

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 026**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 31/00** (2006.01)  
**A61P 3/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08735849 .5**  
96 Fecha de presentación: **04.04.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2129374**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.2009**

54 Título: **INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA EXPRESIÓN Y/O LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR CB2 PARA EL TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD Y LOS TRASTORNOS RELACIONADOS CON LA OBESIDAD.**

30 Prioridad:  
**04.04.2007 EP 07290411**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.02.2012**

73 Titular/es:  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
101, RUE DE TOLBIAC  
75013 PARIS, FR**

72 Inventor/es:  
**DEVEAUX, Vanessa;  
TEIXEIRA CLERC, Fatima;  
MANIN, Sylvie;  
LOTERSZTAJN, Sophie;  
MALLAT, Ariane y  
TRAN-VAN-NHIEU, Jeanne**

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireya**

ES 2 374 026 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

Inhibidores selectivos de la expresión y/o la actividad del receptor CB2 para el tratamiento de la obesidad y los trastornos relacionados con la obesidad

**Campo de la invención**

La invención se refiere a la utilización de un inhibidor selectivo de la expresión y/o la actividad del receptor CB2 para la preparación de un medicamento destinado para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno relacionado con la obesidad, en el que trastorno relacionado con la obesidad es la resistencia a la insulina.

**Antecedentes de la invención**

La obesidad es un estado caracterizado por un exceso de grasa corporal. La prevalencia del sobrepeso y de la obesidad se considera un importante problema de salud pública en el mundo. Aproximadamente dos tercios de los adultos estadounidenses cumplen los criterios de sobrepeso u obesidad. Realmente, la obesidad es un importante factor de riesgo para cardiopatía coronaria (CHD), disfunción ventricular, insuficiencia cardiaca congestiva, accidente cerebrovascular y arritmias cardíacas. Además, la obesidad está estrechamente relacionada con diabetes tipo 2, síndrome metabólico y trastornos hepáticos tales como enfermedad de hígado graso no alcohólico.

La diabetes tipo 2, o diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM), está caracterizada porque el paciente produce insulina e incluso presenta hiperinsulinemia (niveles de insulina plasmática que son iguales o incluso están elevados en comparación con sujetos no diabéticos), mientras que al mismo tiempo muestran hiperglucemia. Los diabéticos tipo 2 desarrollan a menudo "resistencia a la insulina", de manera que el efecto de la insulina en la estimulación del metabolismo de lípidos y de la glucosa en los principales tejidos sensibles a la insulina, concretamente, los tejidos muscular, hepático y adiposo, disminuye y por tanto esos pacientes presentan un riesgo aumentado de complicaciones cardiovasculares, por ejemplo, aterosclerosis, cardiopatía coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, hipertensión, nefropatía, neuropatía y retinopatía.

Muchos pacientes que presentan resistencia a la insulina, pero que no han desarrollado diabetes tipo 2, presentan el riesgo de desarrollar síntomas denominados síndrome metabólico. El síndrome metabólico se caracteriza por resistencia a la insulina, junto con obesidad abdominal, hiperinsulinemia, tensión arterial alta, HDL bajo y VLDL alto. Estos pacientes, desarrollen o no diabetes mellitus manifiesta, presentan un riesgo aumentado de desarrollar complicaciones cardiovasculares.

Además, las evidencias epidemiológicas sugieren que la obesidad aumenta el riesgo de cirrosis. Por ejemplo, en series de autopsia, la obesidad se identificó como el único factor de riesgo para la enfermedad en el 12% de los sujetos cirróticos (Yang, S. Q. *et al.*; 1997). Particularmente, la cirrosis es aproximadamente seis veces más prevalente en individuos obesos que en la población general. El grado de obesidad se correlaciona positivamente con la prevalencia y la gravedad de hígado graso (esteatosis), y esto a su vez se correlaciona con la esteatohepatitis.

Por tanto, hay una necesidad de tratar la obesidad y trastornos relacionados con la obesidad, tales como NIDDM, síndrome metabólico o enfermedad de hígado graso no alcohólico.

Los fármacos adelgazantes que se utilizan actualmente para el tratamiento de la obesidad presentan una eficacia limitada y unos efectos secundarios significativos. Los estudios de los medicamentos adelgazantes orlistat (Davidson MH. *et al.* 1999), dexfenfluramina (Guy-Grand, B. *et al.* 1989), sibutramina (Bray, G. A. *et al.* 1999) y fentermina (Douglas, A. *et al.* 1983) han demostrado una pérdida de peso de aproximadamente 5%-10% del peso corporal para el fármaco en comparación con el placebo. Sin embargo, los efectos secundarios de estos fármacos limitan su utilización. Por ejemplo, la dexfenfluramina se retiró del mercado debido a las sospechas de valvulopatía cardíaca; el orlistat está limitado por efectos secundarios gastrointestinales; la utilización de topiramato está limitada por efectos del sistema nervioso central; y la utilización de sibutramina está limitada por sus efectos secundarios cardiovasculares que han conducido a informes de muertes y su retirada del mercado en Italia.

Recientes estudios sugieren que los antagonistas del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1) pueden ser útiles para el tratamiento de la obesidad y los trastornos relacionados con la obesidad. Por ejemplo, la publicación de patente internacional WO2005/046689 da a conocer antagonistas de CB1 derivados de pirazol para el tratamiento o la prevención de la obesidad y trastornos relacionados con la obesidad. Más específicamente, el rimonabant (SR 141716), que es un antagonista del receptor CB1 cannabinoide selectivo, se ha sometido a exhaustivas pruebas en el tratamiento de la obesidad. En 4 estudios clínicos con más de 6.000 pacientes obesos y con sobrepeso (programa rimonabant en obesidad (RIO)), el rimonabant ha demostrado una eficacia constante con respecto a la pérdida de peso y la reducción de los riesgos cardiometabólicos asociados (Van Gaal LF. *et al.* 2005; Després JP. *et al.* 2005; Pi-Sunyer FX. *et al.* 2006).

Por el contrario, los únicos estudios disponibles sobre ese tema, realizados con antagonistas del receptor cannabinoide tipo 2 (CB2) descartaron que puedan mostrar un efecto beneficioso sobre la obesidad y los trastornos relacionados con la obesidad basándose en su ausencia de efectos sobre la ingesta de alimento o actividad locomotora (Wiley JL *et al.* 2005; Williams CM. *et al.* 2002).

La solicitud de patente internacional WO 98/31227 describió previamente derivados de pirazol que se dice que son moduladores (antagonistas o agonistas) del receptor CB2. Se sugería que los moduladores dados a conocer eran útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias mediadas inmunológicamente, incluyendo la diabetes. Sin embargo, no se especificaba si un antagonista o agonista del receptor CB2 debía utilizarse para el tratamiento y la aplicación propuesta era únicamente especulativa.

La solicitud de patente internacional WO 2006/105217 sugería además que se espera que los inhibidores del receptor CB2 presenten utilidad terapéutica en el control de la diabetes, ictus cerebral e isquemia cerebral. Sin embargo, estas aplicaciones terapéuticas eran también únicamente especulativas.

La presente solicitud demuestra formalmente que el receptor CB2 ejerce un papel principal en el desarrollo de la obesidad, la resistencia a la insulina, la inflamación y la esteatosis hepática. Por tanto, se proporciona una nueva ruta para el tratamiento y/o la prevención de la obesidad y trastornos relacionados con la obesidad que implica interferir con la actividad y/o expresión del receptor CB2.

### Sumario de la invención

La invención se refiere a la utilización de un inhibidor selectivo de la actividad y/o expresión del receptor CB2 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de un trastorno relacionado con la obesidad que es la resistencia a la insulina.

En un aspecto, la invención utiliza un inhibidor selectivo de la expresión del receptor CB2 seleccionado de entre el grupo constituido por moléculas de ADN o ARN antisentido, ARN inhibidores pequeños (ARNip) y ribozimas.

En otro aspecto de la invención, el inhibidor antagoniza selectivamente la actividad del receptor CB2 (“antagonista del receptor CB2”).

Según las formas de realización preferidas, dicho antagonista del receptor CB2 se selecciona de entre el grupo constituido por moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos que bloquean el receptor CB2 parcial o completamente o fragmentos de anticuerpo y aptámeros.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

Una “secuencia codificante” o una secuencia “que codifica para” un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica para una secuencia de aminoácidos de ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia codificante para una proteína puede incluir un codón de iniciación (habitualmente ATG) y un codón de terminación.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las referencias a proteínas específicas (por ejemplo, el receptor CB2) pueden incluir un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos natural, así como variantes y formas modificadas independientemente de su origen o modo de preparación. Una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos natural es una proteína que presenta la misma secuencia de aminoácidos tal como se obtiene de la naturaleza (por ejemplo, el receptor CB2). Tales proteínas de secuencia natural pueden aislarse de la naturaleza o pueden prepararse utilizando procedimientos sintéticos y/o recombinantes convencionales. Las proteínas de secuencia natural comprenden específicamente las formas solubles o truncadas que se producen de manera natural, formas variantes que se producen de manera natural (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de manera alternatural), variantes alélicas que se producen de manera natural y formas que incluyen modificaciones postraduccionales. Una proteína de secuencia natural incluye proteínas tras modificaciones postraduccionales tales como glucosilación o fosforilación, u otras modificaciones de algunos residuos de aminoácido.

Las variantes se refieren a proteínas que son equivalentes funcionales a una proteína de secuencia natural que presentan secuencias de aminoácidos similares y conservan, en algún grado, una o más actividades de la proteína natural. Las variantes también incluyen fragmentos que conservan la actividad. Las variantes también incluyen proteínas que son sustancialmente idénticas (por ejemplo, que presentan el 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99% de identidad de secuencia) con una secuencia natural. Tales variantes incluyen proteínas que presentan alteraciones de aminoácidos tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones. Una “delección” se refiere a la ausencia de uno o más residuos de aminoácido en la proteína relacionada. El término “inserción” se refiere a la adición de uno o más aminoácidos en la proteína relacionada. Una “sustitución” se refiere al reemplazo de uno o más residuos de

aminoácido por otro residuo de aminoácido en el polipéptido. Normalmente, tales alteraciones son de naturaleza conservadora de manera que la actividad de la proteína variante es sustancialmente similar a una proteína de secuencia natural (véase, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company). En el caso de sustituciones, el aminoácido que reemplaza a otro aminoácido presenta habitualmente propiedades químicas y/o estructurales similares. Las inserciones y deleciones se encuentran normalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos, aunque dependiendo de la ubicación de la inserción, pueden insertarse o eliminarse más aminoácidos. Las variaciones pueden hacerse utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como mutagénesis dirigida al sitio (Carter, *et al.* 1985; *Nucl. Acids Res.* 13:4331; Zoller *et al.* 1982), mutagénesis de casete (Wells *et al.* 1985) y mutagénesis por PCR (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (2001)).

Dos secuencias de aminoácidos son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando más del 80%, preferentemente más del 85%, todavía preferentemente más del 90% de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 90%, preferentemente más del 95%, son similares (funcionalmente idénticos) a lo largo de las secuencias de longitud completa. Preferentemente, las secuencias similares u homólogas se identifican mediante alineación utilizando, por ejemplo, el programa de compilación GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, versión 7, Madison, Wisconsin), o cualquier algoritmo de comparación de secuencias tal como BLAST, FASTA, etc.

Un “receptor” o “molécula receptora” es una glucoproteína o proteína asociada/unida a la membrana o soluble que comprende uno o más dominios a los que se une un ligando para formar un complejo receptor-ligando. Mediante la unión del ligando, que puede ser un agonista o un antagonista, el receptor se activa o inactiva y puede iniciar o bloquear una ruta de señalización.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “inhibidor selectivo de la actividad y/o expresión del receptor CB2” hace referencia a un compuesto natural o sintético que actúa como inhibidor selectivo de la expresión del receptor CB2 y/o como inhibidor selectivo de la actividad del receptor CB2, es decir, como antagonista del receptor CB2.

La expresión “receptor CB2” presenta su significado general en la técnica (Pertwee, R. G. 1999) y se refiere al receptor cannabinoide tipo 2. La expresión puede incluir los receptores CB2 que se producen de manera natural y las variantes y las formas modificadas de los mismos. La expresión también puede referirse a proteínas de fusión en las que un dominio de CB2 que conserva por lo menos una actividad de CB2 se fusiona, por ejemplo, con otro polipéptido (por ejemplo, una etiqueta de polipéptido tal como etiqueta His que es convencional en la técnica). El receptor CB2 puede ser de cualquier fuente, pero normalmente es un CB2 de mamífero (por ejemplo, ser humano y primate no humano), particularmente un CB2 humano. Una secuencia de aminoácidos de CB2 natural ejemplificativa se proporciona en la base de datos GenPept con el número de registro NP\_001832 y una secuencia de nucleótidos de CB2 natural ejemplificativa se proporciona en la base de datos GenBank con el número de registro NM\_001841.

El término “expresión” cuando se utiliza en el contexto de expresión de un gen o ácido nucleico se refiere a la conversión de la información, contenida en un gen, en un producto génico. Un producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida por traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen ARN mensajeros que están modificados, mediante procesos tales como formación de caperuza, poliadenilación, metilación y edición, y proteínas (por ejemplo, receptor CB2) modificadas mediante, por ejemplo, metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación, ADP-ribosilación, miristilación y glucosilación.

Un “inhibidor de la expresión” se refiere a un compuesto natural o sintético que presenta un efecto biológico para inhibir o reducir significativamente la expresión de un gen. En consecuencia, un “inhibidor de la expresión del receptor CB2” se refiere a un compuesto natural o sintético que presenta un efecto biológico para inhibir o reducir significativamente la expresión del gen que codifica para el gen del receptor CB2.

Mediante “ligando” o “ligando de receptor” se hace referencia a un compuesto natural o sintético que se une a una molécula receptora para formar un complejo receptor-ligando. El término ligando incluye agonistas, antagonistas y compuestos con acción agonista/antagonista parcial.

Un “agonista de receptor” es un compuesto natural o sintético que se une al receptor para formar un complejo receptor-agonista activando dicho receptor y complejo receptor-agonista, respectivamente, iniciando una ruta de señalización y procesos biológicos adicionales. Los ejemplos de agonistas del receptor CB2 selectivos incluyen JWH133 o AM1241. Puede hacerse referencia también a DELTA-9-THC, WIN55212-2 y CP55.940 que son agonistas del receptor CB1/CB2 mixtos.

Mediante “antagonista de receptor” se hace referencia a un compuesto natural o sintético que presenta un efecto biológico opuesto al de un agonista de receptor. La expresión se utiliza indistintamente para indicar un antagonista “verdadero” y un agonista inverso de un receptor. Un antagonista de receptor “verdadero” es un compuesto que se

une al receptor y bloquea la activación biológica del receptor, y de ese modo la acción del agonista de receptor, por ejemplo, compitiendo con el agonista por dicho receptor. Un agonista inverso es un compuesto que se une al mismo receptor que el agonista pero ejerce el efecto opuesto. Los agonistas inversos presentan la capacidad de disminuir el nivel constitutivo de activación del receptor en ausencia de un agonista.

La expresión "antagonista del receptor CB2" se refiere a cualquiera antagonista del receptor CB2 (antagonista verdadero o agonista inverso) que se conoce actualmente en la técnica o que se identificará en el futuro, e incluye cualquier entidad química que, tras su administración a un paciente, da como resultado la inhibición o regulación por disminución de una actividad biológica asociada con la activación del receptor CB2 en el paciente, incluyendo cualquiera de los efectos biológicos aguas abajo que resultan por lo demás de la unión al receptor CB2 de su ligando natural. Tales antagonistas del receptor CB2 incluyen cualquier agente que puede bloquear la activación del receptor CB2 o cualquiera de los efectos biológicos aguas abajo de la activación del receptor CB2. Por ejemplo, un antagonista del receptor CB2 de este tipo puede actuar ocupando el sitio de unión del ligando o una parte del mismo del receptor CB2, haciendo de ese modo que el receptor sea inaccesible a su ligando natural de modo que su actividad biológica normal se impide o se reduce.

En el contexto de la presente invención, los antagonistas del receptor CB2 son selectivos para el receptor CB2 en comparación con el receptor CB1. Mediante "selectivo" se hace referencia a que la afinidad del antagonista por el receptor CB2 es por lo menos 10 veces, preferentemente 25 veces, más preferentemente 100 veces, todavía preferentemente 300 veces superior a la afinidad por el receptor CB1.

La afinidad de un antagonista por el receptor CB1 (o CB2) puede cuantificarse midiendo la actividad del receptor CB1 (o CB2) en presencia de un intervalo de concentraciones de dicho antagonista con el fin de establecer una curva de dosis-respuesta. A partir de esa curva de dosis-respuesta, puede deducirse un valor de  $CI_{50}$  que representa la concentración de antagonista necesaria para inhibir el 50% de la respuesta de un agonista en una concentración definida, por ejemplo CP 55.940 a 3 nM o inferior. El valor de  $CI_{50}$  puede determinarse fácilmente por un experto en la materia ajustando los gráficos de dosis-respuesta con una ecuación de dosis-respuesta tal como se describe por De Lean *et al.* (1979). Los valores de  $CI_{50}$  pueden convertirse en constante de afinidad ( $K_i$ ) utilizando las suposiciones de Cheng y Prusoff (1973).

Por lo tanto, un antagonista del receptor CB2 es un compuesto para el que por lo menos una de las razones (i)  $K_i$  CB1:  $K_i$  CB2, y (ii)  $CI_{50}$  CB1:  $CI_{50}$  CB2, es superior a 10:1, preferentemente 25:1, más preferentemente 100:1, todavía preferentemente 300:1, tal como puede medirse utilizando uno de los siguientes ensayos.

La actividad antagonista de compuestos hacia los receptores CB1 y CB2 puede determinarse utilizando diversos procedimientos. Por ejemplo, es conocido que los agonistas del receptor CB1/CB2 (DELTA-9 -THC, WIN 55212-2 o CP 55.940) pueden inhibir la actividad adenilato ciclasa inducida por forskolina. Por tanto, la afinidad de un antagonista por el receptor CB1 y CB2 puede someterse a ensayo determinando la capacidad de dicho antagonista para bloquear el efecto de los agonistas del receptor CB1/CB2 en un ensayo de medición de AMPc.

En particular, se ha descrito un ensayo de medición de la acumulación de AMPc en Rinaldi-Carmona *et al.* (1998) en vista de Matsuda *et al.* (1990) y Rinaldi-Carmona *et al.* (1996). En resumen, se hacen crecer células CHO transformadas de manera estable con CB1 o CB2 hasta la confluencia, se lavan con PBS y se incuban durante 15 min. a 37°C en 1 ml de PBS (que contiene BSA libre de ácido al 0,25%, IBMX 0,1 mM, RO20-1724 0,2 mM) en ausencia o en presencia de CP 55.940 3 nM, o el antagonista que va a someterse a ensayo (por ejemplo,  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M), o CP 55.940 3 nM más el antagonista que va a someterse a ensayo (por ejemplo,  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M). Se añade forskolina (concentración final de 3  $\mu$ M) y se incuban las células durante otros 20 min. a 37°C. Se termina la reacción mediante aspiración rápida del medio de ensayo y adición de 1,5 ml de Tris-HCl 50 mM enfriado con hielo, pH 8, ácido etilendiaminotetraacético 4 mM. Se colocan las placas en hielo durante 5 min. y entonces se transfieren los extractos a un tubo de vidrio. Se someten a ebullición los extractos y se centrifugan durante 10 min. a 3.500 g para eliminar los residuos celulares. Se secan alícuotas de sobrenadante y se determina la concentración de AMPc según cualquier procedimiento adecuado. El experto en la materia puede utilizar en particular uno de los muchos kits comerciales disponibles para la medición del AMPc. La actividad basal se determina en ausencia de forskolina.

Alternaturalmente, pueden utilizarse ensayos de unión. En particular, pueden llevarse a cabo ensayos de unión con agonista de CB1/CB2 tritado en membranas preparadas a partir de membranas de prosencéfalo de rata (CB1) o membranas preparadas a partir de bazo de ratón congelado (CB2). Puede hacerse referencia por ejemplo al ensayo descrito en la memoria de patente US2006030563.

En resumen, las membranas para los estudios de unión de los receptores CB1 y CB2 pueden prepararse tal como se describe en Dodd *et al.* (1981). Los ensayos de unión de CB1 y CB2 se realizan de la misma manera, según el siguiente procedimiento de protocolo adaptado de Devane *et al.* (1988) y Charalambous *et al.* (1992) con los siguientes cambios. Se descongelan en hielo las membranas, congeladas a -80°C. Se añaden tres volúmenes de TME (tampón Tris-HCl 25 mM,  $MgCl_2$  5 mM y EDTA 1 mM) a pH 7,4. Se incuba la suspensión a 4°C durante 30 min. Al final de la incubación, se sedimentan las membranas y se lavan tres veces con TME.

Las membranas tratadas se utilizan posteriormente en el ensayo de unión: se incuban aproximadamente 30 µg de membranas en una placa de microtitulación de 96 pocillos silanizada con TME que contiene albúmina sérica bovina (BSA) esencialmente libre de ácidos grasos al 0,1%, [<sup>3</sup>H] CP-55.940 0,8 nM y diversas concentraciones de antagonista a 30°C durante 1 hora. Se filtran las muestras, por ejemplo utilizando placas filtrantes Packard Filtermate 196 y Whatman GF/C, y se lavan con tampón de lavado (TME que contiene BSA al 0,5%). Se detecta la radiactividad según cualquier procedimiento adecuado. Se evalúa la unión no específica utilizando CP-55.940 100 nM. Los datos recogidos se normalizan entre el 100% y el 0% de unión específica para [<sup>3</sup>H] CP-55.940, determinada utilizando tampón y CP-55.940 100 nM. Se analizan los datos normalizados utilizando una ecuación logística no lineal de 4 parámetros para proporcionar valores de CI<sub>50</sub> que se convierten en valores de K<sub>i</sub> utilizando las suposiciones de Cheng y Prusoff (1973).

La expresión “molécula orgánica pequeña” se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas utilizadas generalmente en productos farmacéuticos. La expresión excluye las macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas oscilan en tamaño hasta aproximadamente 5.000 Da, más preferentemente hasta 2.000 Da y lo más preferentemente hasta aproximadamente 1.000 Da.

Mediante “purificado” y “aislado” se hace referencia, cuando se hace referencia a un polipéptido o una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término “purificado” tal como se utiliza en la presente memoria significa preferentemente que están presentes por lo menos 75% en peso, más preferentemente por lo menos 85% en peso, todavía preferentemente por lo menos 95% en peso y todavía más preferentemente aún por lo menos 98% en peso de las macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una molécula de ácido nucleico “aislada” que codifica para un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican para el polipéptido objeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan de manera perjudicial a las características básicas de la composición.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sujeto” indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferentemente, un sujeto según la invención es un ser humano.

El término “obesidad” se refiere a un estado caracterizado por un exceso de grasa corporal. La definición funcional de la obesidad se basa en el índice de masa corporal (IMC), que se calcula como el peso corporal por altura en metros al cuadrado (kg/m<sup>2</sup>). La obesidad se refiere a un estado en el cual un sujeto por lo demás sano presenta un IMC superior o igual a 30 kg/m<sup>2</sup>, o un estado en el cual un sujeto con por lo menos una comorbidez presenta un IMC superior o igual a 27 kg/m<sup>2</sup>. Un “sujeto obeso” es un sujeto por lo demás sano con un IMC superior o igual a 30 kg/m<sup>2</sup> o un sujeto con por lo menos una comorbidez con un IMC superior o igual a 27 kg/m<sup>2</sup>. Un “sujeto en riesgo de obesidad” es un sujeto por lo demás sano con un IMC de 25 kg/m<sup>2</sup> a menos de 30 kg/m<sup>2</sup> o un sujeto con por lo menos una comorbidez con un IMC de 25 kg/m<sup>2</sup> a menos de 27 kg/m<sup>2</sup>. El aumento de los riesgos asociados con la obesidad puede producirse a un IMC inferior en personas con ascendencia asiática. En los países asiáticos y de la región Asia-Pacífico, incluyendo Japón, “obesidad” se refiere a un estado en el cual un sujeto con por lo menos una comorbidez relacionada con la obesidad o inducida por la obesidad que requiere reducción del peso o que se mejoraría mediante la reducción del peso, presenta un IMC superior o igual a 25 kg/m<sup>2</sup>. Un “sujeto obeso” en estos países se refiere a un sujeto con por lo menos una comorbidez relacionada con la obesidad o inducida por la obesidad que requiere reducción del peso o que se mejoraría mediante la reducción del peso, con un IMC superior o igual a 25 kg/m<sup>2</sup>. En estos países, un “sujeto en riesgo de obesidad” es una persona con un IMC de más de 23 kg/m<sup>2</sup> a menos de 25 kg/m<sup>2</sup>.

La expresión “trastornos relacionados con la obesidad” comprende los trastornos que están asociados con, provocados por o que resultan de la obesidad. Los ejemplos de trastornos relacionados con la obesidad incluyen sobrealimentación y bulimia, diabetes, hipertensión, concentraciones de insulina plasmática elevadas y resistencia a la insulina, dislipidemia, hiperlipidemia, cáncer de mama, de próstata, de endometrio y de colon, cardiopatía, trastornos cardiovasculares, ritmos cardíacos anómalos y arritmias, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiopatía coronaria, angina de pecho, infarto cerebral, trombosis cerebral y ataque isquémico transitorio. Otros ejemplos incluyen los estados patológicos que muestran actividad metabólica reducida o una disminución en el gasto de energía en reposo como porcentaje de masa libre de grasa total. Los ejemplos adicionales de trastornos relacionados con la obesidad incluyen síndrome metabólico, también conocido como síndrome X, síndrome de resistencia a la insulina, diabetes tipo II, glucosa en ayunas alterada, tolerancia a la glucosa alterada, inflamación, tal como inflamación sistémica de la vasculatura, aterosclerosis, hipercolesterolemia, hiperuricemia, así como desenlaces secundarios de la obesidad tales como hipertrofia ventricular izquierda. Los trastornos relacionados con la obesidad también incluyen las anomalías hepáticas asociadas con la obesidad tales como esteatosis o enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), una causa creciente de cirrosis asociada a obesidad y síndrome metabólico. De hecho, NAFLD puede presentarse como esteatosis simple o evolucionar hacia inflamación y esteatohepatitis (NASH), con un 20% de riesgo de cirrosis tras 20 años. La “dislipidemia” es un factor de riesgo principal para cardiopatía coronaria (CHD). Niveles plasmáticos bajos de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) con niveles o bien normales o bien elevados de colesterol de baja densidad (LDL) es un factor de

riesgo significativo para desarrollar aterosclerosis y arteriopatía coronaria asociada en seres humanos. La dislipidemia está asociada a menudo con la obesidad.

5 La expresión "síndrome metabólico", o síndrome X, tal como se utiliza en la presente memoria, está presente si una persona presenta tres o más de los siguientes síntomas: obesidad abdominal, hipergliceridemia, colesterol de HDL bajo, tensión arterial alta y glucosa plasmática en ayunas alta. Los criterios para estos síntomas se definen en el tercer Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel in Detection, Evaluation and Treatment of High blood Cholesterol in Adults (Ford, ES. *et al.* 2002).

10 La expresión "diabetes tipo II" o "diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM)" presenta su significado general en la técnica. Se produce a menudo diabetes tipo II cuando los niveles de insulina son normales o incluso están elevados y parece que resulta de la incapacidad de los tejidos para responder apropiadamente a la insulina. La mayoría de los diabéticos tipo II son obesos.

15 El término "NAFLD" se refiere a enfermedad de hígado graso no alcohólico. El NAFLD es un trastorno con características histológicas de enfermedad hepática inducida por alcohol que se produce en personas que no consumen cantidades significativas de alcohol. NAFLD puede presentarse como esteatosis simple (definida como acumulación de grasa en el hígado) o evolucionar hacia inflamación y esteatohepatitis (NASH), con un 20% de riesgo de cirrosis tras 20 años. El término "NASH" se refiere a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). NASH es una enfermedad progresiva del hígado de etiología desconocida caracterizada histológicamente por inflamación y daño de hepatocitos que se asemeja a hepatitis alcohólica. NASH es un estadio crítico en el proceso debido al riesgo de progresión a fibrosis, cirrosis e insuficiencia hepática. La hiperglucemia con y sin evidencia de hiperlipidemia, obesidad y diabetes tipo 2 están asociadas comúnmente con NAFLD y son un estado de predisposición. Informes más recientes han sugerido que NAFLD puede ser más común de lo que se sospechaba originalmente y que puede afectar a individuos que carecen de los factores de riesgo típicos para este trastorno. Puesto que la prevalencia de la obesidad y diabetes tipo 2 está aumentando, se espera que la prevalencia de NAFLD también aumente y por tanto esta enfermedad se ha convertido en un problema público emergente (Reid AE. 2001).

30 Pueden seleccionarse en particular trastornos relacionados con la obesidad del grupo que consiste en dislipidemia, diabetes mellitus no insulino dependiente, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, cardiopatía coronaria, aterosclerosis y enfermedad de hígado graso no alcohólico.

35 Preferentemente, la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad no es de origen genético. En particular, se contempla preferentemente resistencia a la insulina relacionada con la obesidad inducida por sobrealimentación, dieta con alto contenido en grasa y/o dieta hiperglucémica.

40 En su significado más amplio, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso de o prevenir el trastorno o estado para el que se aplica tal término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o estado.

45 En particular, "tratamiento" de la obesidad y trastornos relacionados con la obesidad puede referirse a la administración de los compuestos o combinaciones de la presente invención para reducir o mantener el peso corporal de un sujeto obeso. Un desenlace del tratamiento puede consistir en reducir el peso corporal de un sujeto obeso en relación con el peso corporal de ese sujeto inmediatamente antes de la administración de los compuestos de la presente invención. Otro desenlace del tratamiento puede ser prevenir la recuperación de peso corporal del peso corporal previamente perdido como resultado de la dieta, el ejercicio o la farmacoterapia. Otro desenlace del tratamiento puede consistir en reducir la aparición y/o la gravedad de enfermedades relacionadas con la obesidad. Otro desenlace del tratamiento puede consistir en mantener la pérdida de peso.

50 En particular, "prevención" de la obesidad y trastornos relacionados con la obesidad puede referirse a la administración de los compuestos de la presente invención para reducir o mantener el peso corporal de un sujeto en riesgo de obesidad. Un desenlace de la prevención puede ser reducir el peso corporal de un sujeto en riesgo de obesidad en relación con el peso corporal de ese sujeto inmediatamente antes de la administración de los compuestos de la presente invención. Otro desenlace de la prevención puede ser prevenir la recuperación de peso corporal del peso corporal previamente perdido como resultado de la dieta, el ejercicio o la farmacoterapia. Otro desenlace de la prevención puede ser prevenir que se produzca obesidad si el tratamiento se administra antes de la aparición de la obesidad en un sujeto en riesgo de obesidad. Otro desenlace de la prevención puede ser reducir la aparición y/o la gravedad de trastornos relacionados con la obesidad si el tratamiento se administra antes de la aparición de la obesidad en un sujeto en riesgo de obesidad. Otro desenlace de la prevención puede ser prolongar la resistencia al aumento de peso. Otro desenlace de la prevención puede ser prevenir la recuperación del peso. Además, si se inicia el tratamiento se comienza en sujetos ya obesos, tal tratamiento puede prevenir la aparición, progresión o gravedad de trastornos relacionados con la obesidad.

65 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra no deseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un

ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un adyuvante de formulación, material de encapsulación, diluyente o carga líquido, semisólido o sólido no tóxico de cualquier tipo.

### Usos y métodos terapéuticos

5 La presente invención proporciona procedimientos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para tratar un trastorno relacionado con la obesidad que es la resistencia a la insulina.

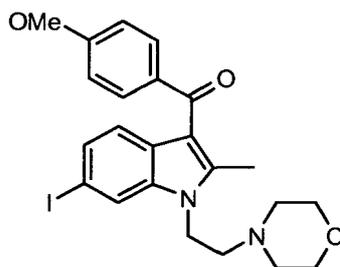
10 Por tanto, un objeto de la invención es un inhibidor selectivo de la actividad y/o expresión del receptor CB2 para su utilización para tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con la obesidad, en el que dicho trastorno relacionado con la obesidad es resistencia a la insulina.

15 Según un primer aspecto, la invención se refiere a la utilización de un inhibidor selectivo de la actividad del receptor CB2 (denominado a continuación en la presente memoria "antagonista del receptor CB2").

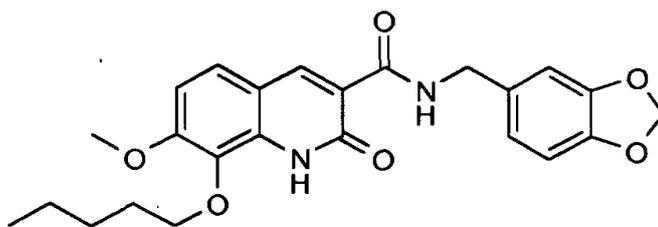
En una forma de realización, el antagonista del receptor CB2 puede ser un antagonista de bajo peso molecular, por ejemplo una molécula orgánica pequeña.

20 Los antagonistas del receptor CB2 orgánicos pequeños que pueden utilizarse por la invención comprenden de manera no limitativa los revisados en Barth F *et al.* (1999).

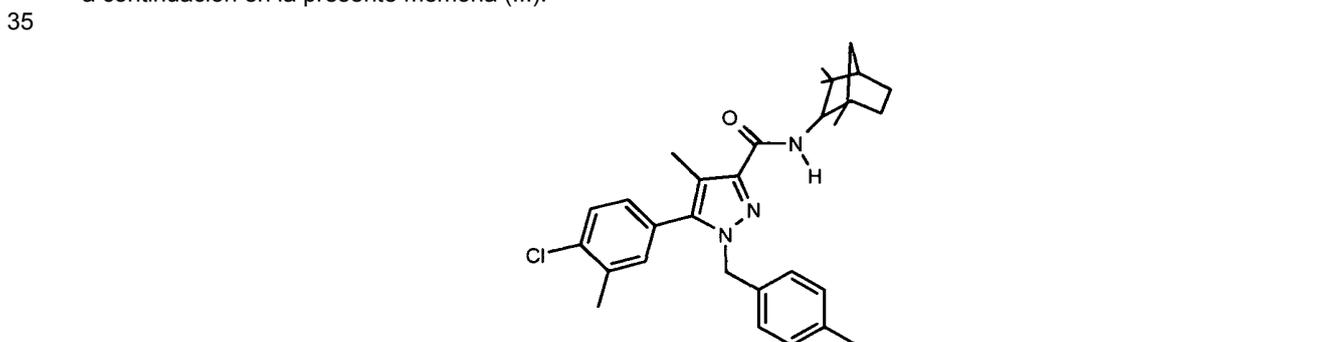
Un ejemplo específico de antagonista del receptor CB2 orgánico pequeño que puede utilizarse según la presente invención es AM630 que se describió por Hosohata Y *et al.* (1997) y presenta la estructura de fórmula (I):



25 Otro ejemplo específico de antagonista del receptor CB2 orgánico pequeño que puede utilizarse según la presente invención es JTE-907 que se describió por Iwamura *et al.* (2001) y presenta la estructura de fórmula (II):

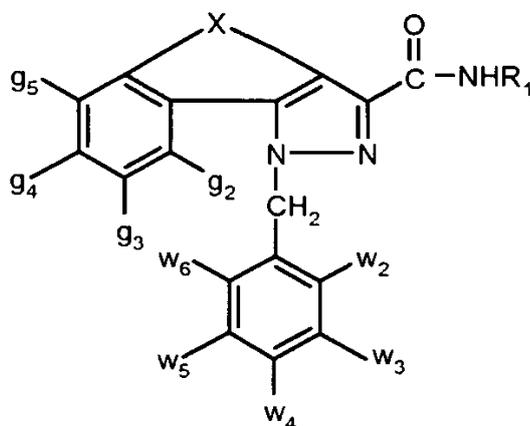


30 Un compuesto adicional que presenta una estructura de pirazol con afinidad y selectividad hacia receptores CB2 es el compuesto conocido con la abreviatura SR144528 (M. Rinaldi-Carmona *et al.*, 1998), cuya estructura se presenta a continuación en la presente memoria (III):

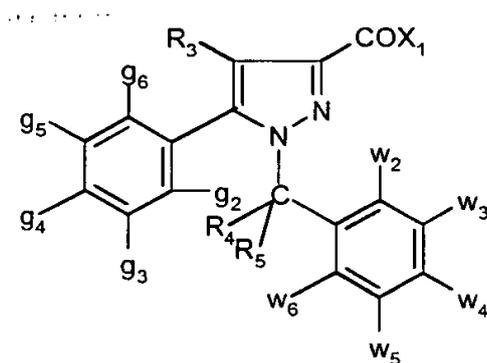


La publicación de patente internacional WO01/32629 también describe antagonistas del receptor CB2, su preparación y composiciones farmacéuticas que los contienen. Esos compuestos se incluyen en la presente

memoria como referencia. Estos compuestos que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención son derivados tricíclicos de ácido 1-bencilpirazol-3-carboxílico y presentan la estructura de fórmula general (IV):



- 5 en la que:
- X- representa un grupo  $-(CH_2)_n-$ ;
- 10 n es igual a 1 ó 2;
- $g_2, g_3, g_4, g_5, w_2, w_3, w_4, w_5, w_6$  son idénticos o diferentes y representan cada uno independientemente hidrógeno, un átomo de halógeno, un trifluorometilo, un alquilo (C1-C4), un alcoxilo (C1-C4), un alquiltio (C1-C4), un nitro; y
- 15  $R_1$  representa un radical carbocíclico C3-C15 no aromático que está no sustituido o sustituido una o varias veces con un alquilo (C1-C4),
- o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 20 Otros ejemplos específicos de antagonistas del receptor CB2 incluyen los descritos en la publicación de patente internacional WO 97/21682, y que se incluyen en la presente memoria como referencia. Éstos presentan la fórmula (V):



- 25 en la que:
- $X_1$  es un grupo  $-NR_1 R_2$  o un grupo  $-OR_2$ ;
- 30  $g_2, g_3, g_4, g_5, g_6$  y  $w_2, w_3, w_4, w_5, w_6$  son idénticos o diferentes y son cada uno independientemente hidrógeno, un átomo de halógeno, un alquilo (C1-C4), un alcoxilo (C1-C4), un trifluorometilo, un nitro o un alquiltio (C1-C4), con la condición de que por lo menos uno de los sustituyentes  $g_2, g_3, g_4, g_5, g_6$  y por lo menos uno de los sustituyentes  $w_2, w_3, w_4, w_5, w_6$  son distintos de hidrógeno;
- 35  $R_1$  es hidrógeno o un alquilo (C1-C4);
- $R_2$  es un radical carbocíclico (C3-C15) no aromático que está no sustituido o monosustituido o polisustituido con un sustituyente seleccionado de un átomo de halógeno, un alquilo (C1-C4) y un alcoxilo (C1-C4);

R<sub>3</sub> es hidrógeno o un grupo -CH<sub>2</sub>R<sub>6</sub>;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo (C1-C4) o un trifluorometilo;

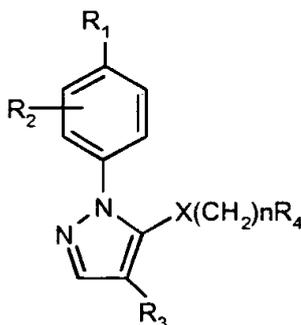
5 o si no R<sub>4</sub> es hidrógeno y R<sub>5</sub> y w<sub>6</sub> juntos constituyen un radical etileno o trimetileno; y

R<sub>6</sub> es hidrógeno, o cuando los sustituyentes g<sub>2</sub>, g<sub>3</sub>, g<sub>4</sub>, g<sub>5</sub> y/o g<sub>6</sub> son distintos de alquilo (C1-C4), R<sub>6</sub> es hidrógeno, un alquilo (C1-C4), un flúor, un hidroxilo, un alcoxilo (C1-C5), un alquiltio (C1-C5), un hidroxialcoxilo (C1-C5), un ciano, un alquilsulfinilo (C1-C5) o un alquilsulfonilo (C1-C5);

10 y sus sales.

También se han descrito antagonistas del receptor CB2 en la publicación de patente internacional WO 98/31227. Por lo tanto, también pueden utilizarse compuestos de fórmula (VI):

15



en la que:

20 R<sub>1</sub> es OCH<sub>3</sub>, Br, isopropilo o Ar;

R<sub>2</sub> es H, OH, alcoxilo (C1-C5), alquilo (C1-C5), N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, Br, F, I, Cl, CF<sub>3</sub> o X(C(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>)OR<sub>5</sub>;

25 R<sub>3</sub> es hidrógeno, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>XR<sub>5</sub>, C(O)R<sub>5</sub>, CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub>, CON(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, oxazolinilo, oxazolilo, tiazolilo, pirazolilo, triazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, imidazolinilo, tiazolinilo, isoxazolilo, oxadiazolilo o tiadiazolilo,

estando cada uno de estos anillos heterocíclicos no sustituido o sustituido con uno o dos grupos alquilo (C1-C3) o fluoroalquilo;

30 R<sub>4</sub> es morfolinilo, piperazinilo o piperidinilo, estando cada resto no sustituido o sustituido con uno o dos grupos alquilo (C1-C5), OH, NO<sub>2</sub> o N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>;

R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo (C1-C8);

35 X es O o NR<sub>5</sub>;

Ar es fenilo, antraceno, naftilo, indolilo, piridinilo, tiofenilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, imidazolilo, oxadiazolilo, pirrolilo o pirimidinilo; estando cada resto no sustituido o sustituido con uno o más grupos Z;

40 Z es H, OH, CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub>, alcoxilo (C1-C10), alquilo (C1-C5), N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, Br, F, I, Cl, CF<sub>3</sub> o X(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR<sub>5</sub>; y

n es de 1 a 6;

y sus sales farmacéuticamente aceptables;

45

siempre que cuando n es 1, R<sub>5</sub> no es hidrógeno en X(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR<sub>5</sub>.

Puede preferirse que cuando el antagonista del receptor CB2 presenta la fórmula (VI), entonces dicho trastorno relacionado con la obesidad no es una enfermedad inflamatoria mediada inmunológicamente, en particular no es diabetes, específicamente no diabetes tipo I.

50

En otra forma de realización, el antagonista del receptor CB2 puede consistir en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede bloquear parcial o completamente la activación de CB2 (es decir, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que bloquea el receptor CB2 parcial o completamente).

55

En particular, el antagonista del receptor CB2 puede consistir en un anticuerpo dirigido contra el receptor CB2, de tal manera que dicho anticuerpo altera la unión de un ligando de CB2 a dicho receptor.

Pueden generarse anticuerpos dirigidos contra el receptor CB2 según procedimientos conocidos administrando el epítipo o antígeno apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Pueden utilizarse diversos adyuvantes conocidos en la técnica para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la puesta en práctica de la invención pueden ser policlonales, resultan preferidos los anticuerpos monoclonales. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales contra el receptor CB2 o ligandos de receptores CB2 y aislarse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y aislamiento comprenden de manera no limitativa la técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de células B humanas (Cote *et al.*, 1983); y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.* 1985). Alternativamente, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, por ejemplo, la patente US n.º 4.946.778) para producir anticuerpos de cadena sencilla anti-CB2 o anti-ligandos de CB2. Los antagonistas del receptor CB2 útiles en la puesta en práctica de la presente invención también incluyen fragmentos de anticuerpo anti-CB2 o anti-ligandos de CB2 incluyendo, pero sin limitarse a, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que pueden generarse mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, puede construirse bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir una rápida identificación de fragmentos que presentan la especificidad deseada para el receptor CB2.

También pueden prepararse anticuerpos humanizados anti-CB2 o anti-ligandos de CB2 y fragmentos de anticuerpo de los mismos según técnicas conocidas. "Anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, de roedor) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se sustituyen residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que presenta la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se sustituyen residuos de la región de entramado (FR) de la inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Se describen procedimientos para preparar anticuerpos humanizados, por ejemplo, por Winter (patente US n.º 5.225.539) y Boss (Celltech, patente US n.º 4.816.397).

Todavía En otra forma de realización, pueden utilizarse aptámeros.

Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en cuanto al reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas u oligopeptídicas con la capacidad para reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden aislarse mediante evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias al azar, tal como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias al azar puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una única secuencia. Se han revisado posibles modificaciones, utilidades y ventajas de esta clase de moléculas en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente limitada presentada por una proteína de plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli* que se seleccionan de bibliotecas combinatorias mediante dos procedimientos híbridos (Colas *et al.*, 1996).

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de un inhibidor selectivo de la expresión del receptor CB2 seleccionado de entre el grupo constituido por moléculas de ADN o ARN antisentido, ARN inhibidores pequeños (ARNip) y ribozimas.

Por tanto, la invención proporciona un inhibidor selectivo de la expresión del receptor CB2 de este tipo para su utilización para tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con la obesidad que es resistencia a la insulina.

Al mostrar las secuencias de receptor CB1 y CB2 poca identidad de secuencia, los inhibidores de expresión del receptor CB2 que pueden utilizarse según la invención proporcionan ventajosamente una inhibición selectiva de la expresión del receptor CB2, en comparación con la expresión del receptor CB1.

Los inhibidores de la expresión del receptor CB2 para su utilización en la presente invención pueden basarse en constructos oligonucleotídicos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, incluyendo moléculas de ARN

antisentido y moléculas de ADN antisentido, actuarán bloqueando directamente la traducción de ARNm del receptor CB2 uniéndose al mismo e impidiendo así la traducción de proteínas o aumentando la degradación de ARNm, disminuyendo así el nivel de receptores CB2, y por tanto la actividad, en una célula. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos antisentido de por lo menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia de transcrito de ARNm que codifica para el receptor CB2, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales y administrarse por ejemplo, mediante infusión o inyección intravenosa. En la técnica se conocen bien procedimientos para utilizar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo, véanse las patentes US n<sup>os</sup> 6.566.135; 6.566.131; 6365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321 y 5.981.732).

Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión del receptor CB2 para su utilización en la presente invención. La expresión del receptor CB2 puede reducirse poniendo en contacto un sujeto o célula con un ARN bicatenario pequeño (ARNbc), o un vector o constructo que provoca la producción de un ARN bicatenario pequeño, de tal manera que se inhibe específicamente la expresión del receptor CB2 (es decir, interferencia por ARN o iARN). En la técnica se conocen bien procedimientos para seleccionar un ARNbc o vector que codifica para ARNbc apropiado para genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo véanse Tuschl, T. *et al.* (1999); Elbashir, S. M. *et al.* (2001); Hannon, G.J. (2002); McManus, MT. *et al.* (2002); Brummelkamp, TR. *et al.* (2002); patentes US n<sup>os</sup> 6.573.099 y 6.506.559; y las publicaciones de patente internacionales n<sup>os</sup> WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836).

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión del receptor CB2 para su utilización en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas que pueden catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción de la ribozima implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con ARN diana complementario, seguido por escisión endonucleolítica. Por tanto, moléculas de ribozima con motivo en horquilla o cabeza de martillo diseñadas mediante ingeniería genética que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de secuencias de ARNm del receptor CB2 son útiles dentro del alcance de la presente invención. Los sitios de escisión de ribozima específicos dentro de cualquier posible diana de ARN se identifican inicialmente explorando la molécula diana para detectar sitios de escisión de ribozima, que incluyen normalmente las secuencias siguientes, GUA, GUU y GUC. Una vez identificado, pueden evaluarse secuencias de ARN cortas de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión para determinar características estructurales predichas, tales como estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia oligonucleotídica no sea adecuada. También puede evaluarse la idoneidad de dianas candidatas sometiendo a prueba su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, utilizando, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasas.

Tanto oligonucleótidos antisentido como ribozimas útiles como inhibidores de expresión del receptor CB2 pueden prepararse mediante procedimientos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química tales como, por ejemplo, mediante síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, pueden generarse moléculas de ARN antisentido mediante transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican para la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN pueden incorporarse en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa de T7 o SP6. Pueden introducirse diversas modificaciones a los oligonucleótidos de la invención como medios para aumentar la semivida y estabilidad intracelular. Las posibles modificaciones comprenden de manera no limitativa la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o la utilización de fosforotioato o 2'-O-metilo en vez de enlaces de fosfodiéster dentro de la estructura principal de oligonucleótido.

Pueden administrarse ribozimas y ARNip de oligonucleótidos antisentido de la invención *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo que puede facilitar la transferencia del ARNip de oligonucleótido antisentido o ácido nucleico de ribozima a las células y preferentemente células que expresan el receptor CB2. Preferentemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con degradación reducida con respecto al grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención comprenden de manera no limitativa plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante inserción o incorporación del ARNip de oligonucleótido antisentido o secuencias de ácido nucleico de ribozima. Los vectores virales son un tipo preferido de vector y comprenden de manera no limitativa secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tales como virus de leucemia murina de Moloney, virus de sarcoma murino de Harvey, virus de tumor mamario murino y virus de sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociado; virus de tipo SV40; poliomavirus; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vaccinia; poliovirus; y virus de ARN tales como un retrovirus. Pueden utilizarse fácilmente otros vectores no mencionados pero conocidos en la técnica.

Los vectores virales preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que se han sustituido genes no esenciales por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo vital implica la transcripción inversa de ARN viral genómico para proporcionar ADN con la posterior integración proviral en el ADN celular del huésped. Se han aprobado retrovirus para ensayos de terapia génica en seres humanos. Los más útiles son los retrovirus que son de replicación deficiente (es decir, que pueden dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero que no pueden fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retroviral

genéticamente alterados presentan utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Se proporcionan protocolos convencionales para producir retrovirus de replicación deficiente (que incluyen las etapas de incorporar material genético exógeno en un plásmido, transfectar una línea celular de empaquetamiento con el plásmido, producir retrovirus recombinantes mediante la línea celular de empaquetamiento, recoger partículas virales de medios de cultivo tisular e infectar las células diana con partículas virales) en Kriegler, 1990 y en Murry, 1991.

Los virus preferidos para determinadas aplicaciones son los adenovirus y virus adenoasociados, que son virus de ADN bicatenario que ya se han aprobado para su utilización en seres humanos en terapia génica. El virus adenoasociado puede modificarse mediante ingeniería genética para que sea de replicación deficiente y puede infectar una amplia gama de tipos de células y especies. Además presenta ventajas tales como estabilidad frente al calor y disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas; y falta de inhibición de superinfección permitiendo así múltiples series de transducciones. Es conocido que los virus adenoasociados pueden integrarse en ADN celular humano de una manera específica del sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis por inserción y la variabilidad de expresión del gen insertado característica de la infección retroviral. Además, se ha realizado un seguimiento de infecciones por virus adenoasociados de tipo natural en cultivo tisular durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un acontecimiento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de una manera extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores de plásmido. Se han descrito ampliamente en la técnica vectores de plásmido y resultan conocidos para los expertos en la materia. Véase por ejemplo Sambrook *et al.*, 1989. En los últimos años, se han utilizado vectores de plásmido como vacunas de ADN para administrar genes que codifican para antígenos a células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto porque no presentan las mismas preocupaciones de seguridad que con muchos de los vectores virales. Sin embargo, estos plásmidos, que presentan un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido a partir de un gen operativamente codificado dentro del plásmido. Algunos plásmidos comúnmente utilizados incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Los expertos en la materia también conocen otros plásmidos. Adicionalmente, pueden diseñarse plásmidos a medida utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligamiento para eliminar y añadir fragmentos de ADN específicos. Pueden administrarse plásmidos mediante una variedad de vías parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, puede inyectarse el plásmido de ADN mediante vías intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras. También puede administrarse mediante gotas o pulverizaciones intranasales, supositorio rectal y por vía oral. También puede administrarse en la epidermis o una superficie mucosa utilizando una pistola génica. Los plásmidos pueden administrarse en una disolución acuosa, secados sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN incluyendo de manera no limitativa, liposomas, dendrímeros, cocleato y microencapsulación.

El inhibidor selectivo de la actividad y/o expresión del receptor CB2 puede administrarse en forma de una composición farmacéutica, tal como se define a continuación.

Preferentemente, dicho inhibidor se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Mediante una "cantidad terapéuticamente eficaz" se hace referencia a una cantidad suficiente del antagonista del receptor CB2 o inhibidor de la expresión de CB2 para tratar y/o prevenir la obesidad y/o trastornos relacionados con la obesidad con una razón de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Debe apreciarse que la utilización diaria total de los compuestos y las composiciones de la presente invención la decidirá el médico encargado dentro del alcance del criterio médico sensato. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o de manera coincidente con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, resulta evidente para el experto en la materia comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variarse a lo largo de un amplio intervalo de desde 0,01 hasta 1.000 mg por adulto al día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que va a tratarse. Un medicamento contiene normalmente desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del principio activo, preferentemente desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra habitualmente a un nivel de dosificación de desde 0,0002 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 7 mg/kg de peso corporal al día.

Procedimientos de selección

Los inhibidores de la invención pueden identificarse adicionalmente mediante procedimientos de selección descritos en el estado de la técnica. Los procedimientos de selección de la invención pueden llevarse a cabo según procedimientos conocidos.

5 El procedimiento de selección puede medir la unión de un compuesto candidato al receptor, o a células o membranas que llevan el receptor, o una proteína de fusión del mismo mediante un marcador directa o indirectamente asociado con el compuesto candidato. Alternativamente, un procedimiento de selección puede implicar medir o detectar, cualitativa o cuantitativamente, la competición de unión de un compuesto candidato al receptor con un competidor marcado (por ejemplo, antagonista o agonista). Además, los procedimientos de selección pueden someter a prueba si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por un antagonista del receptor, utilizando sistemas de detección apropiados para células que llevan el receptor. Pueden someterse a ensayo antagonistas en presencia de un agonista conocido (por ejemplo, DELTA-9 -THC, WIN 55212-2 o CP 55940) y se observa un efecto sobre la activación por el agonista mediante la presencia del compuesto candidato. Además, los procedimientos de selección pueden comprender las etapas que consisten en mezclar un compuesto candidato con una disolución que comprende un CB2, para formar una mezcla, y medir la actividad en la mezcla, y comparar con una mezcla de control que no contiene compuesto candidato. La unión competitiva utilizando agonistas conocidos tales como DELTA-9 -THC, WIN 55212-2 o CP 55940 también es adecuada.

20 La actividad antagonista de los compuestos candidatos hacia al receptor CB2 puede determinarse por ejemplo utilizando diversos modelos. Por ejemplo, se conoce que los agonistas del receptor CB2 (DELTA-9 -THC, WIN 55212-2 o CP 55940) pueden inhibir la actividad adenilato ciclasa inducida por forskolina tal como se describe por M. Rinaldi-Carmona *et al* (1996). Por tanto, en este modelo puede someterse a prueba la capacidad de dicho compuesto candidato para bloquear el efecto de los agonistas del receptor CB2.

25 Composiciones farmacéuticas

Puede combinarse el antagonista del receptor CB2 o el inhibidor de la expresión del receptor CB2 con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

35 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, tal como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o disoluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

40 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

50 Las formas farmacéuticas adecuadas para su utilización inyectable incluyen dispersiones o disoluciones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o disoluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado de que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe protegerse de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

55 Pueden prepararse disoluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacéuticamente aceptables en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y utilización, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

60 El antagonista del receptor CB2 o inhibidor de la expresión del receptor CB2 de la invención puede formularse en una composición como forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. También pueden derivarse sales formadas con los grupos carboxilo libres de bases inorgánicas tales

como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El portador también puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante la utilización de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede provocarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, resultará preferido incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse mediante la utilización en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes mencionados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Tras la formulación, se administrarán disoluciones de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden utilizarse cápsulas de liberación de fármacos y similares.

Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y en primer lugar se hace que el diluyente líquido sea isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para su administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, medios acuosos estériles que pueden emplearse los conocerán los expertos en la materia a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, puede disolverse una dosificación en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y o bien añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclinis o bien inyectarse en el sitio propuesto de infusión. Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto que está tratándose. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

El antagonista del receptor CB2 o inhibidor de la expresión del receptor CB2 de la invención puede formularse dentro de una mezcla terapéutica que comprende de aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o de aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o de aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis aproximadamente. También pueden administrarse múltiples dosis.

Además de los compuestos de la invención formulados para su administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo comprimidos u otros sólidos para su administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma actualmente utilizada.

La invención se ilustrará con mayor detalle a partir de las figuras y ejemplos siguientes.

**Figuras:**

Figura 1: Peso corporal de ratones WT y CB2<sup>-/-</sup> alimentados con una dieta con alto contenido en grasa. Se alimentaron ratones de tipo natural (n=22) y ratones CB2<sup>-/-</sup> (n=10) o bien con alimento convencional o bien con dieta con alto contenido en grasa (HFD). Se midió el peso corporal semanalmente.

Figura 2: Ingesta de alimento promedio de ratones WT y CB2<sup>-/-</sup> a lo largo de 15 semanas de dieta con alto contenido en grasa (HFD).

Figura 3: Se cuantificó el tamaño de adipocitos en por lo menos 30 células de 3 campos separados en 7 animales WT y 5 animales CB2<sup>-/-</sup> alimentados con dieta con alto contenido en grasa, utilizando el software Image J. \* p<0,05 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup>.

Figura 4: Concentraciones de glucosa en sangre en ayunas en ratones WT (n=7) y CB2<sup>-/-</sup> (n=5) alimentados con una dieta con alto contenido en grasa. p=0,07 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup>.

- Figura 5: Concentraciones de insulina sérica en ayunas en ratones WT (n=7) y CB2<sup>-/-</sup> (n=5) alimentados con una dieta con alto contenido en grasa. p=0,06 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup>.
- 5 Figura 6: Niveles de leptina sérica en ratones WT (n=7) y CB2<sup>-/-</sup> (n=5) alimentados con una dieta con alto contenido en grasa. \* p<0,05 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup>.
- La figura 7 muestra los niveles de leptina sérica en ratones WT y CB2<sup>-/-</sup> con dieta control. \* p<0,05 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup>.
- 10 La figura 8 muestra los triglicéridos hepáticos medidos en ratones WT y CB2<sup>-/-</sup> alimentados con dieta control de dieta con alto contenido en grasa \* p<0,05 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup>.
- La figura 9 muestra la expresión hepática de ARNm de SREBP-1c en ratones WT (n=7) y CB2<sup>-/-</sup> (n=5) alimentados con una dieta con alto contenido en grasa. \* p<0,05 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup>.
- 15 Figura 10: Regulación diferencial de la expresión del ARNm de receptor CB1 y CB2 en tejido adiposo e hígado de ratones WT (n=7) y CB2<sup>-/-</sup> (n=5) con control y HFD durante 15 semanas. Los ratones CB2<sup>-/-</sup> no expresan el gen de CB2, pero presentan una expresión génica de CB1 normal. Se identificó una banda de pb correspondiente al tamaño esperado del producto de PCR del receptor CB2 en el hígado de ratones WT, pero no en el hígado de ratones CB2<sup>-/-</sup>. Se identificó una banda de pb correspondiente al tamaño esperado del producto de PCR del receptor CB1 en el hígado de ratones WT y CB2<sup>-/-</sup>.
- 20 La figura 11 muestra la expresión del ARNm de receptor CB2 en tejido adiposo e hígado. \* p<0,05 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup> p<0,05 frente a ratones con dieta control.
- 25 La figura 12 muestra la expresión del ARNm de receptor CB1 en tejido adiposo e hígado. \* p<0,05 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup>. P<0,05 frente a ratones con dieta control.
- La figura 13 muestra la reducción de la inflamación en el tejido adiposo epididimal (EAT) de ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD. Expresiones de ARNm de F4/80, TNF-alfa y MCP-1 en ratones WT y CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD o dieta control. \* p<0,05 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup>. P<0,05 frente a ratones con dieta control.
- 30 La figura 14 muestra la reducción de la inflamación en el hígado de ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD. Expresiones de ARNm de F4/80, TNF-alfa y MCP-1 en ratones WT y CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD o dieta control. \* p<0,05 para ratones HFD WT frente a CB2<sup>-/-</sup>. P<0,05 frente a ratones con dieta control.
- 35 La figura 15a muestra en el panel de la izquierda la cuantificación del ARNm de receptor CB2 en el tejido adiposo epididimal y el correspondiente peso corporal en ratones ob<sup>+/+</sup>/ob flacos (n=5) y ob/ob obesos de 5, 6 u 8 semanas de edad (n=5/grupo). Se midió el peso corporal en paralelo. (\*, #, p<0,05 para ratones ob/ob frente a ob<sup>+/+</sup>) en ratones de tipo natural alimentados con HFD obesos y sus equivalentes flacos. \*p<0,05 frente a ratones con dieta control.
- 40 La figura 15a muestra en el panel de la derecha la expresión del ARNm de receptor CB2 en la fracción vascular del estroma (SVF) de tejido adiposo y en la fracción de adipocitos. El ARNm de receptor CB2 se expresa en SVF de tejido adiposo y no es detectable en la fracción de adipocitos. Se cuantificó el ARNm de CB2 en las fracciones SVF y de adipocitos de ratones ob/ob y ob<sup>+/+</sup>/ob, y en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 no diferenciada (ND) y diferenciada (D).
- 45 La figura 15b muestra en el panel de la izquierda la cuantificación de la expresión del ARNm relacionada con macrófagos (F4/80) en la grasa epididimal de ratones WT y CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD o dieta control.
- 50 La figura 15b muestra en el panel central la infiltración de macrófagos en la grasa epididimal mediante detección inmunohistoquímica de F4/80 (aumento de X400).
- La figura 15b muestra en el panel de la derecha la cuantificación de células teñidas con F4/80/células totales basándose en la detección inmunohistoquímica de F4/80.
- 55 La figura 15c muestra la expresión del ARNm de MCP-1 y TNF-alfa en la grasa epididimal de ratones WT y CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD frente a ratones flacos.
- 60 La figura 16 muestra el impacto del antagonista de CB2 AM 630 sobre la expresión génica inflamatoria de grasa epididimal, tras un tratamiento de 17 días. Se cuantificaron las expresiones de ARNm relacionadas con macrófagos de F4/80, TNF-alfa y MCP-1 en la grasa epididimal en ratones ob/ob tratados con vehículo y con AM630. \* p<0,05 para ratones ob/ob vehículo frente a AM630 o SR 144528.

**Ejemplo 1**

Procedimientos:

5 **Animales y diseño experimental:** la generación de ratones con una mutación dirigida del gen de CB2 en un contexto genético mixto se ha descrito anteriormente (Buckley, N. E *et al.* 2000). Se obtuvieron ratones C57BL/6 de tipo natural, ob/ob y ob/ob+ de Janvier (Francia).

10 Se alojaron ratones macho adultos (7-10 semanas de edad) en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, en un entorno de temperatura controlada. Se alimentaron ratones de tipo natural (WT) y ratones CB2-/- o bien con alimento convencional (TD 2016, Harlan) o bien con dieta con alto contenido en grasa (36% de grasa, TD 99249, Harlan) durante 15 semanas. Se midieron el peso corporal y la ingesta de alimento semanalmente. Se sacrificaron los ratones tras ayunar durante la noche. Todos los protocolos experimentales se realizaron según las políticas del gobierno francés (Services vétérinaires de la Santé et de la production animale, Ministère français de l'Agriculture).

15 En el momento del sacrificio, se extrajeron los tejidos adiposos marrón y blanco (inguinal subcutáneo (SAT) y epididimal (EAT)), se pesaron y se sometieron a congelación instantánea en nitrógeno líquido. Se tomaron muestras de hígado de diversos lóbulos y o bien se fijaron en formalina tamponada, o bien se sometieron a congelación instantánea en nitrógeno líquido en RNA later (Qiagen). Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

20 Análisis de tejido y suero: Se extrajo sangre en el momento de sacrificar a los ratones, tras ayunar durante la noche. Se determinó la glucemia mediante bandas activas Accu-Check (Roche Diagnostics) y se cuantificó la insulinemia mediante Elisa (Elisa sensible para ratón ultrasensible, Mercodia). Se midieron las concentraciones séricas de leptina mediante ensayos ELISA comerciales (kit de Elisa Quantikine, R&D). Se extrajeron triglicéridos hepáticos a partir de 50 mg de homogenados de hígado en 10 ml de isopropanol, y se cuantificaron utilizando un kit de determinación de triglicéridos (Sigma).

25 **Preparación de ARN y RT-PCR:** Se extrajo ARN total de tejidos adiposo blanco y hepático, utilizando el minikit de tejido adiposo RNeasy® (QIAGEN). Se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa en un instrumento Light Cycler (Roche Diagnostics), tal como se describió anteriormente (Julien B. *et al.* 2005). En la tabla 1 se enumeran las secuencias de cebadores oligonucleotídicos de los genes estudiados.

**Tabla 1:** Secuencia de cebadores utilizados para RT-PCR

35

Diana (número de registro de Genbank)	Secuencia de cebador	Producto de PCR (tamaño)
18S (X00686)	sentido 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' (SEQ ID NO: 1) antisentido: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (SEQ ID NO: 2)	151 pb
CB1 (NM_007726)	sentido 5'-GGGCAAATTCCTTGTAGCA-3' (SEQ ID NO: 3) antisentido 5'-TCTGCAAGGCCGTCTAAGAT-3' (SEQ ID NO: 4)	182 pb
CB2 (NM_009924)	sentido 5'-GGATACAGAATAGCCAGGAC-3' (SEQ ID NO: 5) antisentido 5'-GGAGCCGTTGGTCACTTCTG-3' (SEQ ID NO: 6)	148 pb
MCP-1 (NM_011333)	sentido 5'-GGGCTGCTGTTACAGTT-3' (SEQ ID NO: 7) antisentido 5'-CCAGCCTACTCATTGGGAT-3' (SEQ ID NO: 8)	121 pb
F4/80 (NM_010130)	sentido 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3' (SEQ ID NO: 9) antisense 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3' (SEQ ID NO: 10)	165 pb
TNF-alfa (NM_013693)	sentido 5'-AATGGCCTCCCTCTCATCAGTT-3' (SEQ ID NO: 11) antisentido 5'-CCACTTGGTGGTTTGTACGA-3' (SEQ ID NO: 12)	164 pb
IL-6 (NM_031168)	sentido 5'-GAACAACGATGATGCATTGC-3' (SEQ ID NO: 13) antisentido 5'-TCCAGGTAGCTATGGTACTCC-3' (SEQ ID NO: 14)	144 pb
SREBP-1c (NM_011480)	sentido 5'-GAAGCGCTACCGTCTTCTATCA-3' (SEQ ID NO: 15) antisentido 5'-AAGCTGACACCAGGTCTTCAGT-3' (SEQ ID NO: 16)	212 pb
ACC1 (NM_133360)	sentido 5'-AACCTGGTGAAGCTGGACCTA-3' (SEQ ID NO: 17) antisentido 5'-GCCACAGTGAATCTCGTTG-3' (SEQ ID NO: 18)	203 pb
Leptina (NM_008493)	sentido 5'-CATCTGCTGGCCTTCTCAA-3' (SEQ ID NO: 19) antisentido 5'-ATCCAGGCTCTCTGGCTTCTG-3' (SEQ ID NO: 20)	72 pb

Los productos amplificados por PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2% y se secuenciaron.

40 **Histología de tejido adiposo y hepático.** Se fijaron muestras de hígado en formalina al 10% y se incrustaron en parafina. Se tiñeron secciones de tejido (4 µm) con hematoxilina-eosina para su examen rutinario. Se cuantificó el tamaño de adipocitos en secciones de tejido adiposo (8 µm) teñidas con hematoxilina-eosina. Se realizó la cuantificación en por lo menos 30 células de 3 campos separados en 7 animales WT y 5 animales CB2-/- alimentados con HFD, utilizando el software Image J.

**Estadística:** Se expresan los resultados como media  $\pm$  EEM y se analizaron mediante o bien la prueba de Mann y Whitney, ANOVA de una vía o bien ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Bonferroni. Se tomó  $p < 0,05$  como el nivel mínimo de significación.

## 5 Resultados:

**Los ratones CB2<sup>-/-</sup> son resistentes a la obesidad inducida por la dieta:** Se sometieron ratones de tipo natural y ratones CB2<sup>-/-</sup> a una dieta con alto contenido en grasa (HFD) durante 15 semanas, mientras que controles respectivos permanecieron con alimento para ratones regular. Al comienzo del experimento, el peso promedio era similar en ambos,  $22,2 \pm 0,13$  g para WT y  $20,1 \pm 0,4$  g para CB2<sup>-/-</sup>. Sin embargo, tras 9 semanas de HFD, el peso medio de ratones CB2<sup>-/-</sup> era significativamente menor que el de sus equivalentes de tipo natural, y al finalizar el estudio los animales CB2<sup>-/-</sup> pesaban un 28% menos que los ratones de tipo natural ( $41,6 \pm 1,3$  g para CB2<sup>-/-</sup> frente a  $46,7 \pm 1,2$  g para WT,  $p < 0,05$ , figura 1), a pesar de una ingesta de alimento similar (figura 2).

15 Al final del estudio, los ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD presentaban una reducción significativa de los pesos de tejido adiposo blanco y marrón (tabla 2).

Además, el índice de adiposidad de ratones CB2<sup>-/-</sup> (definido como masa de grasa total/peso corporal eviscerado  $\times$  100) era significativamente inferior en comparación con ratones WT (tabla 2). Finalmente, el tamaño de adipocitos de ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD era significativamente menor que el de ratones WT alimentados con HFD (figura 3).

Los ratones de tipo natural alimentados con HFD mostraron cambios hormonales y metabólicos esperados, incluyendo hiperglucemia, hiperemia e hiperleptinemia (figuras 4, 5 y 6). En cambio, en ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD los niveles séricos de insulina y glucosa permanecieron dentro de intervalos normales (figuras 4 y 5), aunque las diferencias entre ratones WT y CB2<sup>-/-</sup> no alcanzaron significación. Además, los niveles de leptina sérica fueron significativamente inferiores en ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD así como en ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con dieta control, en comparación con sus equivalentes WT (figura 6).

**La invalidación de CB2 cancela la esteatosis hepática inducida por la obesidad:** Tal como se esperaba, los ratones WT obesos desarrollaron hígado graso, tal como se muestra mediante análisis histológicos de secciones de tejido hepático, y aumento de los triglicéridos hepáticos (figura 8). En cambio, los ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD se protegieron frente a esteatosis hepática (figura 8). Por lo tanto, la inducción de SREBP-1c y ACC1 fue constantemente inferior en el hígado de ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD (figura 9).

Tomados en conjunto, estos resultados desvelan un nuevo papel para CB2 en la patogénesis de la obesidad, resistencia a la insulina y esteatosis hepática inducida por una dieta con alto contenido en grasa.

**Regulación de la expresión de receptor CB en tejido adiposo blanco y hepático en ratones de tipo natural y CB2<sup>-/-</sup> con HFD:** Tal como se esperaba, los ratones CB2<sup>-/-</sup> carecían del gen de CB2, y presentaban expresión génica de CB1 normal (figura 10). En ratones WT alimentados con HFD, se indujo la expresión del receptor CB2 en  $29,8 \pm 5,0$  veces en el EAT (tejido adiposo epididimal), pero permaneció inalterada en el hígado (figura 11). Se obtuvieron resultados similares en ratones ob/ob, con una inducción de  $6,8 \pm 1,9$  veces de la expresión de ARNm de receptor CB2 en el tejido adiposo y sin cambios en el hígado (figura 11). También se investigó la regulación de ARNm del receptor CB1 en ratones WT y CB2<sup>-/-</sup>. Tal como describieron otros (Cota D. *et al.* 2003; Osei-Hyiaman, D *et al.* 2005), se indujo expresión de ARNm de receptor CB1 en EAT e hígado de ratones WT alimentados con HFD en  $2,68 \pm 0,35$  y  $3,57 \pm 0,96$  veces, respectivamente (figura 12). En cambio, no se indujo ARNm de receptor CB1 en EAT e hígado de ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD (figura 12).

Estos resultados demuestran que la dieta con alto contenido en grasa regula por incremento la expresión de ARNm de CB2 en EAT pero no en el hígado. Además, también muestran que la expresión de ARNm de receptor CB1 está controlada por receptores CB2 durante HFD.

Los ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD presentan una reducción de la inflamación en EAT e hígado. Está bien reconocido que el tejido adiposo se caracteriza por un estado inflamatorio de grado bajo durante la obesidad que puede contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina. Los adipocitos secretan varias adipocinas que contribuyen a la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, y al posterior desarrollo de resistencia a la insulina y a la esteatosis hepática. Los datos recientes han mostrado que la expresión de diversas proteínas relacionadas con la inflamación, incluyendo TNF-alfa y MCP-1, se regula por incremento durante la obesidad inducida por la dieta, y desempeñan un papel clave en la patogénesis del síndrome metabólico y de las complicaciones hepáticas de la obesidad. Tal como se esperaba, el EAT de ratones de tipo natural alimentados con HFD mostró una fuerte inducción de las expresiones de ARNm de TNF-alfa y MCP-1, y un aumento de la densidad de macrófagos, tal como se sometió a ensayo mediante la expresión de ARNm de F4/80, un marcador específico de macrófagos maduros (figura 13). En cambio, las inducciones de TNF-alfa, MCP-1 y F4/80 fueron significativamente inferiores en el EAT de ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD (figura 13).

También se investigaron las consecuencias de la invalidación de CB2 sobre la inflamación hepática en ratones alimentados con HFD. Tal como se observa en el tejido adiposo, la inducción hepática de ARNm de TNF-alfa, MCP-1 y F4/80 era inferior en ratones CB2<sup>-/-</sup> alimentados con HFD en comparación con ratones de tipo natural alimentados con HFD (figura 14).

Por tanto, estos resultados demuestran que el receptor CB2 desempeña un papel principal en el proceso inflamatorio que subyace al desarrollo de la obesidad.

En resumen, se muestra en la presente memoria que el receptor CB2 se sobreexpresa en el tejido adiposo y desempeña un papel principal en el desarrollo de la obesidad, resistencia a la insulina, inflamación y esteatosis hepática.

**Tabla 2:** Peso tisular e índice de adiposidad (masa de grasa total/peso corporal eviscerado) de ratones WT y CB2<sup>-/-</sup> tras 15 semanas de dieta con alto contenido en grasa

	Ratones	EAT (mg)	SAT (mg)	Índice de adiposidad	BAT (mg)
Dieta control	WT (n=13)	309 ± 83	130 ± 28	2,2 ± 0,2	100 ± 1,5
	CB2 <sup>-/-</sup> (n=15)	213 ± 37	103 ± 3	1,8 ± 0,1	98 ± 9
Dieta con alto contenido en grasa	WT (n=7)	2472 ± 92*	1791 ± 116*	9,6 ± 0,4*	226 ± 17*
	CB2 <sup>-/-</sup> (n=5)	1732 ± 207*\$	774 ± 227*\$	6,7 ± 0,7*\$	111 ± 8*\$

\*: p<0,05 para HFD frente a dieta control; \$: p<0,05 para ratones HFD WT frente a HFD CB2<sup>-/-</sup>; BAT (tejido adiposo marrón); SAT (tejido adiposo inguinal subcutáneo); EAT (tejido adiposo epididimal)

## Ejemplo 2

### Procedimientos:

**Animales y diseño experimental:** Los protocolos experimentales se realizaron según las políticas del gobierno francés (Services vétérinaires de la Santé et de la production animale, Ministère français de l'Agriculture). Se alojaron animales en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, en un entorno de temperatura controlada. Se evaluó el impacto del antagonista de CB2 AM630 en ratones macho Lep<sup>Ob</sup>/Lep<sup>Ob</sup> obesos de 6 semanas de edad (ob/ob) y equivalentes Lep<sup>Ob+</sup>/Lep<sup>Ob</sup> flacos (ob+/ob). Los ratones recibieron un ciclo de 17 días de inyección intraperitoneal diaria de 1 mg/kg de AM630 (n=10 ob/ob y n=5 ob+/ob) o vehículo (n=8 ob/ob y n=5 ob+/ob). Se disolvió de manera reciente AM630 (Tocris) en una disolución vehículo que contenía 1 gota de Tween 80 en 0,1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), se sonicó y se diluyó adicionalmente 50 veces en NaCl al 9%. Se midieron diariamente el peso corporal y la ingesta de alimento. Se sacrificaron los ratones tras ayunar durante la noche. Se extrajo tejido adiposo epididimal blanco, se pesó y o bien se fijó en formalina tamponada, o bien se sometió a congelación instantánea en nitrógeno líquido. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

**Preparación de ARN y RT-PCR:** Se extrajo ARN total de grasa epididimal de ratones utilizando un minikit de tejido adiposo Uneasy® (QIAGEN). Se llevó a cabo RT-PCR cuantitativa en un instrumento Light Cycler (Roche Diagnostics), tal como se describió anteriormente. En la tabla 3 se presentan las secuencias de cebadores oligonucleotídicos de los genes de ratón estudiados.

**Tabla 3:** Secuencia de cebadores utilizados para RT-PCR

Diana	Secuencia de cebador
18S de ratón	sentido 5'-ACCAGAGCGAAAGCATTGCCA3' (SEQ ID NO: 21) antisentido: 5'-ATCGCCAGTCGGCATCGTTTAT -3' (SEQ ID NO: 22)
MCP-1 de ratón	sentido 5'-GGGCTGCTGTTACAGTT-3' (SEQ ID NO: 7) antisentido 5'-CCAGCCTACTCATTGGGAT-3' (SEQ ID NO: 8)
F4/80 de ratón	sentido 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3' (SEQ ID NO: 9) antisentido 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3' (SEQ ID NO: 10)
TNF-alfa de ratón	sentido 5'-AATGGCCTCCCTCTCATCAGTT-3' (SEQ ID NO: 11) antisentido 5'-CCACTTGGTGGTTTGTACGA-3' (SEQ ID NO: 12).

Los productos amplificados por PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2% y se secuenciaron.

### Resultados:

Varios estudios han establecido que la obesidad está asociada con una inflamación de grado bajo en el tejido adiposo que contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina sistémica e hígado graso. También se ha mostrado que se acumulan macrófagos en el tejido adiposo durante la obesidad y contribuyen a este estado inflamatorio.

Se caracterizaron adicionalmente la regulación y distribución de receptores CB2 en el tejido adiposo en dos modelos experimentales de obesidad (figura 15a). De manera interesante, ratones de tipo natural y ratones ob/ob alimentados con HFD mostraron una fuerte inducción de ARNm de CB2 que correlaciona con un aumento del peso corporal (figura 15a, panel izquierdo). El ARNm de receptor CB2 no podía detectarse en adipocitos así como en preadipocitos 3T3-L1, y se inducía fuertemente en la fracción vascular del estroma de tejido adiposo epididimal preparada a partir de ratones obesos (ob/ob) en comparación con animales flacos (ob+/ob-) (figura 15a, panel derecho), lo que indica una expresión relacionada con macrófagos del receptor CB2. Tal como se esperaba, el tejido adiposo de ratones WT alimentados con HFD obesos estaba significativamente infiltrado por macrófagos, tal como se muestra por la fuerte inducción del ARNm que codifica para el marcador F4/80 relacionado con macrófagos (figura 15b, panel izquierdo), y por la acumulación de células positivas para F4/80 en agrupaciones en corona alrededor de los adipocitos (figura 15b, panel derecho). Este aumento de la densidad de macrófagos estaba asociado con una marcada inducción de las expresiones de ARNm de TNF-alfa y MCP-1, lo que refleja la respuesta inflamatoria del tejido adiposo en animales WT obesos (figura 15c). En cambio, la inactivación genética de CB2 estaba asociada con un menor grado de acumulación de macrófagos en el tejido adiposo (figura 15b) y con una marcada disminución de la respuesta inflamatoria, tal como se evalúa mediante las expresiones de ARNm de TNF-alfa y MCP-1 (figura 15c).

Con el fin de respaldar los datos obtenidos en ratones CB2<sup>-/-</sup> genéticamente deficientes, se indujo la inhibición farmacológica de CB2 mediante administración intraperitoneal diaria del antagonista de CB2 AM630 (1 mg/kg a lo largo de 17 días) a ratones ob/ob de seis semanas de edad. El AM 630 redujo la respuesta inflamatoria de la grasa en ratones obesos, tal como se muestra mediante una menor inducción de ARNm de F4/80, TNFalfa y MCP-1 (figura 16).

En conjunto, estos resultados indican que, en este modelo animal, el antagonismo de CB2 está asociado con una reducción de la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo y por tanto puede mejorar la resistencia a la insulina y la esteatosis.

#### Bibliografía

- Barth F, Rinaldi-Carmona M. The development of cannabinoid antagonists. *Curr Med Chem.* 1999 Aug;6(8):745-55.
- Bray GA, Blackburn GL, Ferguson JM, Greenway FL, Jain AK, Mendel CM, Mendels J, Ryan DH, Schwartz SL, Scheinbaum ML, Seaton TB. Sibutramine produces dose-related weight loss. *Obes Res.* 1999 Mar;7(2):189-98.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 2002 Apr 19;296(5567):550-3.
- Buckley, N. E., McCoy, K. L., Mezey, E., Bonner, T., Zimmer, A., Felder, C. C., Glass, M., y Zimmer, A. (2000) *Eur J Pharmacol* 396, 141-149.
- Carter P, Bedouelle H, Winter G. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* 1985 Jun 25;13(12):4431-43.
- Charalambous A, Yan G, Houston DB, Howlett AC, Compton DR, Martin BR, Makriyannis A. 5'-Azido-delta 8-THC: a novel photoaffinity label for the cannabinoid receptor. *J Med Chem.* 1992 Aug 7;35(16):3076-9.
- Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction, *Biochem Pharmacol.* 1973 Dec 1;22(23):3099-108.
- Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R. (1996) Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 380, 548-50.
- Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 1985, págs. 77-96).
- Cota, D., Marsicano, G., Tschop, M., Grubler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thone-Reineke, C., Ortmann, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A. C., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G. K., and Pagotto, U. (2003) *J Clin Invest* 112, 423-431.
- Cote RJ, Morrissey DM, Houghton AN, Beattie EJ Jr, Oettgen HF, Old LJ. Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Apr;80(7):2026-30.
- Davidson MH, Hauptman J, DiGirolamo M, Foreyt JP, Halsted CH, Heber D, Heimburger DC, Lucas CP, Robbins DC, Chung J, Heymsfield SB. Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1999 Jan 20;281 (3):235-42.
- De Lean A, Munson PJ, Rodbard D. *Mol Pharmacol.* 1979 Jan;15(1):60-70.

- Després JP, Golay A, Sjöström L; for the Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*. 2005;353:2121-2134.
- 5 Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988 Nov;34(5):605-13.
- Dodd PR, Hardy JA, Oakley AE, Edwardson JA, Perry EK, Delaunoy JP. A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain Res*. 1981 Dec 7;226(1-2):107-18.
- 10 Douglas A, Douglas JG, Robertson CE, Munro JF. Plasma phentermine levels, weight loss and side-effects. *Int J Obes*. 1983;7(6):591-5.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24;411 (6836):494-8.
- 15 Farrell G C. Non-alcoholic steatohepatitis: what is it, and why is it important in the Asia-Pacific region? *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:124-138.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third  
20 National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002 Jan 16;287(3):356-9.
- Guy-Grand B, Apfelbaum M, Crepaldi G, Gries A, Lefebvre P, Turner P. International trial of long-term dexfenfluramine in obesity. *Lancet*. 1989 Nov 11;2(8672):1142-5.
- 25 Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):244-51.
- Hosohata Y, Quock RM, Hosohata K, Makriyannis A, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. AM630 antagonism of cannabinoid-stimulated [35S]GTP gamma S binding in the mouse brain. *Eur J Pharmacol*. 1997 Feb 19;321(1): R1-3.
- 30 Iwamura, H, et al., 2001, "In Vitro and In Vivo Pharmacological Characterization of JTE-907, a Novel Selective Ligand for Cannabinoid CB2 Receptor," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 296, n.º 2, págs. 420-425.
- Jayasena S.D. (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem*.  
35 45(9):1628-50.
- Julien, B., Grenard, P., Teixeira-Clerc, F., Tran-Van-Nhieu, J., Li, L., Karzak, M., Zimmer, A., Mallat, A., y Lotersztajn, S. (2005) *Gastroenterology* 128, 742-755.
- 40 Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.
- Kriegler, A *Laboratory Manual*, W.H. Freeman C.O., Nueva York, 1990.
- 45 Matsuda et al., 1990 *Nature (Lond)* 346: 561-564
- McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*. 2002 Oct;3(10): 737-47.
- 50 Murry, "Methods in Molecular Biology," vol.7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991.
- Osei-Hyiaman, D., Depetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertaler, L., Wang, L., and Kunos, G. (2005) *J Clin Invest* 115, 1298-1305.
- 55 Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem*. 1999 Aug;6(8):635-64.
- Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J; for the RIO-North America Study Group. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006;295:761-775.
- 60 Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2001 Sep;121 (3):710-23.
- Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F, Casellas P, Ferrara P, Le Fur G. Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Aug;278  
65 (2):871-8.

- Rinaldi-Carmona et al., *J. Pharmacol. Expt. Ther.*, 1998, 284:644-650.
- Rinaldi-Carmona M., The development of cannabinoid antagonists. *Curr Med Chem.* 1999 Aug;6(8):745-55.
- 5 Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Tuerk C. and Gold L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 3;249(4968):505-10.
- 10 Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 1999 Dec 15;13(24):3191-7.
- 15 Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S; for the RIO-Europe Study Group. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet.* 2005;365:1389-1397.
- Wells JA, Vasser M, Powers DB. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene.* 1985;34(2-3):315-23.
- 20 Wiley JL, Burston JJ, Leggett DC, Alekseeva OO, Razdan RK, Mahadevan A, Martin BR. CB1 cannabinoid receptormediated modulation of food intake in mice. *Br J Pharmacol.* 2005 Jun;145(3):293-300.
- 25 Williams CM, Kirkham TC. Reversal of delta 9-THC hyperphagia by SR141716 and naloxone but not dexfenfluramine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002 Jan-Feb;71(1-2):333-40.
- Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 18;94(6):2557-62.
- 30 Zoller MJ, Smith M. Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res.* 1982 Oct 25;10(20):6487-500.

**Listado de secuencias**

	<110> INSERM	
5	<120> Inhibidores selectivos de la actividad y/o la expresión del receptor CB2 para el tratamiento de la obesidad y los trastornos relacionados con la obesidad	
	<130> BET 08P0215	
10	<160> 22	
	<170> Patente en versión 3.4	
	<210> 1	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> cebador	
	<400> 1	
	gtaacccggt gaacccatt	20
25	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 2	
35	ccatccaatc ggtagtagcg	20
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
45	<400> 3	
	gggcaaattt cctgtagca	20
	<210> 4	
	<211> 20	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
55	<400> 4	
	tctgcaaggc cgtctaagat	20
	<210> 5	
60	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223> cebador	

ES 2 374 026 T3

	<400> 5 ggatacagaa tagccaggac	20
5	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 6 ggagccgttg gtcacttctg	20
15	<210> 7 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 7 gggctgctg ttcacagtt	19
25	<210> 8 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 8 ccagcctact cattgggat	19
40	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 9 cttggctat gggctccag tc	22
50	<210> 10 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
55	<400> 10 gcaaggagga cagagtttat cgtg	24
60	<210> 11 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador	

ES 2 374 026 T3

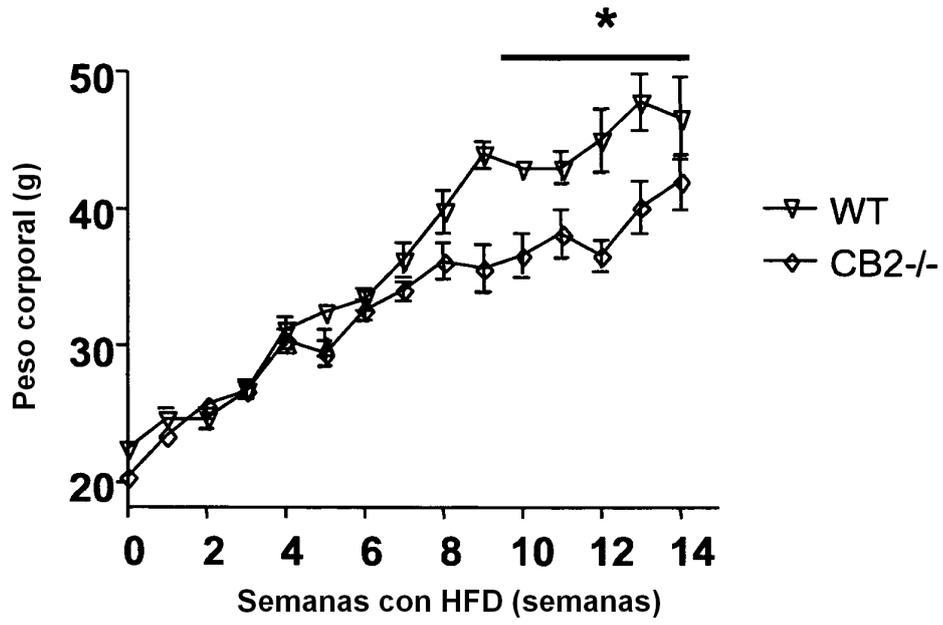
	<400> 11 aatggcctcc ctctcatcag tt	22
5	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 12 ccacttggtg gtttgctacg a	21
15	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 13 gaacaacgat gatgcacttg c	21
25	<210> 14 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 14 tccaggtagc tatgtactc c	21
40	<210> 15 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 15 gaagcgctac cggcttcta tca	23
50	<210> 16 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
55	<400> 16 aagctgacac caggtccttc agt	23
60	<210> 17 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador	

ES 2 374 026 T3

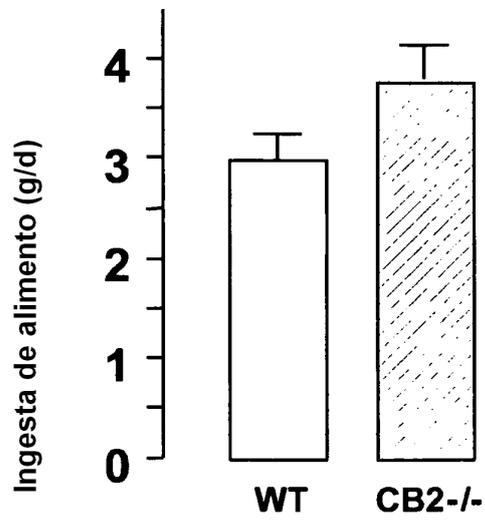
	<400> 17 aacctggtga agctggacct a	21
5	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 18 gccacagtga aatctcgttg	20
15	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador	
	<400> 19 catctgctgg ccttctcaa	20
25	<210> 20 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 20 atccaggctc tctggcttct g	21
40	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 21 accagagcga aagcatttgc ca	22
50	<210> 22 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
55	<400> 22 atgccagtc ggcacgttt at	22

**REIVINDICACIONES**

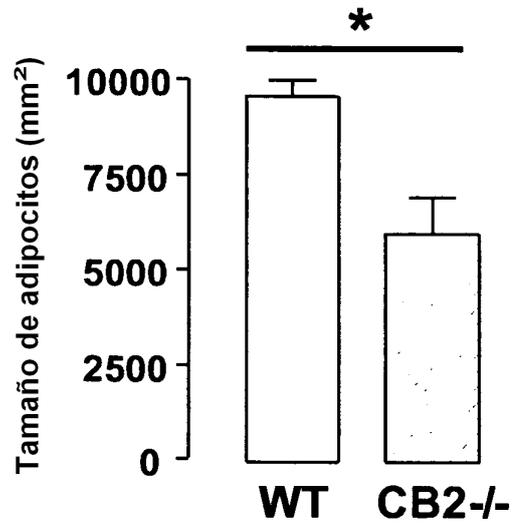
- 5 1. Inhibidor selectivo de la expresión del receptor CB2 seleccionado de entre el grupo constituido por moléculas de ADN o ARN antisentido, ARN inhibidores pequeños (ARNip) y ribozimas, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno relacionado con la obesidad, en el que dicho trastorno relacionado con la obesidad es la resistencia a la insulina.
- 10 2. Antagonista del receptor CB2 para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno relacionado con la obesidad en el que dicho trastorno relacionado con la obesidad es la resistencia a la insulina.



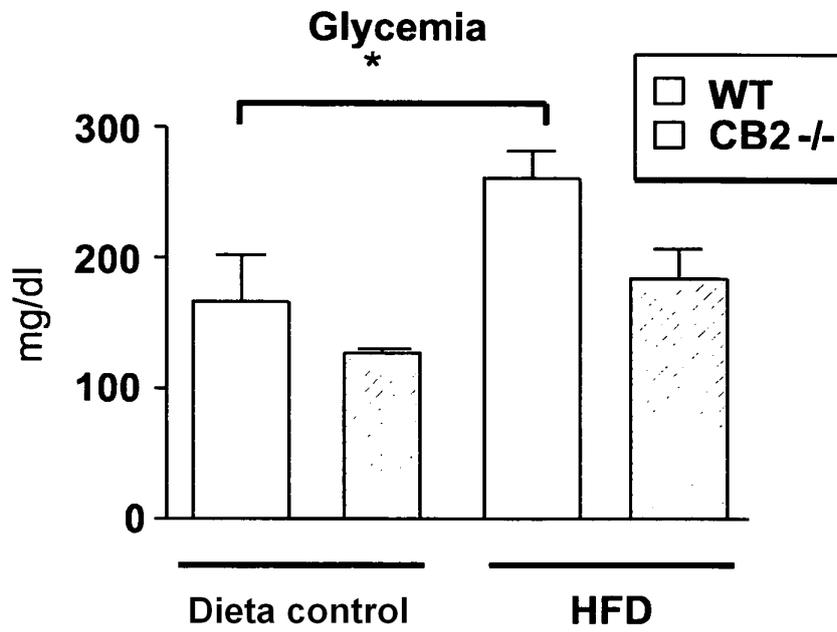
**FIG.1**



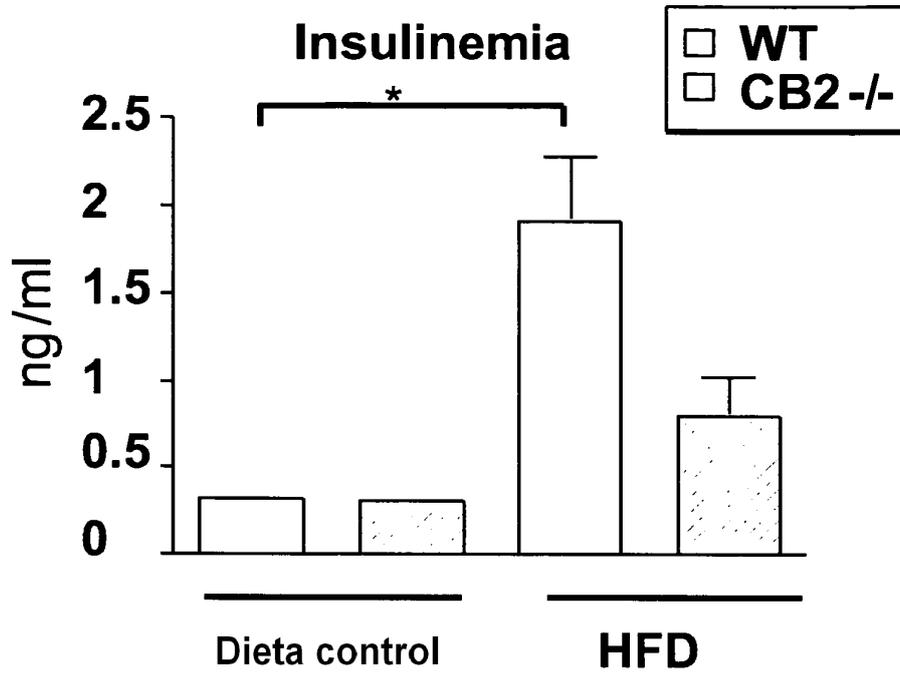
**FIG.2**



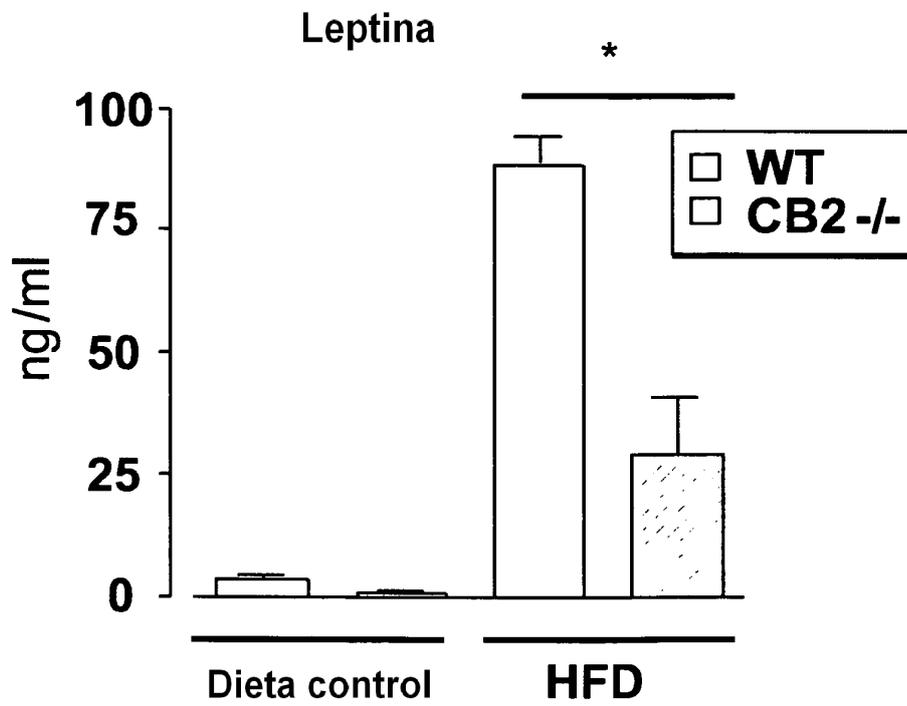
**FIG.3**



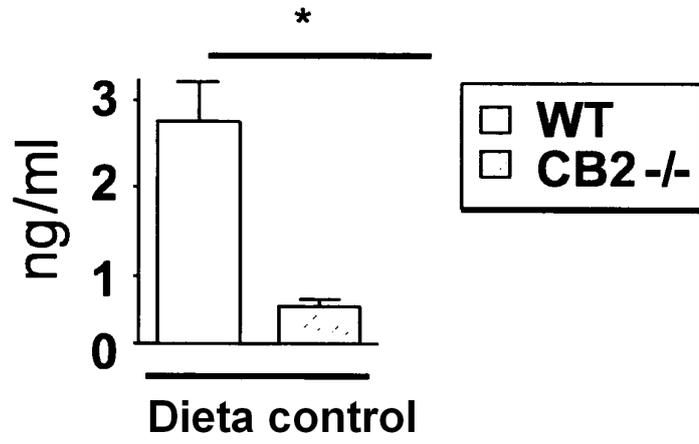
**FIG.4**



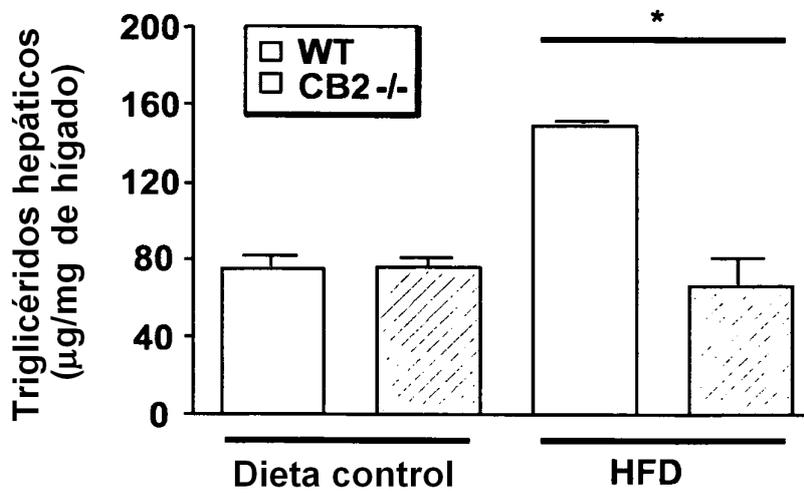
**FIG.5**



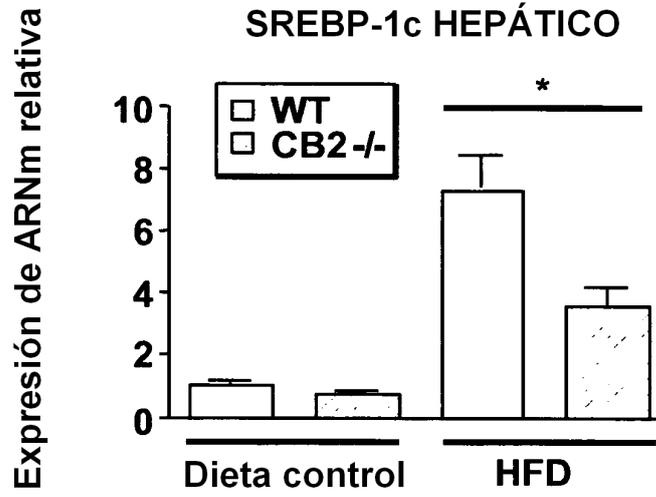
**FIG.6**



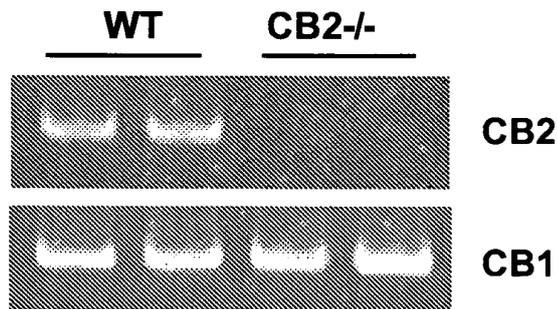
**FIG.7**



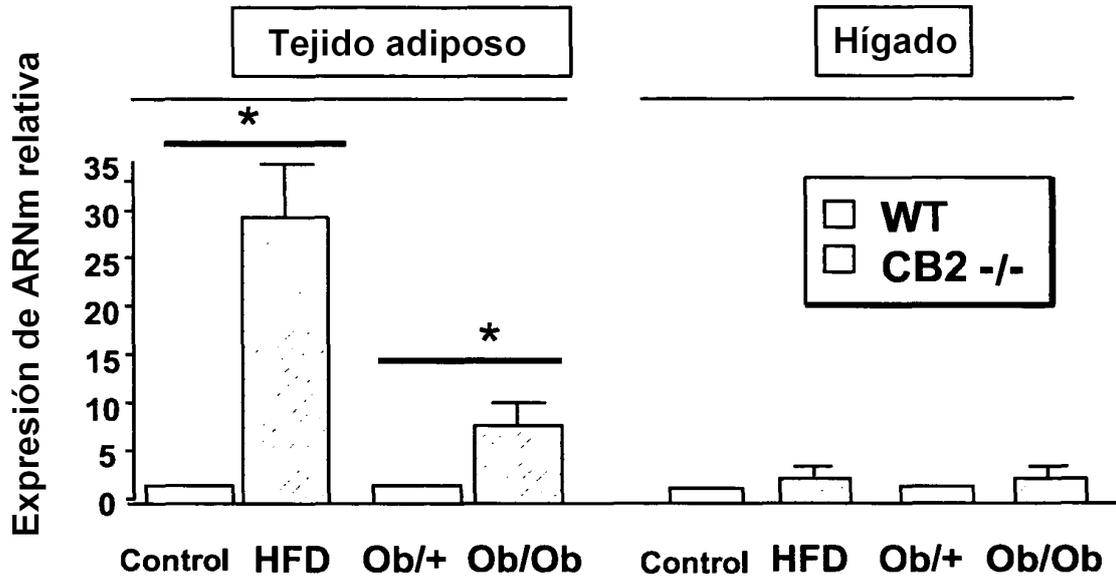
**FIG.8**



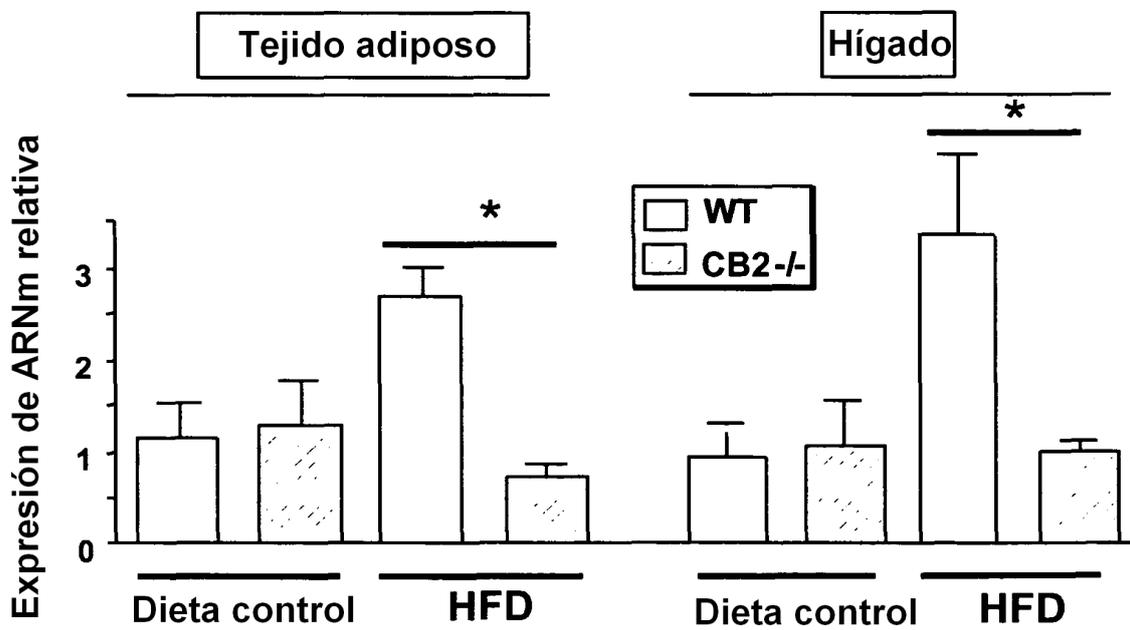
**FIG.9**



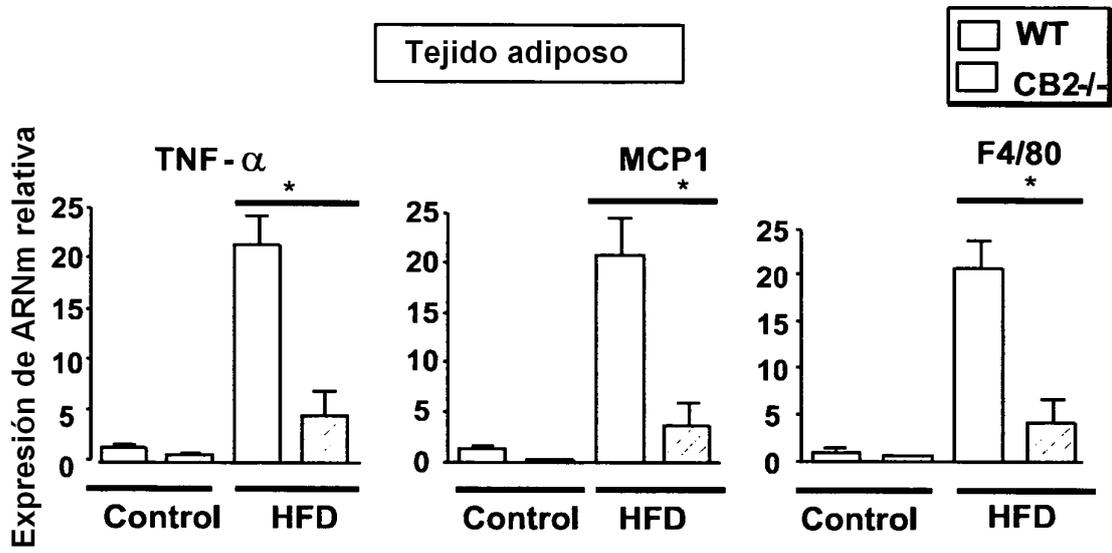
**FIG.10**



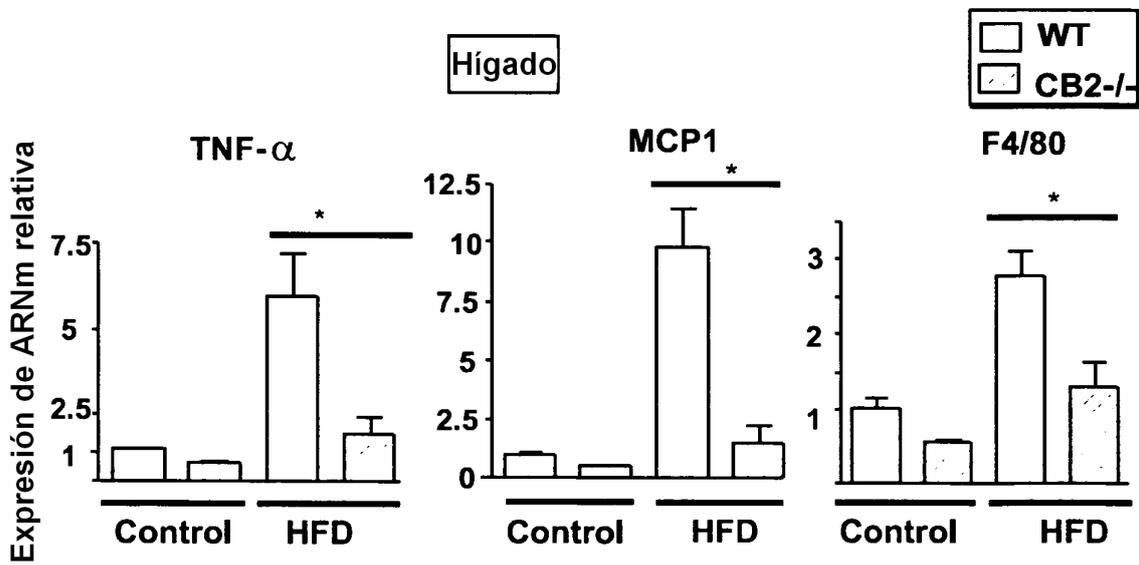
**FIG.11**



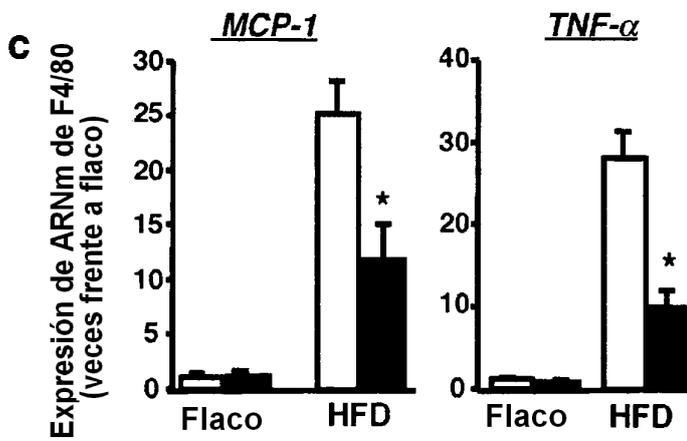
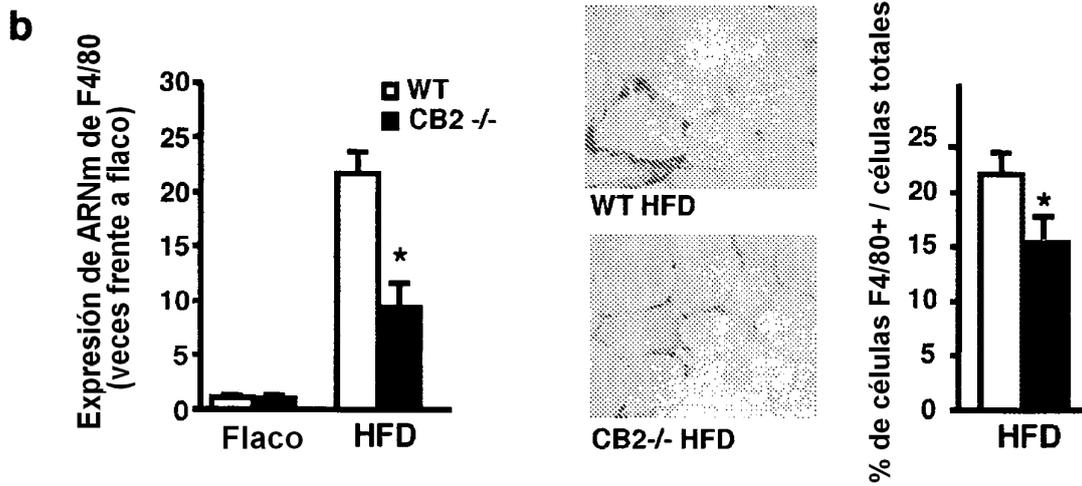
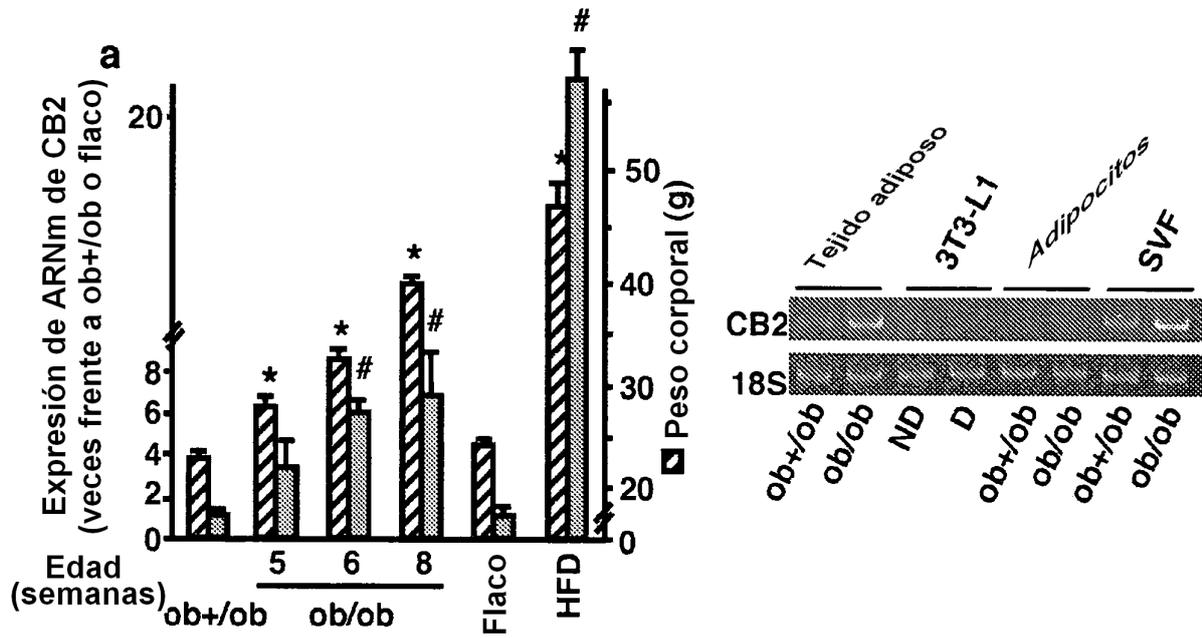
**FIG.12**



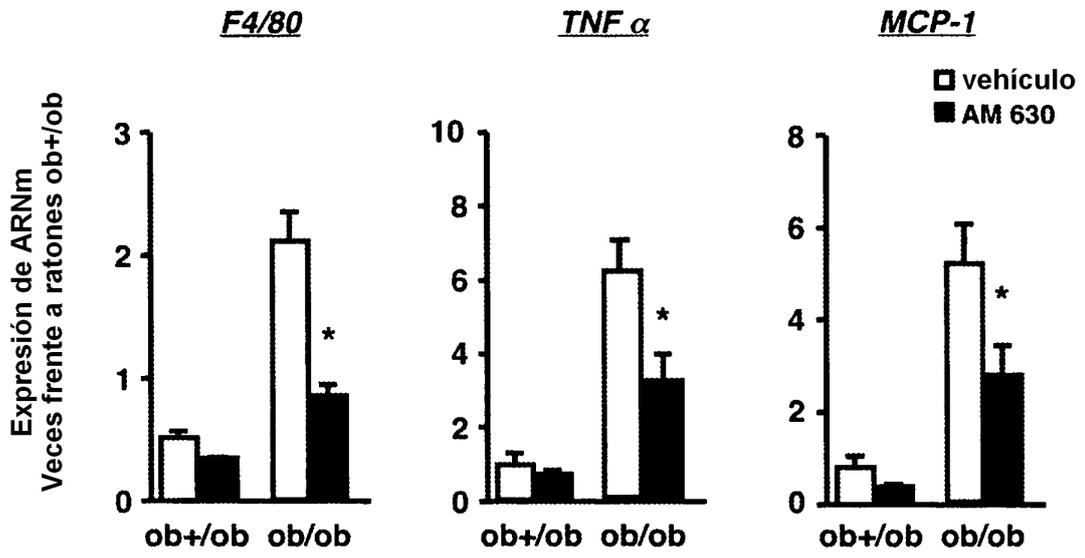
**FIG.13**



**FIG.14**



**FIG.15**



**FIG.16**