período de 24 h después de la dosis fue [CBD+THC 10:10 mg/kg]. Sin embargo, tanto [CBD+THC+CBC 10:10:10 mg/kg] como [CBD+THC 10 mg/kg CBC 2 mg/kg o 10:2:10 mg/kg] también mostraron un aumento altamente significativo del AUC, en comparación con el vehículo. Puntos de curva: Predosificación 2h, 4h, 8h y 24h postdosificación (Figura 11).

La Figura 11 muestra el AUC para el subconjunto del grupo con 10 mg/kg de THC. Los datos se presentan como porcentaje desde el PWT + SEM de línea base para cada grupo (panel superior) y como AUC para las curvas correspondientes. (Tamaños de grupo [CBD+THC 10 mg/kg],  $n = 9$ ; [CBD+CBC+THC 10 mg/kg],  $n = 9$ ; [CBD+THC 10 mg/kg + CBC 2 mg/kg],  $n = 7$ ). Las significancias estadísticas son: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , vs. vehículo (prueba t no apareada de Welch).

La Figura 12 muestra los efectos de múltiples dosis distintas de cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL medida por el evF. Los datos se presentan como porcentaje desde la línea base + SEM para cada grupo. (Tamaños de grupo: Vehículo,  $n = 12$ ; Pregabalina,  $n = 12$ ; [CBD+CBC 10 mg/kg],  $n = 9$ ; [CBC+THC 10 mg/kg],  $n = 9$ ; [CBD+THC 10 mg/kg],  $n = 9$ ; [CBD+CBC+THC 10 mg/kg],  $n = 9$ ; [CBD+THC 10 mg/kg + CBC 2 mg/kg],  $n = 7$ ). Significancias estadísticas: A) \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , vs. Vehículo; B) \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , vs. D7 (ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett).

Para comparar diferentes combinaciones de cannabinoides que comparten la dosis de 10 mg/kg de THC, se formó un subconjunto de grupos y se realizaron y presentaron comparaciones en consecuencia (Figura 12).

En este subconjunto, se observó un efecto similar al del subconjunto de THC de 5 mg/kg presentado anteriormente. Sin embargo, con estas mezclas de dosis, el ANOVA de dos vías realizado produjo un efecto de interacción tiempo-tratamiento altamente significativo, de acuerdo con los grupos preseleccionados. Para examinar más a fondo estas diferencias, se realizaron comparaciones post hoc por pares entre el vehículo y tanto [CBD+THC 10:10 mg/kg] como [CBD+THC 10:10 mg/kg + CBC 2 mg/kg]. Ambos grupos mostraron una diferencia significativa con respecto al grupo de vehículo a 2 h después de la dosificación. Si bien el resultado de [CBD+THC 10:10 mg/kg + CBC 2 mg/kg] a las 4 h después de la dosificación seguía siendo significativamente mayor que el resultado del vehículo, el [CBD+THC 10:10 mg/kg] en este punto de tiempo permaneció más bajo mostrando una ligera tendencia ( $p < 0.1$ ) hacia una hipersensibilidad significativamente revertida en comparación con el ANOVA de dos vías del vehículo, post hoc de Dunnett (Figura 12).

Dentro de la comparación de grupos, mostró un efecto temporal altamente significativo del nivel de sensibilidad con el subconjunto de 10 mg/kg de THC, mostrando una respuesta dinámica similar a la administración, observada anteriormente en el subconjunto de 5 mg/kg de THC, alcanzando un máximo a las 2 horas después de la dosificación, volviendo gradualmente al nivel previo a la dosificación a partir de entonces. Se encontró una significancia estadística perceptible desde la predosificación hasta 2 h después de la dosificación en todos los grupos de cannabinoides en este subconjunto, así como en el grupo de Pregabalina ( $p < 0.05$ , ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 12). También se encontraron diferencias significativas o casi significativas con el nivel previo a la dosificación 4 h después de la dosificación para [CBC+THC 10:10 mg/kg], [CBD+THC 10:10 mg/kg], [CBD+THC+CBC 10:10:10 mg/kg] y [CBD+THC 10 mg/kg + CBC 2 mg/kg o 10:10:2 mg/kg]. Incluso 8 horas después de la dosificación, la hipersensibilidad revertida seguía siendo significativa con [CBD+THC 10:10 mg/kg y [CBD+THC+CBC 10:10:10 mg/kg] ( $p < 0.05$ , ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 12).

La ligera tendencia ascendente, que se encontró casi significativa en las comparaciones del subconjunto de THC de 5 mg/kg, no fue significativa con el subconjunto de THC de 10 mg/kg ( $p = 0.1588$ , ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 12).

Cabe señalar que la diferencia entre estos análisis simplemente presenta la naturaleza del modelado estadístico, donde los intervalos de confianza y los valores p correspondientes se basan en la varianza general encontrada en todos los grupos incluidos en el análisis, lo que resulta en ligeros cambios en los valores p finales, dependiendo de la combinación de grupos incluidos en el análisis.

El efecto del aumento de la dosis de CBC. Para examinar el efecto del aumento de la dosis de CBC, se formó el siguiente subconjunto de grupos. CBD+THC 5 mg/kg, CBD+THC 5:5 mg/kg + CBC 1 mg/kg y CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg (Figura 13). CBD+THC:10 mg/kg, CBD+THC+CBC 10:10:2 mg/kg y CBD+THC+CBC 10:10:10 mg/kg (Figura 14).

La Figura 13 ilustra los efectos de múltiples dosis distintas de cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL medida por el evF. Los datos se presentan como porcentaje de la línea base + SEM para cada grupo. (Tamaños de grupo: [CBD+THC 5 mg/kg],  $n = 8$ ; [CBD+THC 5 mg/kg + CBC 1 mg/kg],  $n = 9$ ; [CBD+THC+CBC 5 mg/kg],  $n = 9$ ). Significancias estadísticas: Panel A) \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , vs. Vehículo; Panel B) \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , vs. D7 (ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett).

En el primer subgrupo (grupos de 5 mg/kg de THC), el aumento de la dosis de CBC parece mostrar una reversión de la hipersensibilidad marginalmente mejorada, en comparación con los grupos con 0 o 1 mg/kg de CBC. Aun así, no hubo ningún efecto significativo del tratamiento o efecto de interacción entre el tiempo y el tratamiento en este subconjunto de grupos ( $p > 0.05$ , ANOVA de dos vías) (Figura 13). Sin embargo, con comparaciones post hoc por pares con el grupo sin CBC, es decir, [CBD+THC 5:5 mg/kg], a las 24 h PD hay una "tendencia establecida hacia una diferencia significativa" ( $p < 0.1$ ) entre [CBD+CBC 5 mg/kg] y [CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg] ( $p = 0.0904$ , ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 13).

Además, en este subconjunto también se encontró un efecto temporal altamente significativo. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el valor previo a la dosificación y el valor 2 h después de la dosificación en todos los grupos de este subconjunto ( $p < 0.05$ , ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 13). También se encontraron diferencias significativas con respecto al nivel previo a la dosificación a las 4 h PD para los grupos [CBD+THC 5:5 mg/kg] y [CBD+THC+CBC 5:5:5 mg/kg] ( $p < 0.05$ , ANOVA de dos vías, Post hoc de Dunnett) (Figura 13).

Vale la pena señalar que a las 24 h PD, el valor del resultado del grupo con la concentración de CBC más alta todavía está por encima del nivel previo a la dosificación. Sin embargo, la diferencia con el nivel previo a la dosificación en este punto de tiempo sigue sin ser significativa.

La Figura 14 muestra los efectos de múltiples dosis distintas de cannabinoides sobre la intensidad de la hipersensibilidad mecánica inducida por SNL medida por el evF. Los datos se presentan como porcentaje desde la línea base + SEM para cada grupo. (Tamaños de grupo [CBD+THC 10 mg/kg], n = 9; [CBD+THC+CBC 10 mg/kg], n = 9; [CBD+THC 10 mg/kg + CBC 2 mg/kg], n = 7). Significancias estadísticas: Panel A) \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001, vs. Vehículo. Panel B) \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001, vs. D7 (ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett).

Las comparaciones entre el segundo subconjunto de grupos: [CBD+THC 10:10 mg/kg], [CBD+THC+CBC 10:10:2 mg/kg], [CBD+THC+CBC 10:10:10 mg/kg] muestran diferencias en la Figura 14.

Con 10 mg/kg de THC, el aumento de la dosis de CBC pareció causar una reducción marginal de la eficacia reversa del THC+CBC. Sin embargo, no se mostró ningún efecto significativo del tratamiento o interacción entre el tiempo y el tratamiento entre este subconjunto de grupos (p > 0.05, ANOVA de dos vías) (Figura 14). Sin embargo, mediante comparaciones post hoc por pares con [CBD+THC 10:10 mg/kg], a las 2 h PD, se reveló un resultado significativamente menor (= mayor hipersensibilidad/alodinia) en [CBD+THC+CBC 10:10:10 mg/kg] (p < 0.0264, ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 14).

Una vez más, se demostró un efecto temporal altamente significativo dentro de este subconjunto de grupos. Se encontró significancia estadística en todos los grupos. En este subconjunto se mostró una reversión de alodinia significativa o casi estadísticamente significativa (valor más alto) a las 2 h después de la dosificación (p < 0.05, ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 14). Se encontraron diferencias significativas con respecto al valor previo a la dosificación en todos los grupos a las 4 h después de la dosificación, y en [CBD+THC+CBC 10:10:10 mg/kg] a las 8 h después de la dosificación (p < 0.05, ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 14).

Al igual que con los subconjuntos anteriores, con este subconjunto, vale la pena señalar que 24 horas después de la dosificación, el valor del resultado del grupo con la concentración CBC más alta todavía está por encima del nivel previo a la dosificación. Sin embargo, la diferencia con el nivel previo a la dosificación en este punto de tiempo sigue sin ser significativa.

Lo que vale la pena notar aquí es la forma de esa respuesta dinámica a la administración que alcanza su punto máximo 2 horas después de la dosificación y se revierte gradualmente, cerca del nivel de lesión de SNL. El cambio de intensidad de la respuesta con el tiempo es claramente diferente en el grupo de dosis alta de CBC, en comparación con los grupos de dosis baja de CBC. Aunque falta un máximo similar a las 2 horas después de la dosificación como se observa con los otros grupos en [CBD+THC+CBC 10:10:10 mg/kg], se muestra un aumento gradual (menos hipersensibilidad) a lo largo de los puntos de tiempo de 4 h y 8 h. 24 horas después de la dosificación, el nivel aún permanece por encima del valor previo a la dosificación (diferencia no significativa).

Las puntuaciones generales de la marcha reflejan todos esos cambios, que se encontraron en el análisis PCA, en conjunto (usando el vector de dirección discriminante como "criterio"), y se presentan de manera que la puntuación promedio en la línea base es igual a cero. La puntuación media de todos los grupos de estudio en D7 es igual a 3.107 (puntuaciones z. La disminución de la puntuación general significa que el rendimiento de la marcha ha cambiado hacia el estado anterior a SNL (BL).

A continuación, las puntuaciones generales de la marcha se presentan en subconjuntos como se describió anteriormente.

CBC prolonga fuertemente el efecto del CBD y THC y mejora notablemente el deterioro de la movilidad inducido por SNL: THC 10 mg/kg - Comparaciones de subconjuntos. Para comparar diferentes combinaciones de cannabinoides que comparten la dosis de THC de 10 mg/kg, se formó el siguiente subconjunto de grupos y se realizaron y presentaron comparaciones de acuerdo con la Figura 15. Vehículo, CBD + THC 10:10 mg/kg, CBD+THC+CBC 10:10:10 mg/kg y CBD+THC+CBC 10:10:2 mg/kg.

La Figura 15 muestra el rendimiento general de la marcha (puntuación general de la marcha) dentro de los grupos de subconjunto de 10 mg/kg de THC. Los datos se presentan como puntuación media + SEM para cada grupo. Significancias estadísticas: Panel A) \* p < 0.05, vs. Vehículo; Panel B) \* p < 0.1; \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001, frente a D7 (ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett).

Se produjeron efectos de tratamiento significativos y altamente significativos (hacia la línea base) dentro de los grupos de este subconjunto, en comparación con el grupo Vehículo. Otras comparaciones post hoc por pares revelaron que en los puntos de tiempo de PD de 5 h y 9 h, tanto [CBD+THC 10:10 mg/kg] como [CBD+THC+CBC 10:10:10 mg/kg] fueron competentes para producir una diferencia significativa en el grupo de vehículo (p < 0.05, ANOVA de dos vías, post hoc de Dunnett) (Figura 15, Panel A).

Además, se presentó un efecto temporal altamente significativo al comparar las puntuaciones generales de la marcha entre los puntos de tiempo, dentro de cada grupo. De manera similar al subconjunto de 5 mg/kg de THC, en todos los grupos de cannabinoides, la puntuación disminuyó cerca de la línea base o mostró un

aumento detenido. Los grupos de vehículo y Pregabalina mostraron un patrón de puntuación profundamente diferente, con una puntuación creciente hasta el punto de tiempo de PD de 9 h, seguido de una ligera disminución hasta el punto de tiempo de PD de 24 h. Figura 15, Panel B).

- 5 Tabla 3 proporciona comparación múltiple/por pares de grupos de tratamiento en el área bajo la curva (AUC) electrónica de von Frey. Fondo sombreado más claro:  $p < 0.05$  de acuerdo con las comparaciones múltiples de Tukey; Fondo sombreado más oscuro:  $p < 0.05$  de acuerdo con el LSD de Fisher para comparaciones por pares. Dif: Diferencia. CI: Intervalo de confianza. SE: Error estándar.

Tabla 3

Comparación múltiple/por pares de grupos de tratamiento en el AUC electrónica de von Frey.											
Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (comparaciones múltiples)						LSD de Fisher sin corregir (comparaciones por pares)					
Tratamientos comparados	¿Significativo?	Resumen	Valor P	¿Significativo?	Resumen	Valor P	Media 1	Media 2	Dif. media	n1	n2
Pregabalina vs. CBD+THC 10 mg/kg	Sí	**	0.0032	Sí	***	0.0002	270.8	334	-63.2	12	9
Pregabalina vs. CBD+THC 10 mg/kg + CBC 2 mg/kg	No	ns	0.0754	Sí	**	0.0054	270.8	320	-49.2	12	7
Pregabalina vs. vehículo	No	ns	0.4037	Sí	*	0.0462	270.8	241	29.8	12	12
CBD+CBC 10 mg/kg vs. CBD+THC 10 mg/kg	No	ns	>0.9999	No	ns	0.953	260	261	-1	9	9
CBD+CBC 10 mg/kg vs. CBD+THC 10 mg/kg	Sí	***	0.0009	Sí	****	<0.0001	260	334	-74	9	9
CBD+CBC 10 mg/kg vs. CBD+CBC+THC 10 mg/kg	No	ns	0.2863	Sí	*	0.0282	260	298	-38	9	9
CBD+CBC 10 mg/kg vs. CBD+THC 10 mg/kg + CBC 2 mg/kg	Sí	*	0.0243	Sí	**	0.0015	260	320	-60	9	7
CBD+CBC 10 mg/kg vs. Vehículo	No	ns	0.8908	No	ns	0.2342	260	241	19	9	12
CBC+THC 10 mg/kg vs. CBD+THC 10 mg/kg	Sí	**	0.0011	Sí	****	<0.0001	261	334	-73	9	9
CBC+THC 10 mg/kg vs. CBD+CBC+THC 10 mg/kg	No	ns	0.3168	Sí	*	0.0325	261	298	-37	9	9
CBC+THC 10 mg/kg vs. CBD+THC 10 mg/kg + CBC 2 mg/kg	Sí	*	0.0283	Sí	**	0.0018	261	320	-59	9	7
CBC+THC 10 mg/kg vs. Vehículo	No	ns	0.8649	No	ns	0.2108	261	241	20	9	12
CBD+THC 10 mg/kg vs. CBD+CBC+THC 10 mg/kg	No	ns	0.3491	Sí	*	0.0373	334	298	36	9	9
CBD+THC 10 mg/kg vs. CBD+THC 10 mg/kg + CBC 2 mg/kg	No	ns	0.9865	No	ns	0.4415	334	320	14	9	7
CBD+THC 10 mg/kg vs. Vehículo	Sí	****	<0.0001	Sí	****	<0.0001	334	241	93	9	12
CBD+CBC+THC 10 mg/kg vs. CBD+THC 10 mg/kg + CBC 2 mg/kg	No	ns	0.8846	No	ns	0.2282	298	320	-22	9	7

Comparación múltiple/por pares de grupos de tratamiento en el AUC electrónica de von Frey.											
Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (comparaciones múltiples)						LSD de Fisher sin corregir (comparaciones por pares)					
Tratamientos comparados	¿Significativo?	Resumen	Valor P	¿Significativo?	Resumen	Valor P	Media <sub>1</sub>	Media <sub>2</sub>	Dif. media	n1	n2
CBD+CBC+THC 10 mg/kg vs. Vehículo	Sí	*	0.0108	Sí	***	0.0006	298	241	57	9	12
CBD+THC 10 mg/kg + CBC 2 mg/kg vs. Vehículo	Sí	***	0.0004	Sí	****	<0.0001	320	241	79	7	12



Estos datos muestran una mejora en los parámetros de manejo/alivio del dolor para formulaciones en las que CBD, CBC y THC están presentes en comparación con formulaciones sin CBC.

- 5 Las formulaciones que contenían CBD, CBC y THC en cantidades iguales se probaron frente a formulaciones que solo contenían CBD y THC, o frente a un vehículo para evaluar los parámetros cinemáticos. Estos datos subrayan el beneficio de tener el CBC como el tercer cannabinoide principal en la formulación.

- 10 La Figura 16 muestra representantes de los parámetros cinemáticos de la marcha, que ilustran el impacto beneficioso de agregar CBC al CBD+THC en la formulación. Los datos se muestran en la línea base, D7, D8-5h, D8-9h y D9 después de la dosificación. Significancias estadísticas:  $p \leq 0.01$  se consideró significativo de acuerdo con los valores de p ajustados.

- 15 Panel A - Rango de movimiento del tobillo (ROM) - D9 PD: CBD+THC+CBC (5:5:5 mg/kg) vs. CBD+THC (5:5 mg/kg):  $^{**}p = 0.009$ . Panel B - Porcentaje de forma de trayectoria de la pata (extremidad anterior) - D9: CBD+THC+CBC (5:5:5 mg/kg) vs. CBD+THC (5:5 mg/kg):  $^{**}p = 0.003$ . Panel C - % de ciclo de trabajo general: D8-5h Y D8-9h: CBD+THC+CBC (5:5:5 mg/kg) vs. Vehículo:  $^{**}p = 0.003$  y  $^{**}p = 0.004$ . Panel D - % del ciclo de trabajo de las extremidades traseras - D8-5h Y D8-9h: CBD+THC+CBC (5:5:5 mg/kg) vs. Vehículo:  $^{**}p = 0.005$  y  $^{**}p = 0.003$ , respectivamente. Panel E - Ángulo de despegue del dedo del pie de la extremidad trasera [grados] - D9 PD: CBD+THC+CBC (5:5:5 mg/kg) vs. Vehículo:  $^{**}p = 0.000598$ . Panel F - Soporte Sencillo: D8-5h Y D8-9h: CBD+THC+CBC (5:5:5 mg/kg) vs. Vehículo:  $^{**}p = 0.003$  y  $^{*}p = 0.014$ , respectivamente. N1/N2: Tamaños de grupo.

- 20 La Tabla 4 muestra comparaciones múltiples/por pares de parámetros cinemáticos particulares de la marcha en comparación antes y después de la dosificación. Sólo efectos significativos ( $p \leq 0.01$ ) y Adj. sig (Significancia ajustada) =  $^{*}p < 0.05$ ;  $^{**}p < 0.01$ ;  $^{***}p < 0.001$ .

Tabla 4 Comparación múltiple/por pares de parámetros cinemáticos particulares de la marcha comparados antes y después de la dosificación											
Línea de tiempo	Variable	Grupo1	Grupo2	Grupo de dosis2	n1	n2	Estadística	df	Valor p	Valor p Ajust.	Sig. Ajust.
D9	Ángulo de despegue del dedo, posterior [grados]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	7	-4.21	16.9	0.000598	0.000598	***
D8 9h	Velocidad media [cm/s]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	3.75	11.4	0.003	0.003	**
D9	Forma de la trayectoria de la pata 25 % extremidad anterior [%]	CBD+THC 5 mg/kg	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	8	7	-3.73	12.6	0.003	0.003	**
D8 5h	Ciclo de trabajo [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.56	13.5	0.003	0.003	**
D8 9h	Ciclo de trabajo, posterior [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.66	13.1	0.003	0.003	**
D8 5h	Soporte sencillo [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	3.49	17.2	0.003	0.003	**
D8 5h	Retracción, posterior [m]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	3.3	18	0.004	0.004	**
D8 9h	Velocidad media de balanceo, extremidad anterior [m/s]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	3.59	11.5	0.004	0.004	**
D8 9h	Velocidad de balanceo máximo, extremidad anterior [m/s]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	3.46	13.1	0.004	0.004	**
D8 9h	Ciclo de trabajo [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.61	12.1	0.004	0.004	**
D8 5h	Ciclo de trabajo, extremidad posterior [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.41	16.1	0.004	0.004	**
D7	Protracción, extremidad posterior [m/s]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.24	18	0.005	0.005	**
BL	Métrica de la velocidad de balanceo extremidad posterior	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	9	-3.2	18.9	0.005	0.005	**
D8 9h	Soporte tres [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.7	9.26	0.005	0.005	**
D8 9h	Velocidad de balanceo máxima extremidad posterior [m/s]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	3.37	12.2	0.006	0.006	**
D8 9h	Ángulo de cadera, Min grado	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.27	13.6	0.006	0.006	**
D7	Ángulo de rodilla, Min grado	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	3.12	16.9	0.006	0.006	**
D8 9h	Ciclo de trabajo, extremidad anterior [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.27	12.3	0.007	0.007	**
D8 5h	Ciclo de trabajo, extremidad anterior [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.22	10.9	0.008	0.008	**
D8 9h	Ciclo de trabajo, extremidad anterior [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.45	8.6	0.008	0.008	**
D8 5h	Soporte doble [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	2.98	16	0.009	0.009	**
D8 9h	Velocidad media [cm/s]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	2.95	16.2	0.009	0.009	**
D8 9h	Protracción, posterior [m]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	3.05	13.5	0.009	0.009	**
D9	Desviación ROM del tobillo [grado]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	7	3.05	13.5	0.009	0.009	**
D9	Desviación ROM del tobillo [grado]	CBD+THC 5 mg/kg	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	8	7	3.12	11.3	0.009	0.009	**
D8 9h	Ángulo de despegue del dedo, posterior [grados]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3	15.7	0.009	0.009	**
D8 9h	Soporte doble, extremidad anterior [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.41	7.97	0.009	0.009	**
D8 9h	Velocidad media de balanceo, extremidad posterior [m/s]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	3.2	9.78	0.01	0.01	**
D8 5h	Soporte doble, extremidad posterior [%]	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.1	11.3	0.01	0.01	**
D8 9h	Soporte doble, HI	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	8	-3.16	9.17	0.011	0.011	*
BL	Desviación del ancho del paso	vehículo	CBD+CBC+THC	5 mg/kg	12	9	2.76	17.6	0.013	0.013	*

Los datos presentados en la Figura 16 y la Tabla 4 ilustran un efecto significativo del CBC al extender el efecto del CBD+THC cuando los tres cannabinoides principales están presentes juntos en una formulación, como lo indica un manejo del dolor más duradero en comparación con la mezcla de CBD+THC (ausente CBC). Por ejemplo, las ratas tratadas con CBD+THC+CBC (5:5:5 mg/kg) mostraron una marcada mejora en los ángulos de las articulaciones y la trayectoria de las patas hasta las 24 horas PD (Figura 16, Paneles A, B, E). Además, el tratamiento con CBD+THC+CBC (5:5:5 mg/kg) mostró una mejora significativa en la duración del contacto de la pata con la superficie (% del ciclo de trabajo) hasta 9 horas PD, mientras que el CBD+THC en ausencia de CBC no mostró el efecto prolongado en comparación con el vehículo. El tratamiento de ratas SNL con CBD+THC+CBC (5:5:5 mg/kg) mejoró sustancialmente la coordinación entre las extremidades como lo indica el % de apoyo sencillo (Figura 16, Panel F) hasta 9 horas después de la dosis en comparación con el vehículo, mientras que el CBD+THC no mejoró la coordinación entre las extremidades ni el manejo del dolor con tanta eficacia.

### Ejemplo 5

Formulación para el manejo del dolor: Efectos sobre el canal TRPA1 humano expresado en células de mamíferos

#### Resumen

Se probaron los efectos de las formulaciones para el tratamiento del dolor en el canal TRPA1 humano, expresado en células de mamíferos utilizando el ensayo ScreenPatch® (IonWorks™ Ensayo basado en Barracuda): modo agonista. Los datos presentados confirman un efecto sinérgico de los cannabinoides (CBD:THC:CBC) a nivel del canal iónico.

#### Material y métodos

Artículos de prueba. Los artículos de prueba, también mencionados en el presente documento como formulaciones de prueba, se evaluaron en un formato de concentración-respuesta de 8 puntos (4 pocillos replicados/concentración, Tabla 4). Los artículos de prueba se disolvieron e inicialmente se diluyeron en serie en dimetilsulfóxido (DMSO). La dilución final se realizó en solución extracelular. La concentración final de DMSO fue del 0.6 % (v/v).

Grupos de tratamiento de control positivo. Se prepararon soluciones madre de artículos de control positivo en lotes, repartidas en alícuotas para uso individual. Las soluciones de prueba de control positivo se prepararon frescas el día del experimento. La concentración final de DMSO fue del 0.6 % (v/v). En este estudio, se utilizó el agonista TRPA1 aceite de mostaza (MO) como agonista de control positivo. Se utilizó el antagonista de referencia, rojo rutenio (0-10  $\mu$ M), para ambos TRPA1.

Mediciones. La Figura 17 muestra un ejemplo representativo de las corrientes producidas por la aplicación de aceite de mostaza de 3000  $\mu$ M y mediciones de corrientes máximas en la amplitud de corriente máxima.

La Figura 17 muestra un rastro representativo de la corriente producida por la aplicación de 3000  $\mu$ M de aceite de mostaza a células que expresan receptores TRPA1. La línea vertical muestra el inicio de la aplicación. La flecha vertical de dos puntas muestra los puntos donde se realizaron las mediciones ( $\sim 4$ nA).

#### Canales TRPA1.

Sistema de prueba: Receptores ionotrópicos TRPA1 expresados en células CHO.

Plataforma de prueba: Ionworks barracuda™

Procedimientos electrofisiológicos. Solución intracelular (mM): CsCl 50 mM, CsF 90 mM,  $\text{mgCl}_2$  2 mM, EGTA 5 mM, HEPES 10 mM. Se ajustó a pH 7.2 con CsOH. Esta solución se preparó en lotes y se almacenó a temperatura ambiente. Como preparación para una sesión de registro, la solución intracelular se cargó en el compartimento intracelular del electrodo plano PPC.

Solución extracelular, HB-PS (composición en mM): NaCl, 137; KCl, 1.0;  $\text{mgCl}_2$ , 2;  $\text{CaCl}_2$ , 2; HEPES, 10; Glucosa, 10; El pH se ajustó a 7.4 con NaOH (refrigerado hasta su uso). Potencial de tenencia: -70 mV, potencial durante la aplicación de agonista/antagonista: -70 mV.

Procedimiento de registro. Se cargó tampón extracelular en los pocillos de la placa PPC (11  $\mu$ l por pocillo). La suspensión celular se pipeteó en los pocillos (9  $\mu$ l por pocillo) del electrodo plano PPC.

La configuración de registro de células completas se estableció mediante perforación de parche con corrientes de membrana registradas mediante amplificadores de abrazadera de parche integrados.

Se utilizó el protocolo de aplicación sencilla (escaneo).

Administración de artículos de prueba. La aplicación consistió en la adición de 20 µl de solución de artículo de prueba concentrada 2X a 10 µl/s (tiempo total de aplicación de 2 segundos).

Control positivo TRPA1 - Agonista. 0 - 3000 µM de aceite de mostaza (8 concentración dosis-respuesta, 4 réplicas, escala media logarítmica).

- 5 Control Positivo - Antagonista. Rojo rutenio 0-10 µM (8 concentraciones, 4 réplicas, escala media logarítmica).  
Artículos de control.

Agonista del receptor TRPA1:

Nombre: Isotiocianato de alilo (aceite de mostaza)

Fuente: Sigma-Aldrich

- 10 M.W. 99.15

Justificación de la selección: El isotiocianato de alilo es un agonista del receptor TRPA1.

Antagonista de los receptores TRPA1:

Nombre: Rojo Rutenio

Fuente: Sigma-Aldrich

- 15 M.W. 786.35

Justificación de la selección: El rojo rutenio es un antagonista del receptor TRPA1.

Mapa de carga de placas

Un mapa de carga de placas ejemplar como se utiliza en el estudio se ilustra en el esquema que se muestra en la Figura 18.

- 20 Control de referencia de agonistas y antagonistas: TRPA1 0-3000 µM aceite de mostaza y Rojo Rutenio 0-10 µM, respectivamente, realizados con concentraciones 1x.

Resultados

- 25 Las propiedades agonistas del cannabícromeno (CBC) y de la mezcla de cannabidiol (CBD) y Δ9-THC se examinaron utilizando un enfoque basado en electrofisiología HTS, Ion Work Barracuda (IWB). Se empleó un protocolo de aplicación sencilla.

Actividad agonista de la mezcla de CBC y CBD THC en los receptores TRPA1.

El agonista de referencia, el aceite de mostaza produjo la activación de los receptores TRPA1 con  $EC_{50}$ =479 µM. Inhibidor no selectivo, rojo rutenio, inhibe los receptores TRPA1 con  $IC_{50}$ =1.79 µM. Tanto los valores  $EC_{50}$  y  $IC_{50}$  fueron consistentes con los datos históricos.

- 30 Como se muestra en la Figura 19A y la Figura 19B, así como en la Figura 20A y la Figura 20B, el porcentaje de activación se calculó en relación con las corrientes producidas por la aplicación de aceite de mostaza 3000 µM.

- 35 La Figura 19A ilustra la representación gráfica y la información numérica de la actividad de los compuestos en los receptores TRPA1. Los gráficos representan la curva de respuesta a la concentración (CRC) de CBD THC. Panel A: aceite de mostaza CRC. Panel B: metanol CRC 0-10 % escala media logarítmica. Panel C: rojo rutenio CRC 0-10 µM, escala media logarítmica. Panel D: CBC CRC 0-300 µM. Para el Panel E (+0.1 µM CBC) y el Panel F (+0.1 µM CBC): Curvas de respuesta a la concentración de la mezcla de CBD+THC en presencia de una concentración creciente de CBC (0.1 y 0.3 µM). El eje X en E y F muestra la concentración de CBD+THC (0.1 a 300 µM de cada uno). Todos los valores se calculan en relación con la corriente producida por aceite de mostaza 3000 µM establecido como 100 % (% del control).

- 40 La Figura 19B ilustra la representación gráfica y la información numérica de la actividad de los compuestos en los receptores TRPA1. Los gráficos representan la curva de respuesta a la concentración (CRC) de CBD+THC. Paneles G al Panel L: Curvas de respuesta a la concentración de la mezcla de CBD+THC en presencia de una concentración creciente de CBC (1-300 µM). El eje X del Panel G al Panel L muestra la concentración de CBD+THC (1 a 300 µM de cada uno). Todos los valores se calculan en relación con la corriente producida por aceite de mostaza 3000 µM establecido como 100 % (% del control).

La Figura 20A muestra la representación gráfica y la información numérica de la actividad de los compuestos en los receptores TRPA1. Los gráficos representan la curva de respuesta a la concentración (CRC) de CBC. Panel A: aceite de mostaza CRC. Panel B: metanol CRC 0-10 % escala media logarítmica. Panel C: rojo rutenio CRC 0-10  $\mu\text{M}$ , escala media logarítmica. Panel D: CBC CRC 0-300  $\mu\text{M}$ . Panel E y Panel F: CBC CRC en presencia de una concentración creciente de mezcla de CBD+THC (0.1 y 0.3  $\mu\text{M}$  cada una). Todos los valores se calculan en relación con la corriente producida por aceite de mostaza 3000  $\mu\text{M}$  establecido como 100 % (% del control).

La Figura 20B muestra la representación gráfica y la información numérica de la actividad de los compuestos en los receptores TRPA1. Los gráficos representan la curva de respuesta a la concentración (CRC) de CBC. Panel G al Panel L: CBC CRC en presencia de una concentración creciente de mezcla de CBD+THC (1-300  $\mu\text{M}$  cada una). Todos los valores se calculan en relación con la corriente producida por aceite de mostaza 3000  $\mu\text{M}$  establecido como 100 % (% del control).

El CBC mostró una débil actividad agonista parcial en los receptores TRPA1 con  $\text{EC}_{50} \sim 40 \mu\text{M}$  y  $\text{E}_{\text{MÁX}} -10 \%$ . La mezcla de CBD+THC mostró una actividad agonista parcial más potente y más pronunciada con la  $\text{EC}_{50}$  oscilada entre 2.94  $\mu\text{M}$  y 5.4  $\mu\text{M}$  (a diferentes concentraciones de CBC) y  $\text{E}_{\text{MÁX}}$  igual al 50 % - 60 % en relación con la corriente máxima producida por el aceite de mostaza de 3000  $\mu\text{M}$ .

El análisis de los datos se realizó de dos maneras: Primera forma: Tabla 5 y Figuras 19A y 19B muestran las mezclas de CBD+THC CRC en presencia de una concentración creciente de CBC (0-300  $\mu\text{M}$ ). Segunda forma: Tabla 6 y Figuras 20A y 20B muestran CBC CRC en presencia de una concentración creciente de mezcla de CBD+THC (0-300  $\mu\text{M}$  cada una).

La Tabla 5 muestra información numérica de la actividad agonista de la mezcla de CBD+THC (0-300  $\mu\text{M}$  cada una) en presencia de concentraciones crecientes de CBC (0-300  $\mu\text{M}$ ). Tenga en cuenta que el CBC produjo una respuesta de concentración como un agonista parcial débil que no tuvo un efecto significativo en la respuesta de concentración a la mezcla de CBD+THC, pero mostró una tendencia hacia el efecto agonista de los tres cannabinoides juntos.

Tabla 5 Actividad agonista CBD+THC CRC (% de aceite de mostaza 3000 $\mu\text{M}$ )					
#	Concentraciones de CBD+THC, $\mu\text{M}$	Agonista			
		$\text{E}_{\text{MIN}}$ , %	$\text{E}_{\text{MÁX}}$ , %	$\text{EC}_{50}$ , $\mu\text{M}$	Pendiente de Hill
1	0.1	0.92	60.81	3.94	-1.32
2	0.3	-0.56	59.65	4.85	-1.27
3	1	1.46	56.12	2.94	-1.65
4	3	1.13	56.33	3.18	-2.74
5	10	1.81	58.48	5.40	-1.81
6	30	1.77	54.94	4.10	-1.50
7	100	9.17	51.28	5.38	-1.96
8	300	8.41	49.84	4.64	-1.79
1	Aceite de mostaza	1.01	100.00	478.64	-1.91
2	Metanol	0.95	3.97	1.21	-0.70
3	Rojo rutenio*	0.00	47.50	1.79	0.85
4	CBC CRC	0.86	10.31	44.14	-0.96
* - Se muestra IC50					

La Tabla 6 muestra información numérica de la actividad agonista del CBC en control (0-300  $\mu\text{M}$ ) y en presencia de concentraciones crecientes de mezcla de CBD+THC (0.1-300  $\mu\text{M}$ ). Tenga en cuenta que la mezcla de CBD+THC, en concentraciones  $\geq 3 \mu\text{M}$ , produjo una respuesta de concentración propia, que ocluyó la

respuesta de concentración al CBC. Tenga en cuenta que en el umbral de activación de los receptores TRPA1 por la mezcla de CBD+THC (1  $\mu$ M), la respuesta de concentración de los receptores TRPA1 aumentó en potencia y eficacia (mostrada como texto en negrita).

Tabla 6 Actividad agonista CBC CRC (% de aceite de mostaza 3000 $\mu$ M)					
#	Concentraciones de CBD+THC, $\mu$ M	Agonista			
		$E_{MIN}$ , %	$E_{MAX}$ , %	$EC_{50}$ , $\mu$ M	Pendiente de Hill
1	0.1	0.92	10.05	54.48	-3.56
2	0.3	1.42	13.12	64.06	-1.00
3	1	2.40	17.09	26.01	-1.00
4	3	15.03	30.69	ND	NO
5	10	42.93	53.20	NO	NO
6	30	47.70	60.81	ND	NO
7	100	37.89	58.48	ND	NO
8	300	29.27	37.22	ND	NO
1	Aceite de mostaza	1.01	100.00	478.64	-1.91
2	Metanol	0.95	3.97	7.20	-0.34
3	Rojo rutenio*	0.00	47.50	1.79	0.85
4	control CBC CRC	0.86	10.31	44.14	-0.96
* - Se muestra IC50					

- 5 CBC CRC ha sido ocluido al aumentar las concentraciones de la mezcla de CBD+THC y comenzando con una mezcla de CBD+THC de 3  $\mu$ M, se enmascaró CBC CRC.

CBC no tiene ningún efecto sobre la mezcla de CBD+THC CRC  $EC_{50}$  y  $E_{MAX}$ . En las concentraciones más altas de CBC analizadas, la porción inicial de la mezcla de CBD+THC aumentó el CRC, lo que resultó en un desplazamiento marginal hacia la derecha de la  $CE_{50}$  para la mezcla de CBD+THC CRC. Se puede concluir que la mezcla de CBC y CBD +THC produce activación de receptores con diferente grado de agonismo parcial al actuar en el mismo sitio de unión de los receptores TRPA1.

Se observó una modulación positiva de la respuesta de concentración al CBC (sinergia) en la concentración cercana al umbral de la mezcla de CBD+THC (1  $\mu$ M). Tabla 6 y Figura 20A, Panel D y Figura 20B, Panel G) y consistió en: (1) Desplazamiento hacia la izquierda de la curva de respuesta de concentración a CBC desde  $EC_{50}=44.1$   $\mu$ M (Figura 20A, Panel D) a la  $CE_{50}=26.0$   $\mu$ M (Figura 20B, Panel G); y (2) Aumento de la eficacia del  $10.3 \pm 1.9$  % (n=4) hasta  $16.2 \pm 1.3$  % (n=4) en una mezcla de CBD+THC de 300  $\mu$ M.

La sinergia observada de estos dos agonistas parciales puede atribuirse a la existencia de dos sitios de unión idénticos en el receptor TRPA1 y a la cooperatividad positiva en la unión de dos restos de ligando a los receptores (modulación ortostérica). Por ejemplo, la unión de un resto de ligando al primer receptor cebador de sitio de unión o el aumento de la afinidad de unión al segundo sitio de unión. Una explicación alternativa es la existencia de un sitio de modulación alostérica positiva. Sin limitarse al mecanismo de acción, se observaron estos efectos sinérgicos.

#### Conclusión

Estos datos confirman la activación directa del CBC en el canal iónico TRPA1 (potencial receptor transitorio Ankyrin 1), como un importante sensor de nocicepción en humanos.

También se confirmó la actividad agonista parcial del CBC con la mezcla de CBD+THC en los receptores TRPA1.

La actividad agonista del CBC con el CBD y el THC probablemente estuvo mediada por el mismo sitio de unión.

En el umbral cercano a la activación de los receptores TRPA1 con la mezcla de CBD+THC (1  $\mu$ M cada uno), el CBC activó los receptores TRPA1 con mayor eficacia y potencia. Cannabicromeno  $E_{MAX}$  (eficacia) aumentó de  $10 \pm 2$  % hasta  $16 \pm 1$  % y su potencia de  $EC_{50}=44$   $\mu$ M a  $CE_{50}=26$   $\mu$ M (Figuras 20A y 20B).

- 5 Este estudio también confirma el efecto sinérgico entre el CBC y el CBD+THC.

La sinergia observada de estos dos agonistas parciales podría explicarse teóricamente por la existencia de dos sitios de unión idénticos en el receptor TRPA1 y la cooperatividad positiva en la unión de dos restos de ligando a los receptores (modulación ortostérica). Por ejemplo, la unión de un resto de ligando al primer sitio de unión cebaría el receptor o aumentaría la afinidad del segundo sitio de unión. Una explicación alternativa es la existencia de un sitio de modulación alostérica positiva específica. Se deben diseñar experimentos adicionales para abordar un mecanismo exacto de estos efectos sinérgicos.

En conjunto, el efecto directo del cannabicromeno sobre la activación de los canales iónicos TRPA1 y el aumento de la potencia del cannabicromeno con CBD+THC confirman aún más que el CBC tiene propiedades para controlar el dolor. Por lo tanto, la adición de CBC al CBD y  $\Delta$ 9-THC puede reducir la ingesta de CBD y THC en pacientes para el tratamiento del dolor.

En la descripción anterior, con fines explicativos, se exponen numerosos detalles para proporcionar una comprensión profunda de las realizaciones. Sin embargo, resultará evidente para un experto en la técnica que estos detalles específicos no son necesarios.

Las realizaciones descritas anteriormente pretenden ser sólo ejemplos. Los expertos en la técnica pueden realizar alteraciones, modificaciones y variaciones en las realizaciones particulares. El alcance de las reivindicaciones no debe limitarse por las realizaciones particulares establecidas en el presente documento, sino que debe interpretarse de manera consistente con la especificación en su conjunto.

#### Referencias

- WO2016/044370 A1
- 25 WO2013/165251 A1
- WO2012/144892 A1
- WO2012/160358 A1
- WO2007/083098 A1
- US2016/0106705
- 30 US2016/0360721
- US2018/0193304
- Bouhassira D, 2008 "Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population." Pain, Jun;136(3):380-7.
- 35 Crippa JA, Crippa AC, Hallak JE, Martin-Santos R, Zuardi AW. 2016. " $\Delta$ 9-THC intoxication by cannabidiol-enriched cannabis extract in two children with refractory epilepsy: full remission after switching to purified cannabidiol." Front. Pharmacol. 7:35.
- Crippa JS, Suimeraes FS, Campos AC, Zuardi AW. 2018. "Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age." Fron. Immunol.
- 40 De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allara M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V. 2011. "Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes." Br J Pharmacol 163:1479.
- Deyo R, Musty R. 2003. "A cannabichromene (CBC) extract alters behavioral despair on the mouse tail suspension test of depression." Proceedings 2003 Symposium on the Cannabinoids. Cornwall, ON: International Cannabinoid Research Society. Cornwall, ON. 146.
- 45 Elsohly M, Gul W. 2014. "Constituents of Cannabis sativa". In: Pertwee RG (ed) Handbook of Cannabis. Oxford: Oxford University Press.
- Guimarães FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW. 1990. "Anxiolytic effect of cannabidiol in the elevated plusmaze". Psychopharmacology (1990) 100:558-9.

- 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* 30:515.
- Izzo, AA, and Aviello G, Borrelli F, Romano B, Piscitelli F, Gallo L, Capasso F, Orlando P, Di Marzo V Capasso R. 2012. "Inhibitory effect of cannabichromene, a major non-psychotropic cannabinoid extracted from *Cannabis sativa*, on inflammation-induced hypermotility in mice." *Br J Pharmacol* 166(4):1444-60.
- Kim, SH, and Chung JM. 1992 "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat." *Pain. Sep*;50(3):355-63.
- Lewis M A, Russo EB, and Smith KM. 2017. "Pharmacological foundations of cannabis chemovars." *Planta Med.* 84: 225-233.
- Maione S, Piscitelli F, Gatta L, D. Vita, L. De Petrocellis, E. Palazzo, V. de Novellis, V. Di Marzo. 2011. "Nonpsychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action." *Br. J. Pharmacol.* 162: 584-596.
- Mandolini GM, Lazzaretti M, Pighi A, Oldani L, et al. 2018. "Pharmacological properties of cannabidiol in the treatment of psychiatric disorders: a critical overview." *Epidemiol Psychiatr Sci.* 27(4):327-335.
- Morales P, Hurst, D. P., and Reggio, P. H. 2017. "Molecular targets of the phytocannabinoids-a complex picture." *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 103-131.
- Patel, S., Hill, M. N., Cheer, J. F., Wotjak, C. T., and Holmes, A. 2017. "The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs." *Neurosci. Biobehav. Rev.* 76: 56-66.
- Reithmeier D, Tang-Wai R, Seifert B, Lyon AW, Alcorn J, Acton B, Corley S, Prosser-Loose E, Mousseau DD, Lim HJ, Tellez-Zenteno J, Huh L, Leung E, Carmant L and Huntsman RJ. 2018. "The protocol for the Cannabidiol in children with refractory epileptic encephalopathy (CARE-E) study: a phase 1 dosage escalation study." *BMC Pediatrics* 18:221.
- Russo, EB. 2011. "Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects." *Br J Pharmacol* 163:1344.
- Shinjyo N, Di Marzio V. 2013. "The effect of cannabichromene on adult neural stem/progenitor cells." *Neurochemistry International* 63(5): 432-437.
- Wolf SA, Bick-Sander A, Fabel K, Leal-Galicia P, Tauber S, Ramirez-Rodriguez G, et al. 2010. "Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis." *Cell. Commun Signal* 8:12.



## REIVINDICACIONES

1. Una formulación para uso en un método de manejo del dolor por parte de un sujeto que lo necesita, dicha formulación consiste en tetrahidrocannabinol (THC), cannabícromeno (CBC) y cannabidiol (CBD), y uno o más excipientes; en el que los cannabinoides primarios comprenden o consisten en, en porcentaje en peso:  
  
5     30 % - 45 % de THC;  
  
      9 % - 35 % CBC; y  
  
      30 % - 45 % CBD, y  
  
      la proporción de THC:CBC:CBD es 1:1:1 con base en peso.
2. La formulación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el manejo del dolor comprende el  
10    tratamiento del dolor debido a cáncer, lesión, accidente, cirugía, inflamación, daño tisular, artritis, dolor en las articulaciones, dolor por infección, dolor gastrointestinal, diabetes, neuropatía diabética, neuralgia postculebrilla, dolor neuropático, neuropatía periférica o esclerosis múltiple.
3. La formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la formulación se prepara en una  
15    forma de dosificación seleccionada del grupo que consiste en una píldora, tableta, cápsula de gel, jarabe, aerosol a base de aceite y forma de aceite líquido.
4. La formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la formulación proporciona una cantidad total de 1 mg a 25 mg de THC, CBC y CBD por dosis.
5. La formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la formulación proporciona una cantidad  
      total de 5 mg a 20 mg de THC, CBC y CBD por dosis.
- 20    6. La formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la formulación proporciona al sujeto THC:CBC:CBD en cantidades de hasta 20:20:20 mg por dosis.
7. La formulación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la formulación proporciona al sujeto THC:CBC:CBD en un rango de 5:5:5 a 10:10:10 mg por dosis.

# Fase conductual

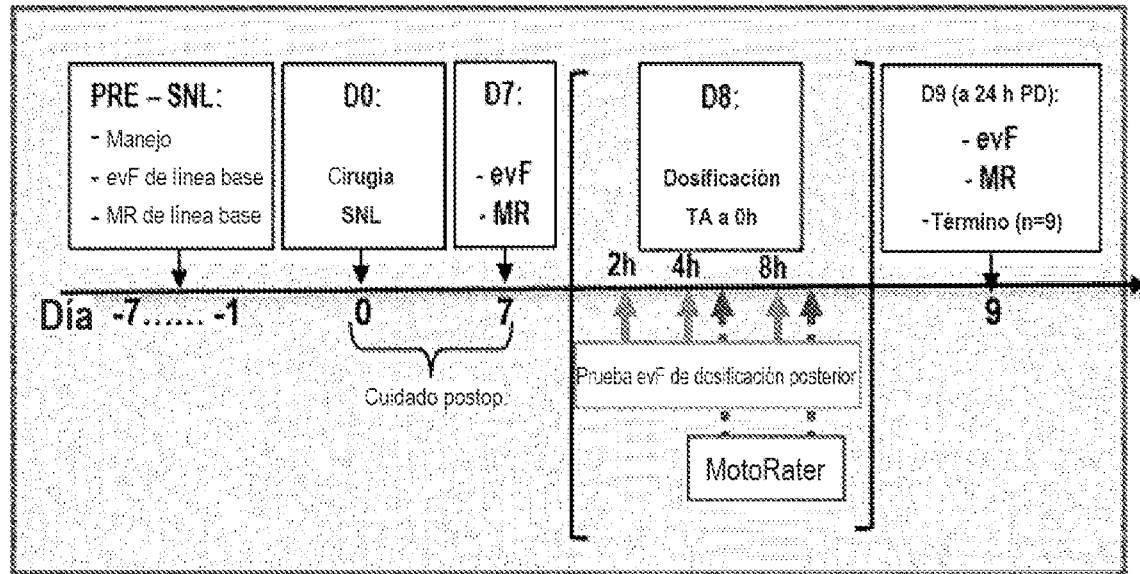


FIG. 1

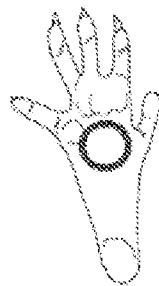


FIG. 2

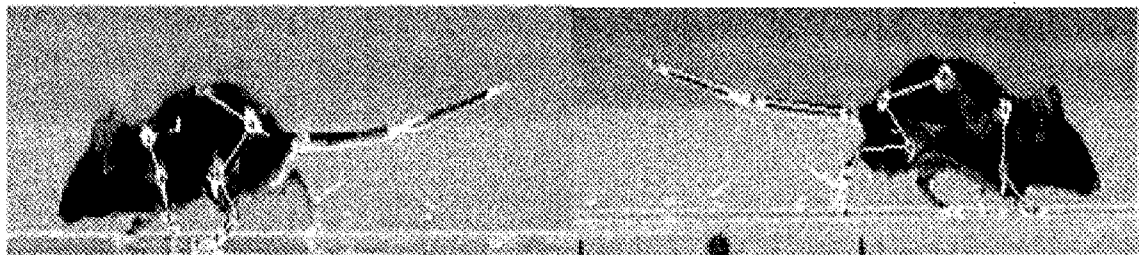


FIG. 3A

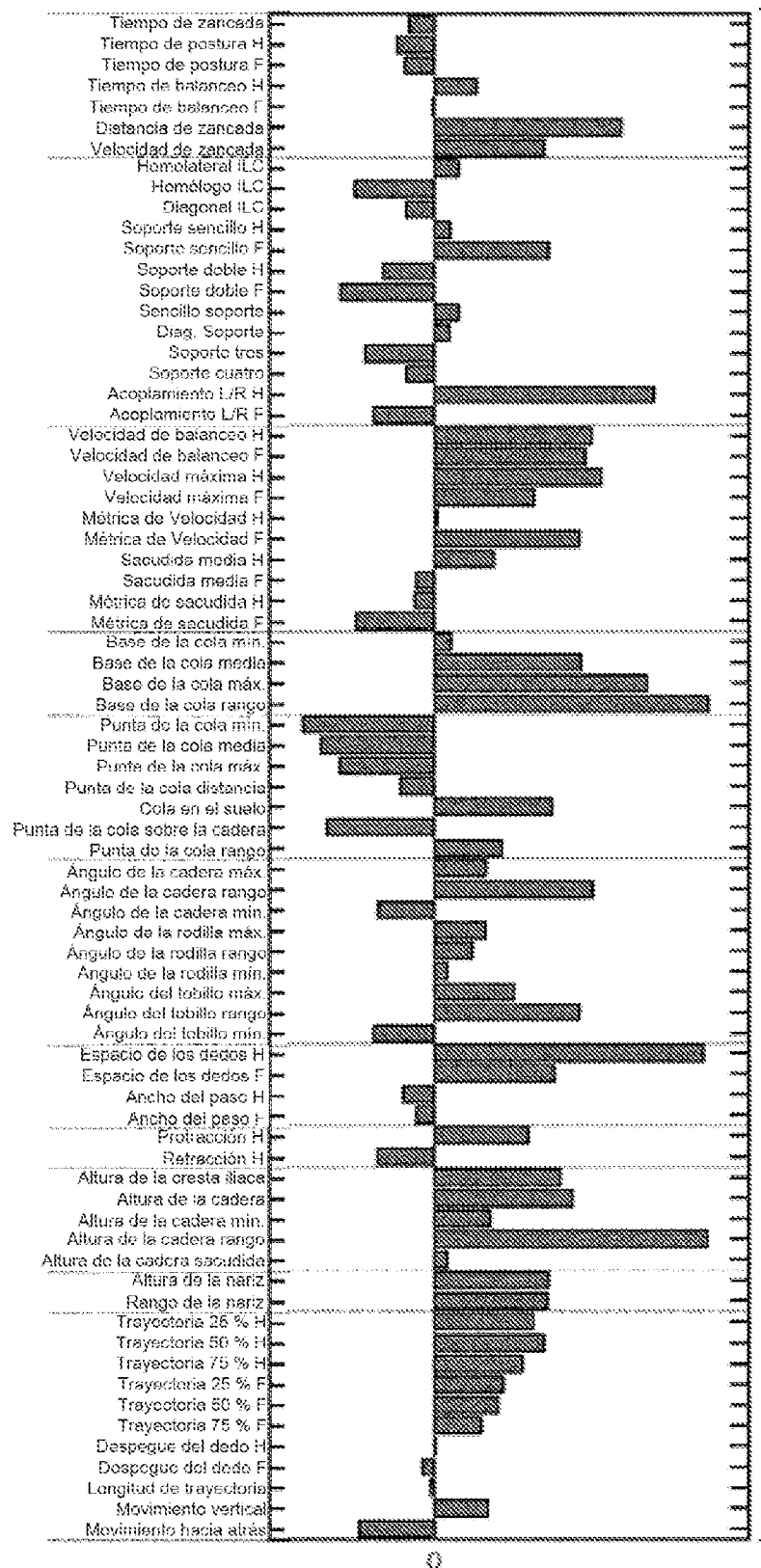


FIG. 3B

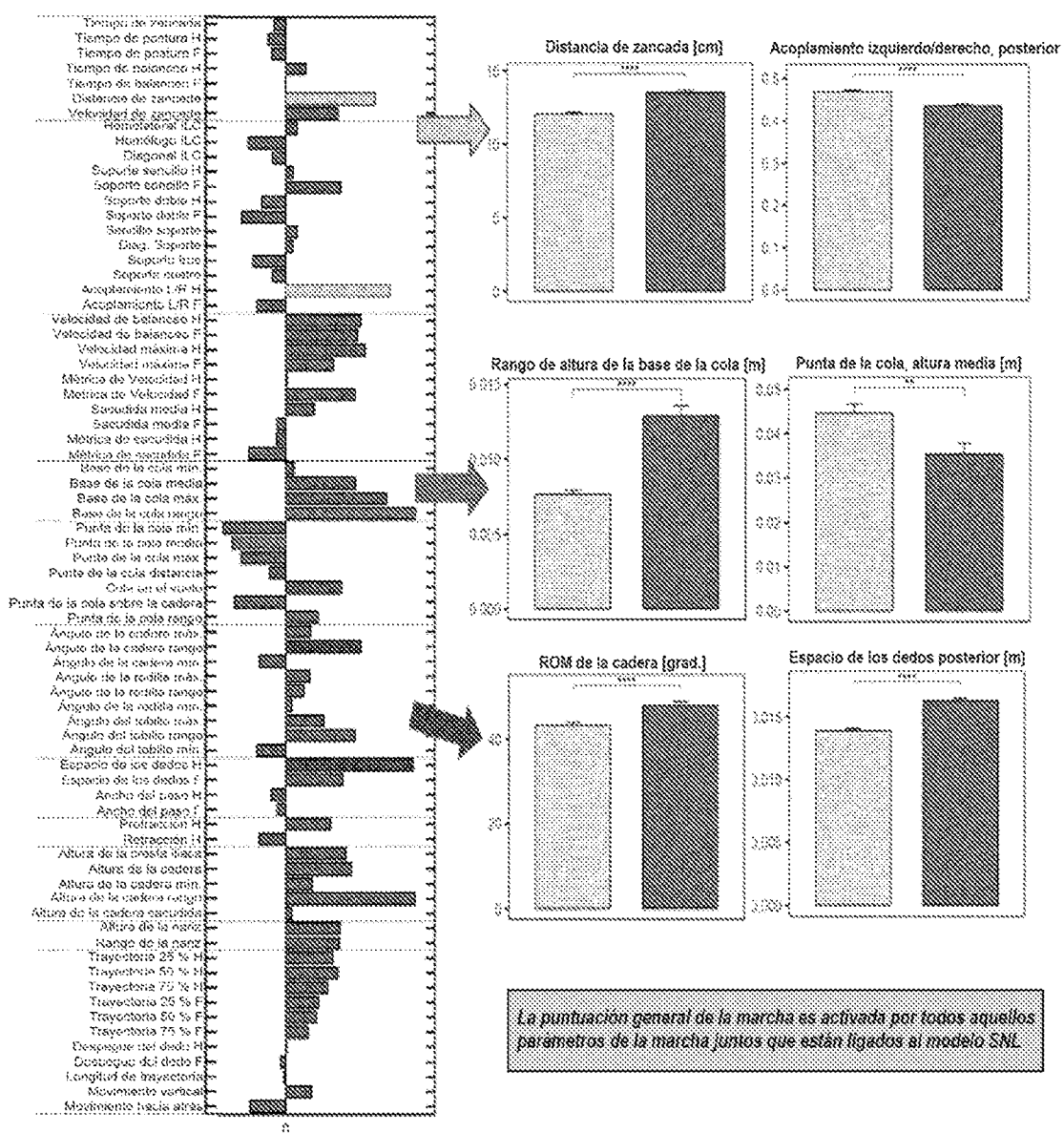


FIG. 4

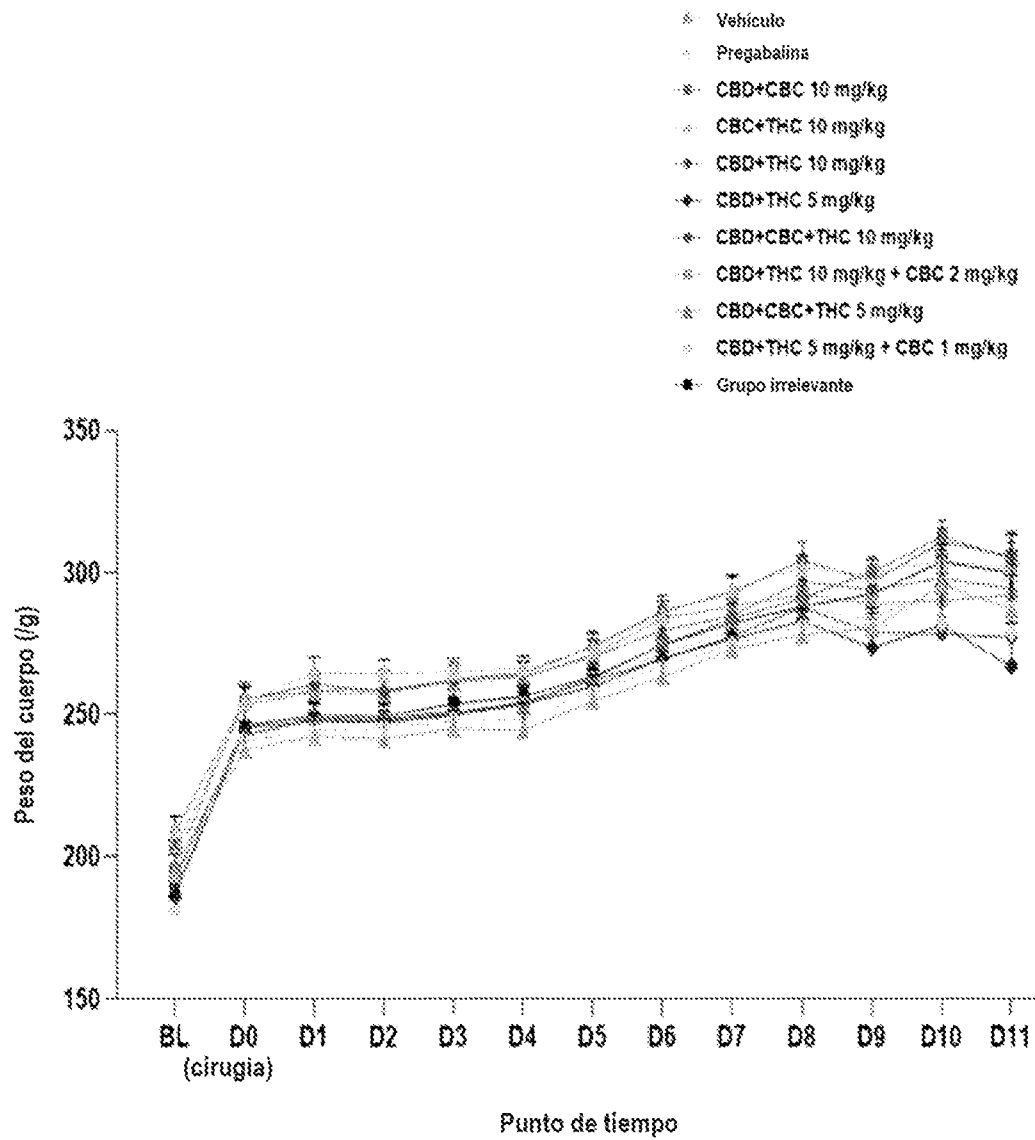


FIG. 5

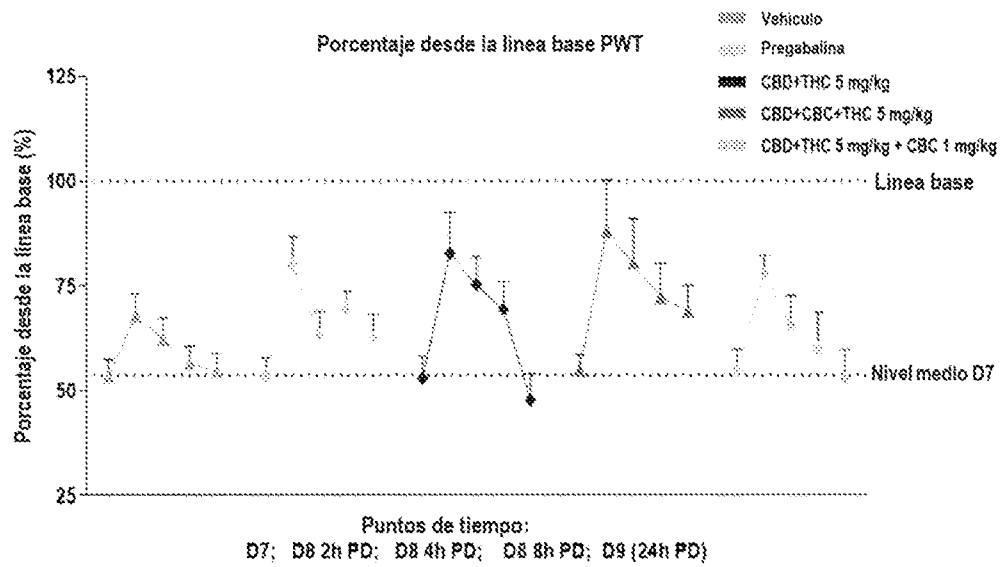


FIG. 6

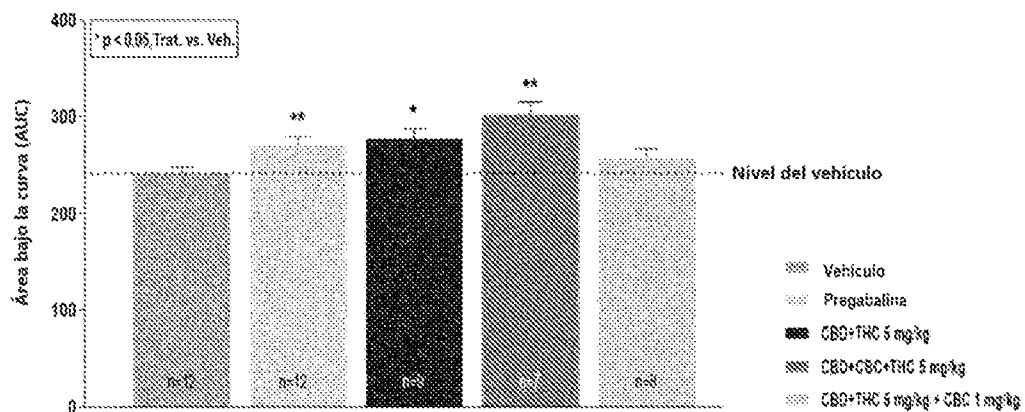


FIG. 7

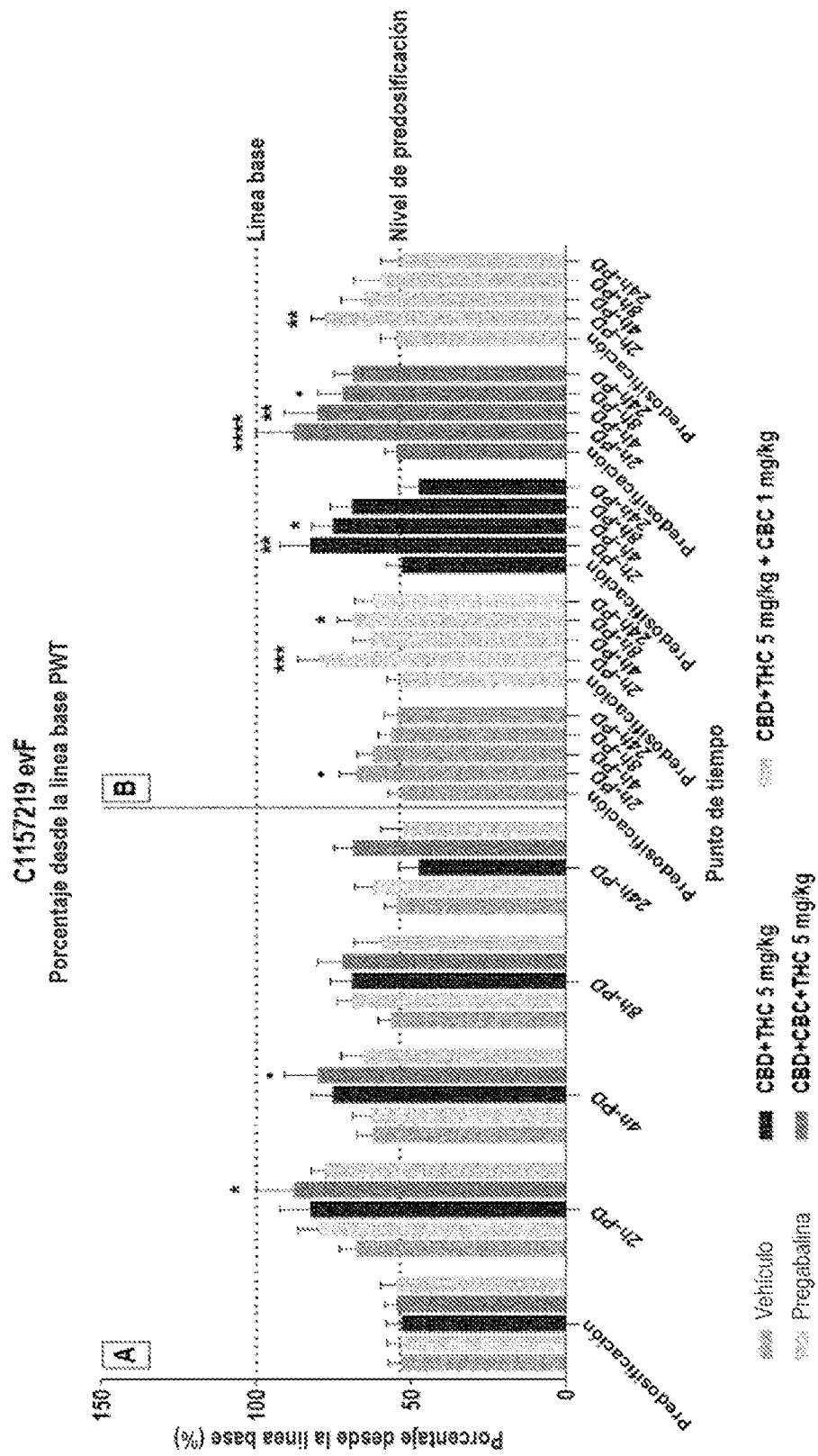


FIG. 8

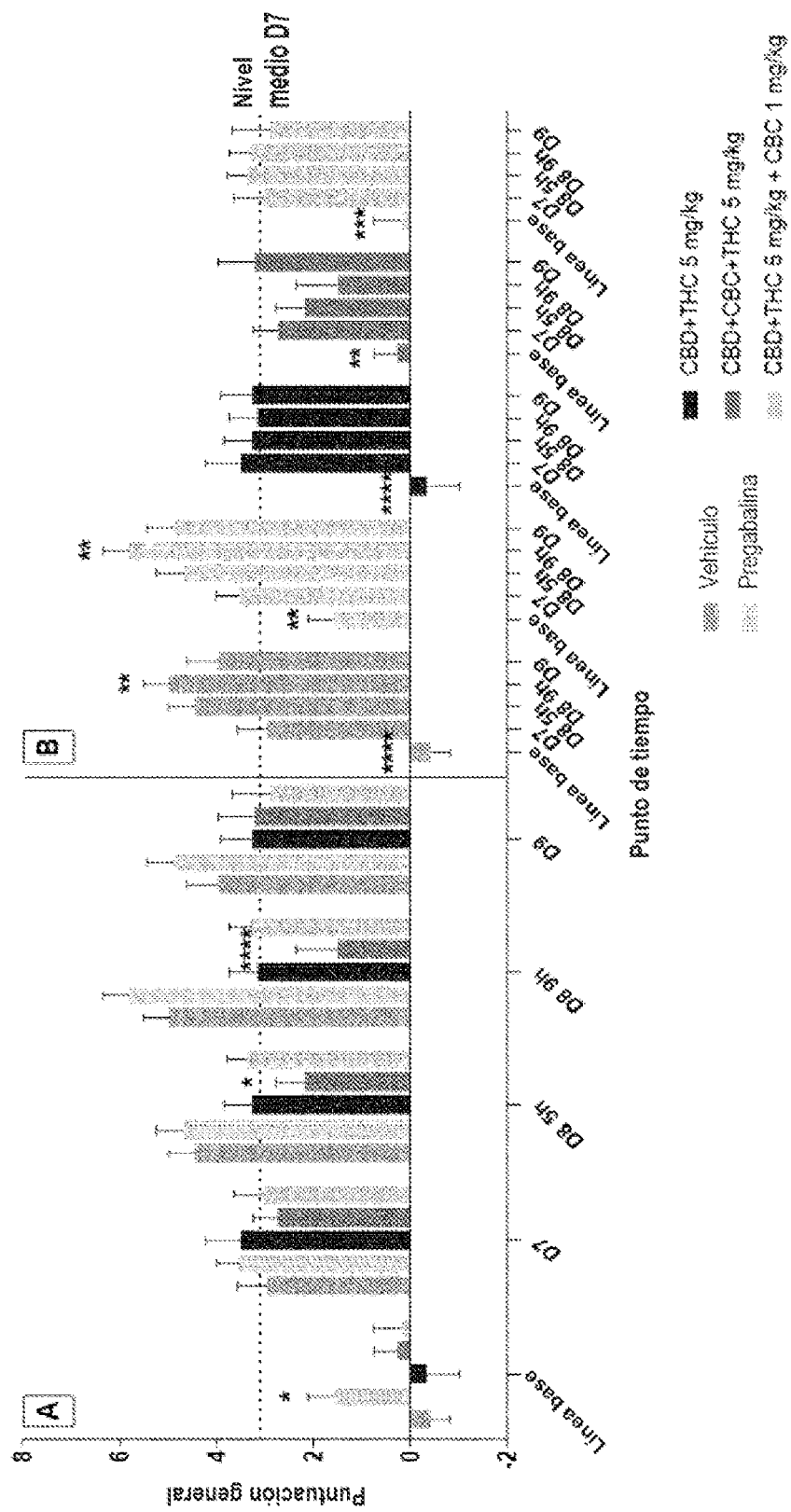
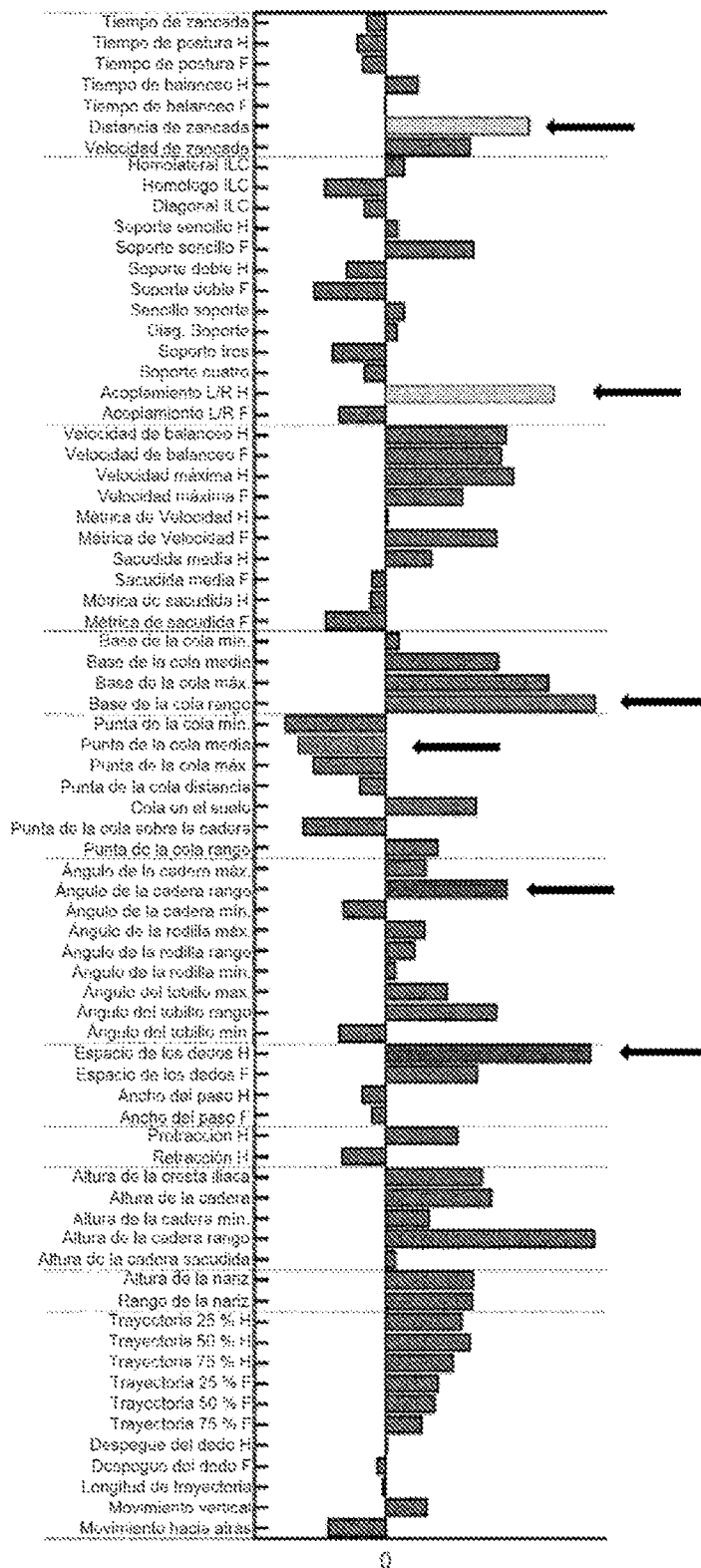


FIG. 9



FIG. 10A



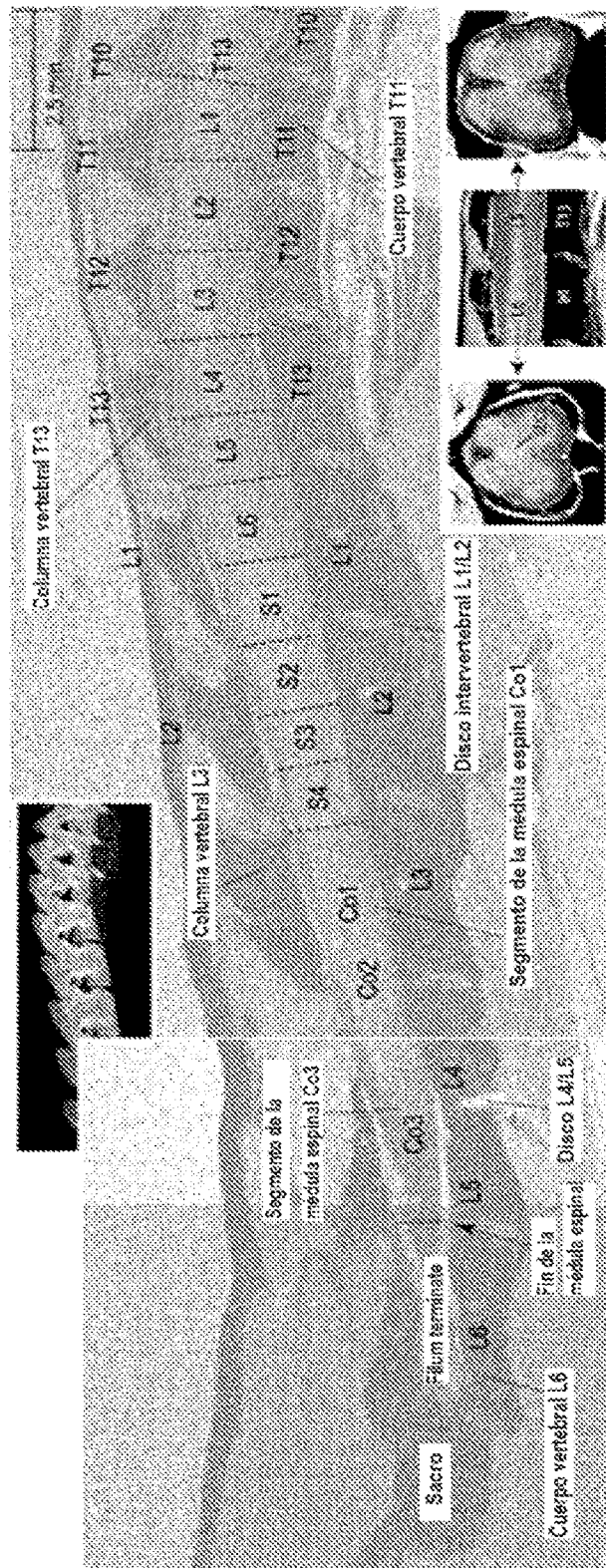


FIG. 10B

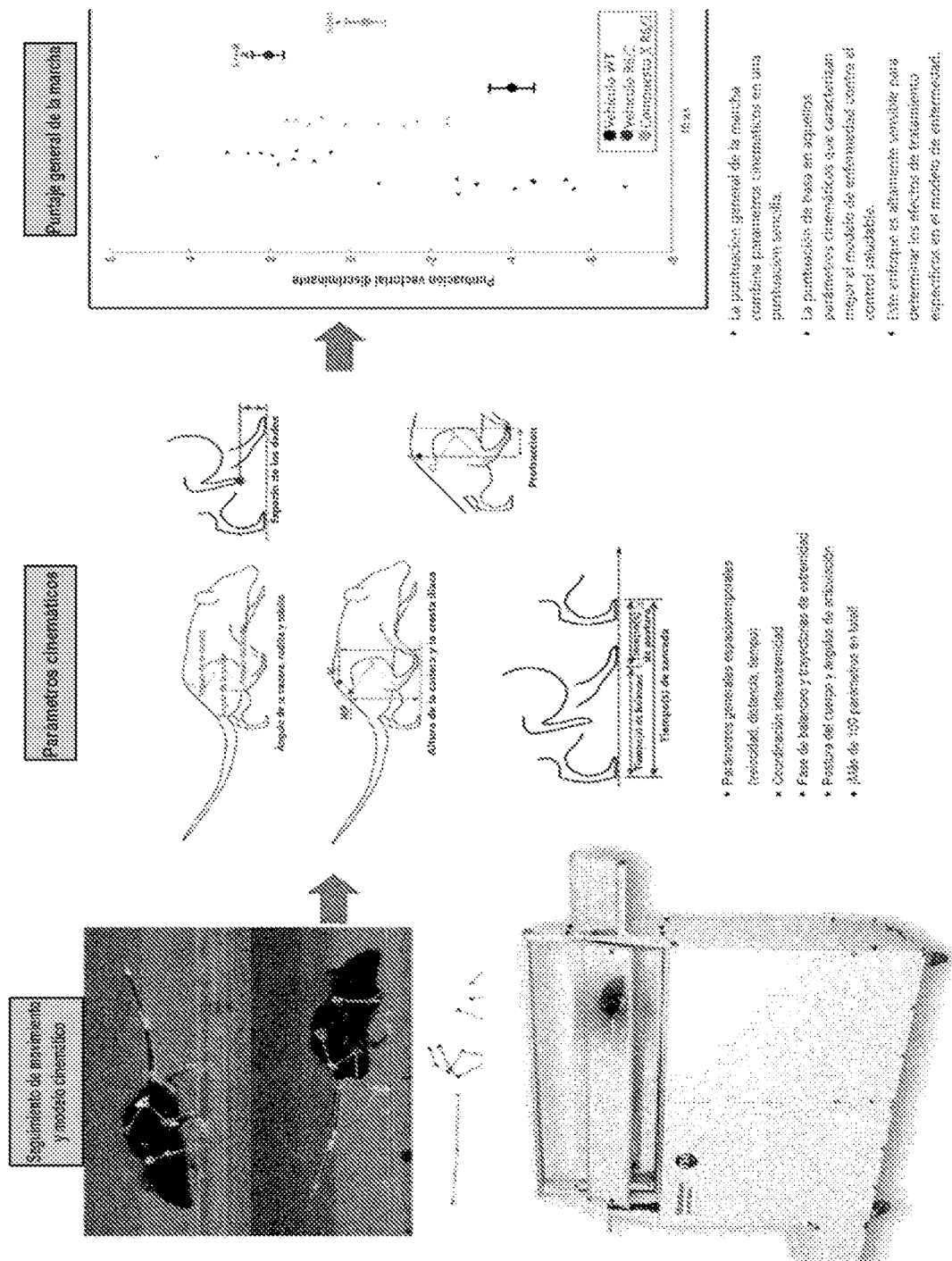


FIG. 10C

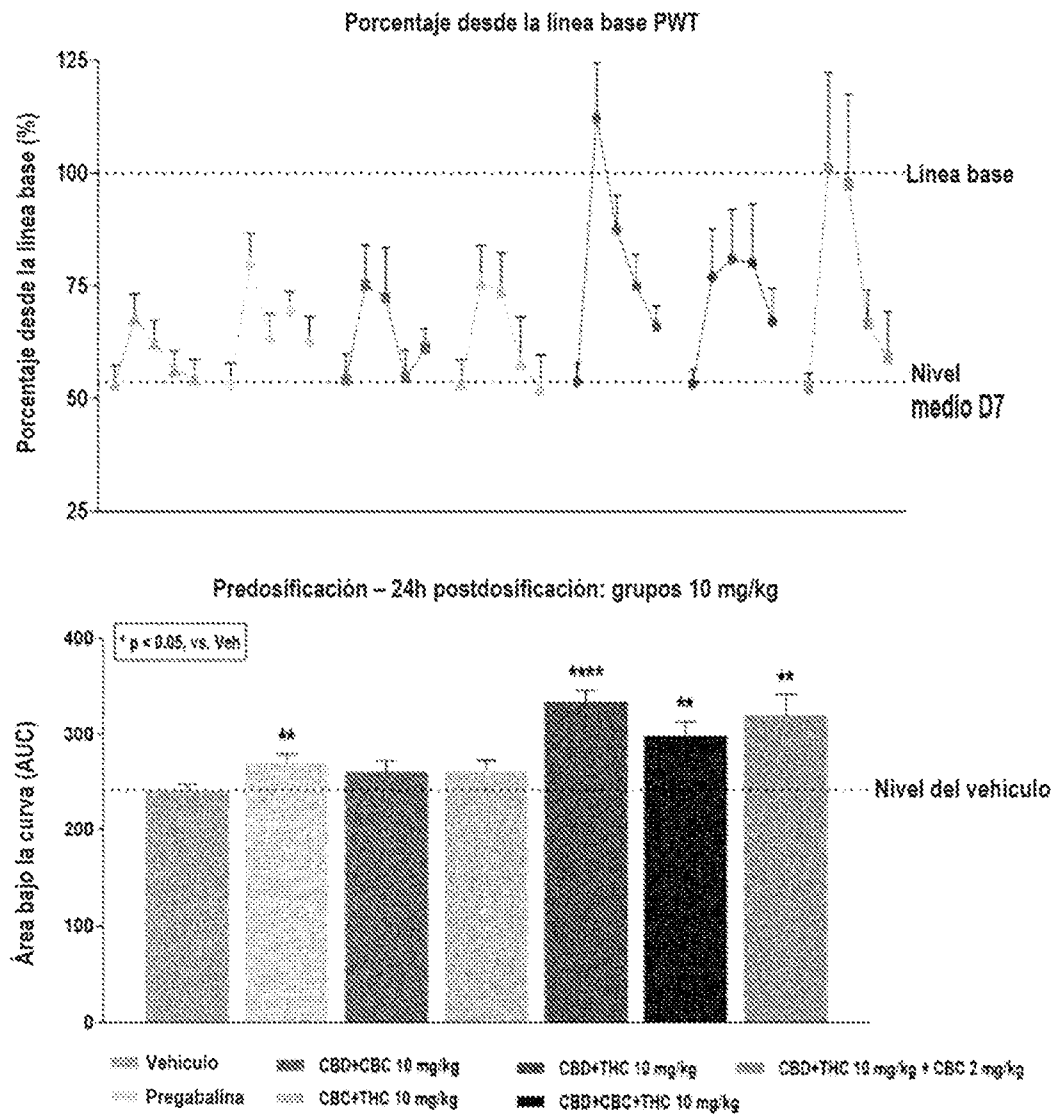


FIG. 11





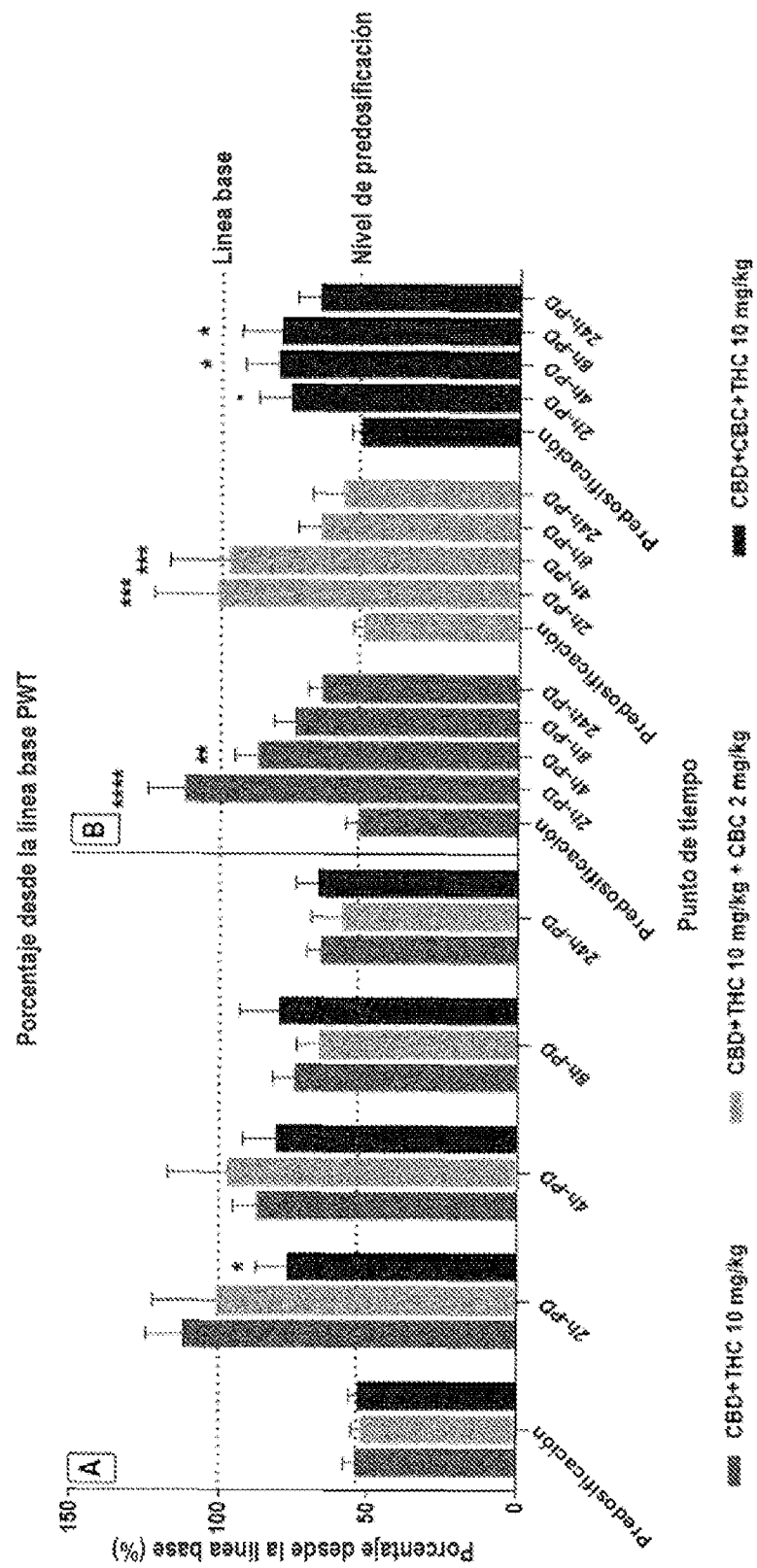


FIG. 14

Puntuación general de la marcha C1157219

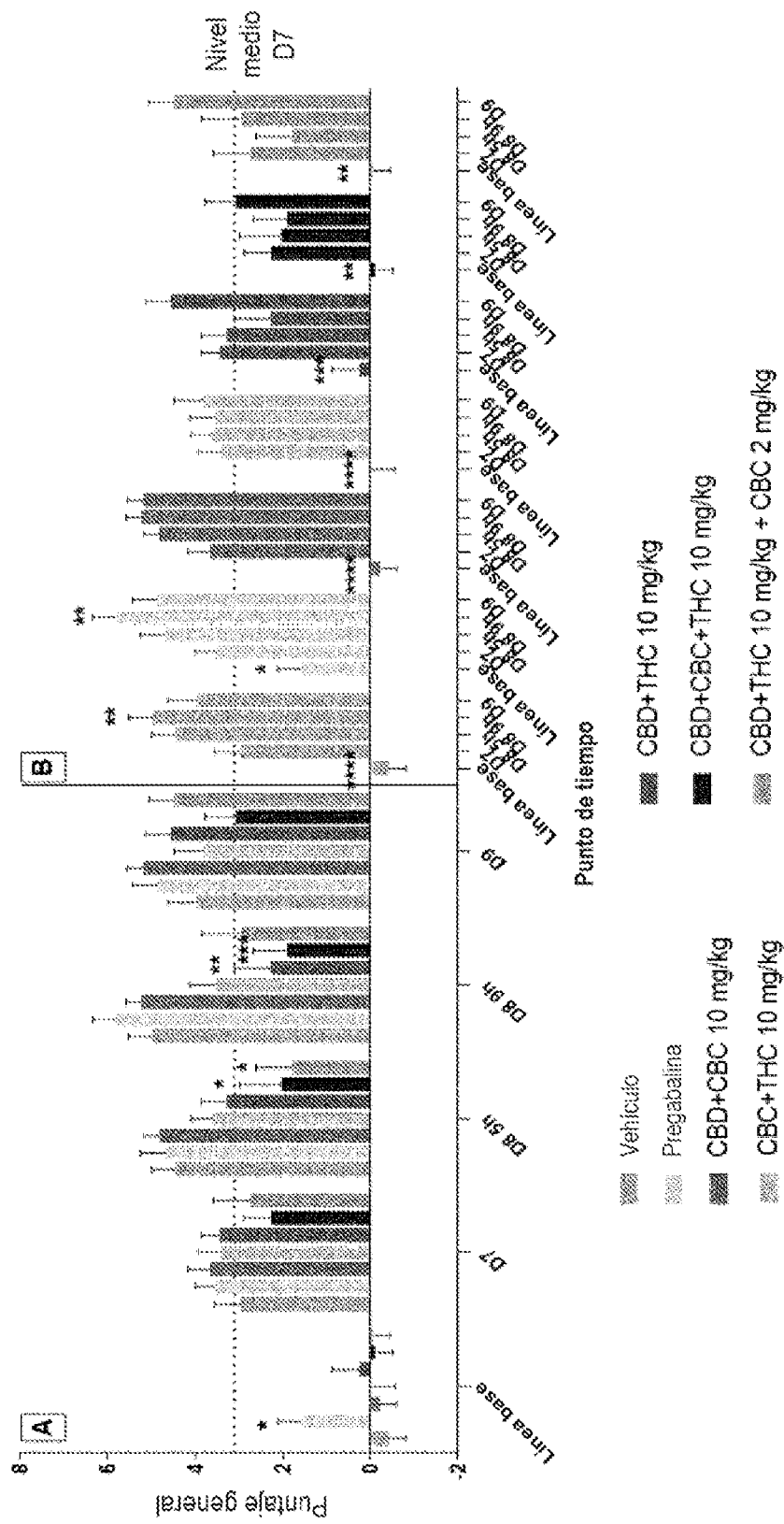


FIG. 15



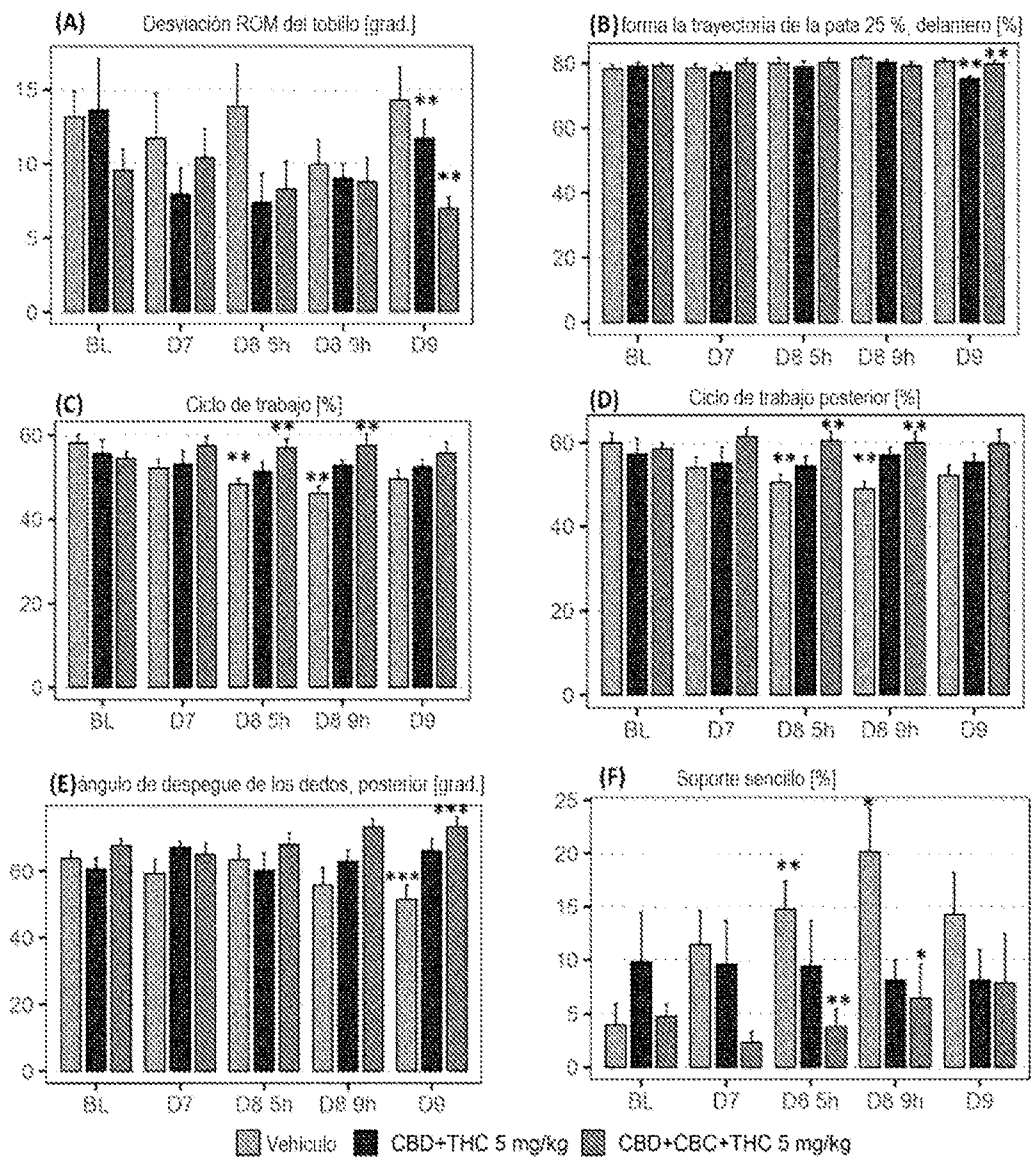


FIG. 16

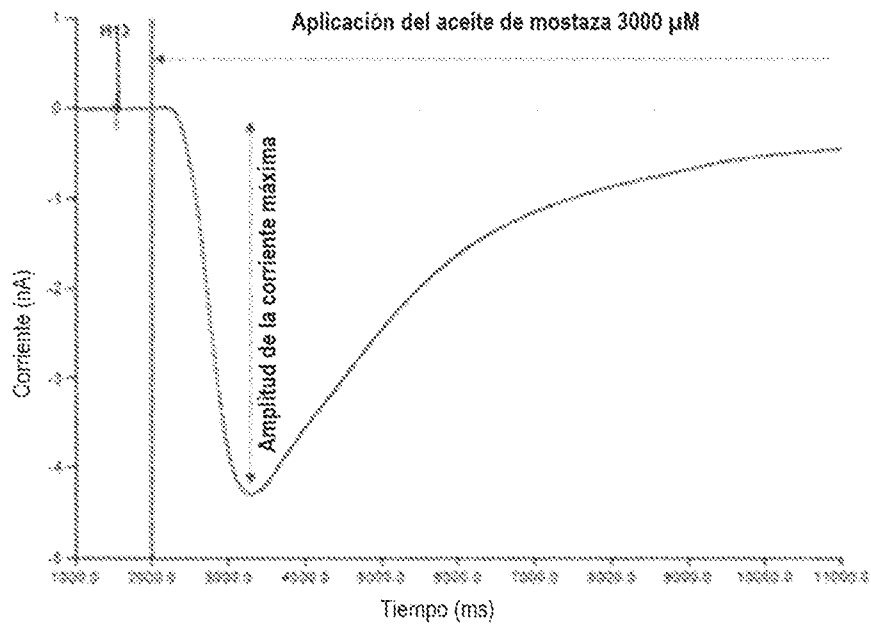


FIG. 17

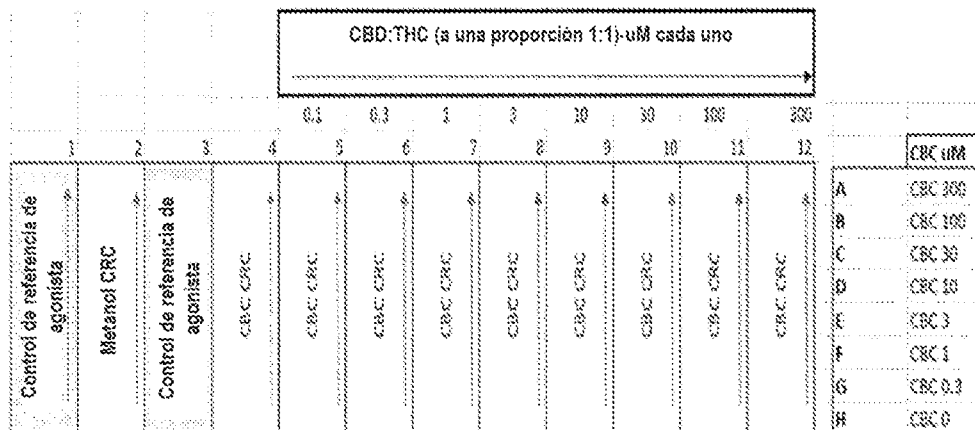
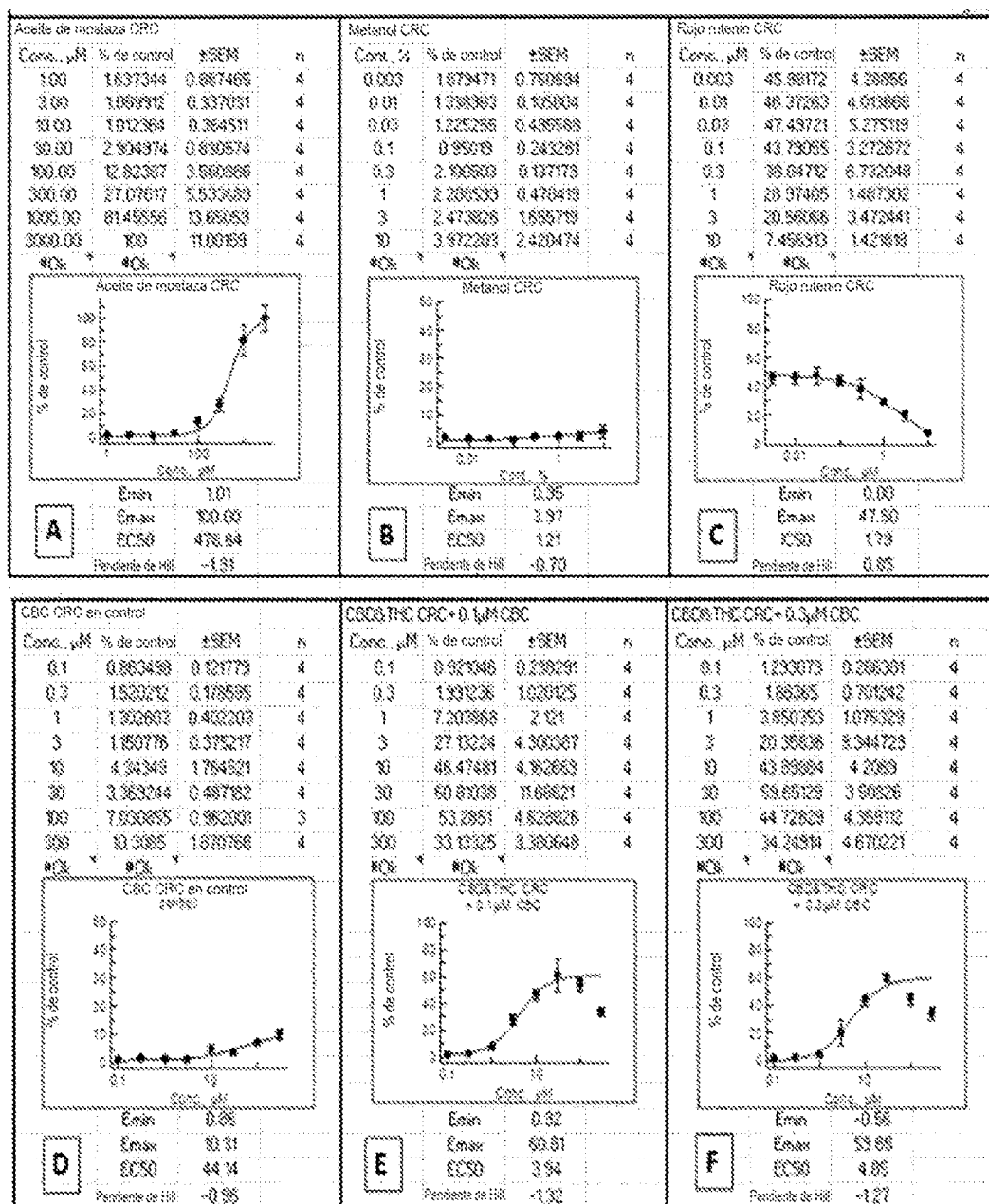


FIG. 18



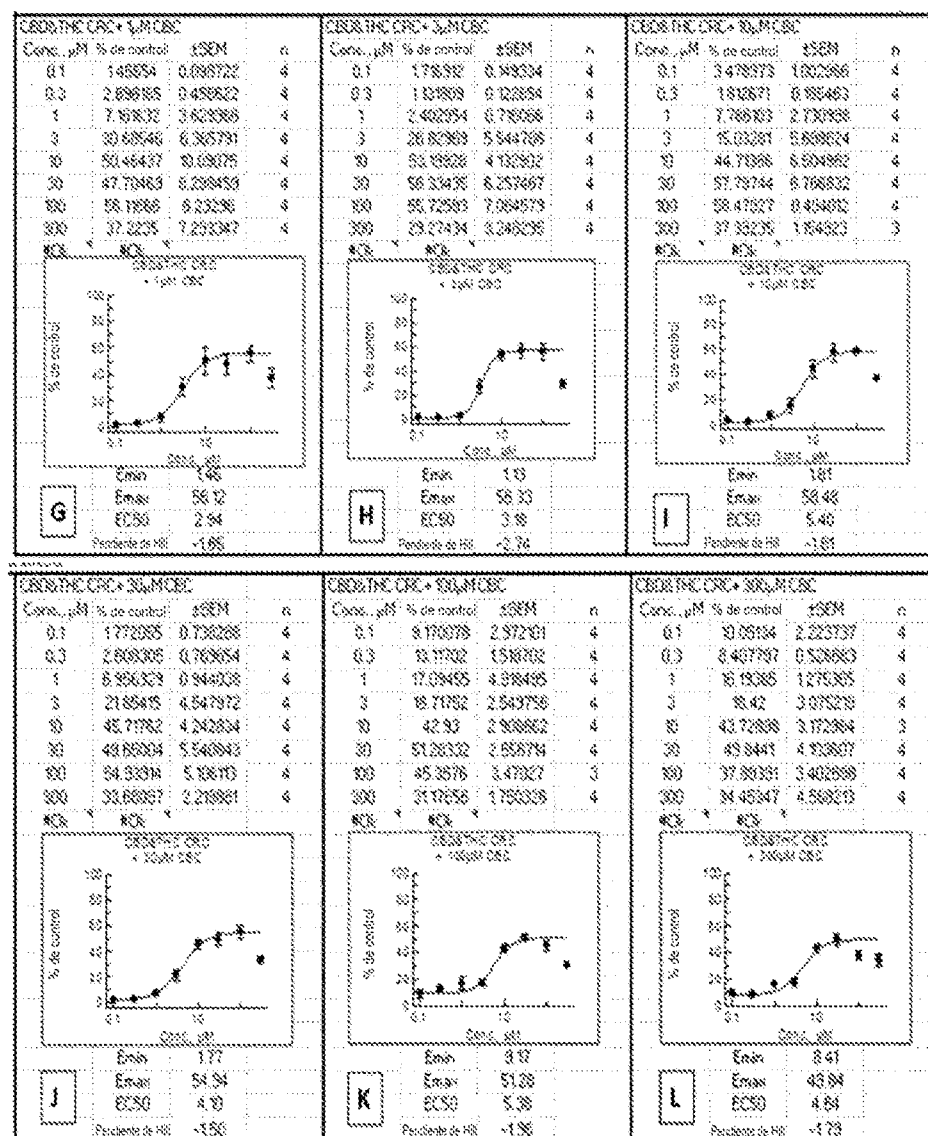


FIG. 19B

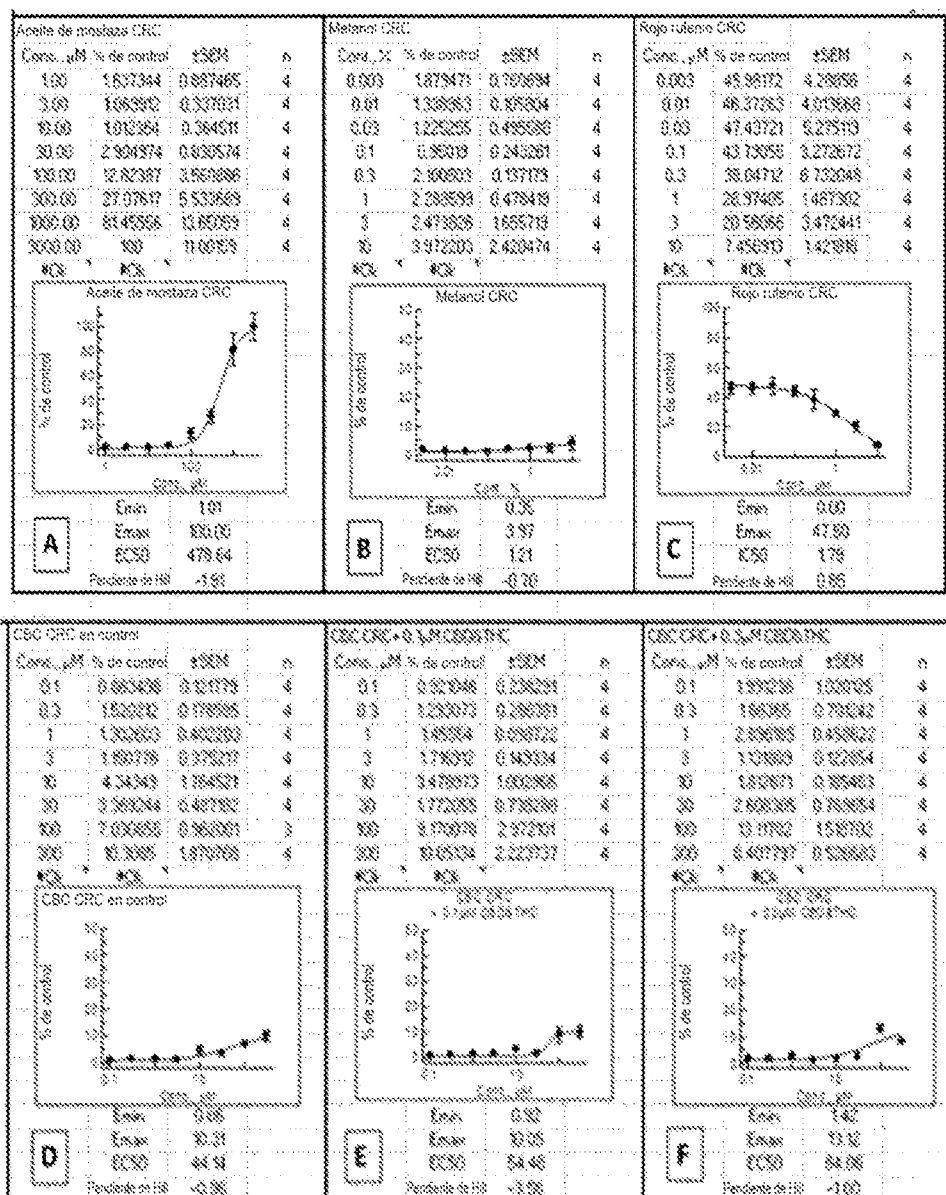


FIG. 20A

