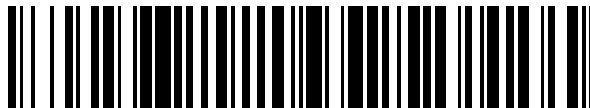


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 418 954**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2002 E 10165256 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2219031**

54 Título: **Uso de la leptina para el tratamiento de la lipoatrofia humana y método para determinar la predisposición a dicho tratamiento**

30 Prioridad:

22.10.2001 US 336394 P

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

19.08.2013

73 Titular/es:

AMGEN, INC. (33.3%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799 , US;
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA, REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (33.3%) y
THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM (33.3%)

72 Inventor/es:

DEPAOLI, ALEX M;
ORAL, ELIF ARIOGLU;
TAYLOR, SIMEON I y
GARG, A.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 418 954 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

Uso de la leptina para el tratamiento de la lipoatrofia humana y método para determinar la predisposición a dicho tratamiento

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del uso terapéutico de la leptina, análogos de la leptina y derivados de la leptina en un método de tratamiento de la lipoatrofia humana.

10 **Antecedentes de la invención**

Se pueden hallar citas completas de las referencias al final de la descripción detallada.

15 Los síndromes de lipoatrofia (también conocida como lipodistrofia) son un grupo heterogéneo de síndromes que se caracteriza por una escasez de tejido adiposo o graso. Esta condición también puede tener asociadas anomalías metabólicas. Estas anomalías metabólicas incluyen la hipertrigliceridemia y la resistencia grave a la insulina habitualmente acompañada por diabetes mellitus (Reitmann et al., 2000). En los seres humanos, la lipoatrofia puede ser heredada genéticamente o adquirida. Existe más de una forma genética de lipoatrofia. Por ejemplo, se ha demostrado que las mutaciones en el gen que codifica la lámina A/C (LMNA) están asociadas con la lipodistrofia parcial familiar tipo Dunnigan (FPLD) (Cao et al., 2000). Los individuos con FPLD de Dunnigan nacen con una distribución normal de la grasa, pero en la pubertad desarrollan una pérdida progresiva de grasa subcutánea en tronco y extremidades, con preservación del tejido adiposo visceral, de cabeza y cuello. Una localización cromosómica diferente (9q34) también ha sido asociada con un gen patológico para la lipodistrofia congénita generalizada (Garg et al., 1999). La lipodistrofia congénita generalizada es un trastorno recesivo que se caracteriza por una ausencia prácticamente total de tejido adiposo desde el nacimiento, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia y acantosis nigricans.

30 En los seres humanos, algunas formas de lipoatrofia son adquiridas. Por ejemplo, muchos pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y tratados con una terapia antirretroviral de alta actividad (HAART) desarrollan una lipodistrofia parcial, caracterizada por la pérdida de grasa subcutánea del rostro, extremidades y tronco, con un aumento de la grasa visceral y una «joroba de búfalo» similar a la observada en el síndrome de Cushing. Estos pacientes pueden desarrollar también trastornos metabólicos, tales como resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia. Las formas adquiridas de lipoatrofia también pueden estar relacionadas con la dermatomiositis juvenil y otras enfermedades autoinmunes.

35 Las investigaciones en modelos animales han demostrado que estas anomalías metabólicas pueden estar asociadas con una pérdida de grasa (Gavrilova et al., 2000). No obstante, la resistencia a la insulina y la hipertrigliceridemia que caracterizan a la lipoatrofia han sido extremadamente refractarias al tratamiento, aún cuando se han probado diversos métodos (Garg, 2000). Uno de estos métodos incluye el tratamiento con tiazolidinedionas, que son agonistas PPAR γ (receptor y activado por proliferador de peroxisomas). Aunque las tiazolidinedionas son atractivas porque promueven tanto la diferenciación de adipocitos como la sensibilidad a la insulina, los pacientes que reciben tiazolidinedionas son tratados habitualmente con terapia de combinación, incluyendo una alta dosis de insulina, agentes hipoglucémicos orales (por ejemplo, metformina y tiazolidinedionas) y fármacos hipolipemiantes (por ejemplo, fibratos y estatinas).

45 A pesar de estas terapias, los pacientes con lipoatrofia generalizada continúan manifestando una hipertrigliceridemia severa (lo que provoca episodios recurrentes de pancreatitis aguda), hiperglicemia severa (que implica el riesgo de nefropatía y retinopatía diabética) y esteatohepatitis no alcohólica (que puede provocar cirrosis) (Aroglu et al., 2000). De hecho, un miembro de las tiazolidinedionas, la troglitazona, fue retirada del mercado estadounidense debido a su hepatotoxicidad, rara pero grave, dejando dos tiazolidinedionas (rosiglitazona y pioglitazona) disponibles (Reitmann, et al.). Por tanto, existe la necesidad de un tratamiento alternativo para la lipoatrofia.

50 Se han desarrollado y testado diversos modelos animales de lipoatrofia modificados genéticamente. No obstante, estos modelos proporcionan resultados contradictorios en cuanto a la sensibilidad de estos animales al tratamiento con la leptina. Por ejemplo, en un modelo de ratón transgénico, que expresa una versión nuclear truncada de SREBP-1c e imita las características de la lipodistrofia congénita generalizada con resistencia a la insulina y tejido adiposo notablemente reducido, la infusión sistémica continua de leptina superó la resistencia del ratón a la insulina (Shimomura et al., 1999). Por otra parte, un ratón transgénico diferente, que expresa el gen A-ZIP/F-1 y que se caracteriza por la ausencia de tejido graso, resistencia severa a la insulina, diabetes y niveles de leptina en suero notablemente reducidos, no respondió a la leptina a dosis similares y unas dosis superiores resultaron mínimamente

efectivas (Gavrilova et al., 2000). Cualquier eficacia con la leptina también disminuía con la edad del animal (Id.), Asimismo, a pesar de que la resistencia a la insulina fue superada con la leptina en el ratón transgénico SREBP-1c, no se observó una regresión de la lipoatrofia (Shimomura et al.).

- 5 El uso actual de la leptina en la terapia de seres humanos se ha centrado principalmente en reducir la obesidad y su disfunción metabólica asociada (Heymsfield et al., 1999). Los pacientes con ausencia de leptina debido a mutaciones en el gen de la leptina padecen obesidad mórbida desde la infancia y presentan diversas anomalías hormonales, incluyendo resistencia a la insulina e hipogonadismo hipogonadotrópico (Montague et al., 1997). La sustitución fisiológica, con leptina recombinante durante un año, en uno de estos pacientes provocó una significativa
10 reducción de peso y una mejora de las anomalías hormonales (Farooqi et al., 1999; Solicitud PCT nº WO 00/20872). Estos estudios previos no han abordado el uso de la leptina en el contexto de la lipoatrofia humana.

Resumen de la invención

- De acuerdo con las reivindicaciones, la presente invención prevé el uso de la leptina en un método de tratamiento para seres humanos con lipoatrofia y sus anomalías metabólicas asociadas. La divulgación proporciona un método para determinar una predisposición al tratamiento con leptina. En una realización, la leptina humana se emplea en una terapia de sustitución hormonal en pacientes lipoatróficos que presentan una concentración de leptina en suero reducida. De acuerdo con la divulgación, se emplea leptina recombinante, o análogos o derivados de la leptina. Las proteínas leptinas se pueden administrar por vía subcutánea o sistémica, o a través de cualquier otra vía, incluyendo métodos de terapia genética.

- 20 Al evaluar la predisposición del paciente lipoatrófico al tratamiento con leptina, se puede determinar la concentración en suero de leptina. Preferiblemente los pacientes con una concentración de leptina en suero inferior a 4 ng/ml, más preferiblemente inferior a 2 ng/ml y aún más preferiblemente inferior a 0,5 ng/ml se someten a un tratamiento con leptina. De acuerdo con la divulgación, el tratamiento con leptina se administra a pacientes de sexo femenino con una concentración de leptina en suero inferior a 4 ng/ml y a pacientes de sexo masculino con una concentración de
25 leptina en suero inferior a 3 ng/ml. Más preferiblemente la leptina se administra a pacientes de sexo masculino con una concentración de leptina en suero inferior a 2 ng/ml.

Breve descripción de las ilustraciones

- 30 La Figura 1A muestra la evolución clínica de un paciente NIH-1 con cuatro meses de terapia con leptina. Los datos históricos previos a la terapia con leptina (comenzada el Día 0) se presentan para demostrar la severidad de los resultados metabólicos. Se muestran importantes hitos de la terapia y de la mejora de los parámetros metabólicos. La Figura 1B ilustra imágenes de resonancia magnética axial ponderada en T1 de un paciente NIH-1 a nivel de L4 en la línea basal y a los cuatro meses de terapia con leptina. Cabe señalar la reducción del tamaño del hígado y los consiguientes cambios de posición de los riñones y las estructuras de la línea media.

- 35 La Figura 2 muestra que la leptina reduce la HbA_{1c} en los pacientes diabéticos (n=8). Los datos se presentan como variaciones medias y las barras de error indican un intervalo de confianza del 95%. También se presenta el valor en la línea basal y a los cuatro meses \pm SEM (error estándar de la media). *p<0,001.

- 40 La Figura 3 muestra que la leptina mejora la curva de glucosa tanto durante la tolerancia a la insulina como durante la tolerancia a la glucosa oral (n=9). Grupo A: Glucosa en plasma en respuesta a 0,2 U.kg de insulina intravenosa antes (círculos cerrados y línea continua) y cuatro meses después (círculos abiertos y línea de puntos) de la terapia con la leptina. Las barras de error indican un SEM *p<0,02. Grupo B: Glucosa en plasma en respuesta a 75 g de glucosa oral antes (círculos cerrados y línea continua) y cuatro meses después (círculos abiertos y línea de puntos) de la terapia con la leptina. Las barras de error indican un SEM. *p<0,01.

- 45 La Figura 4 muestra que la leptina reduce los triglicéridos. Los datos se presentan como la variación media desde la línea basal y las barras de error representan un intervalo de confianza del 95%. También se muestran los valores medios en la línea basal y a los cuatro meses con los rangos observados. Cabe señalar que los datos son asimétricos y no siguen una distribución normal. *p<0,001.

Descripción detallada de las realizaciones preferibles

- 55 La hormona leptina del adipocito desempeña una función central en la homeostasis de la energía. Fue descubierta por primera vez en el ratón obeso como el factor sérico ausente que reducía la ingesta de alimentos y el peso corporal tras su sustitución (Zhang et al., 1994; Pelleymounter et al., 1995). Debido a estas observaciones iniciales, gran parte de los intentos terapéuticos anteriores relacionados con el uso de esta hormona han estado dirigidos al tratamiento de la obesidad. En la mayoría de los seres humanos con obesidad, las concentraciones de leptina en suero son elevadas y se piensa que existe un estado de resistencia a la leptina (Mantzoros et al. 2000). Hasta ahora,

el efecto de la leptina humana recombinante para la pérdida de peso en individuos obesos ha sido limitado, salvo en el estado de deficiencia de leptina congénita (Heymsfield et al., 1999; Farooqi et al., 1999).

La presente invención prevé el uso de la leptina en el tratamiento de la lipoatrofia y sus anomalías metabólicas asociadas en seres humanos, como la hiperglicemia, dislipidemia, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, aterosclerosis, restenosis vascular y resistencia a la insulina. Los resultados de los estudios realizados en pacientes con el VIH han demostrado que la reducción de las concentraciones de leptina en suero está estrechamente relacionada con la aparición de la lipoatrofia adquirida. Por otra parte, la sustitución de leptina en pacientes lipoatróficos mejora notablemente el metabolismo de la glucosa y los triglicéridos, incluso después de que todas las demás terapias potenciales se hayan agotado. En todos estos casos de terapia de sustitución de la leptina, la concentración de leptina en suero de la línea basal era inferior a 4 ng/ml.

En un caso grave de lipoatrofia adquirida, el paciente (con una concentración de leptina en suero inferior a 0,5 ng/ml) sufría hipertrigliceridemia severa, diabetes, xantomas cutáneos eruptivos dolorosos y hepatomegalia masiva. El tratamiento con leptina durante cuatro meses mejoró de forma notable la hipertrigliceridemia y la hiperglicemia del paciente, lo que permitió interrumpir la plasmaféresis y otras medicaciones para la diabetes. Las mejoras también estuvieron acompañadas por la desaparición de los xantomas cutáneos y el volumen del hígado del paciente se redujo en un 40%. Por tanto, estos datos demuestran que la terapia de sustitución de leptina se puede utilizar de forma efectiva para tratar la lipoatrofia adquirida o congénita y sus anomalías metabólicas asociadas en seres humanos.

Por otra parte, basándose en estos datos, se puede extrapolar que los pacientes con una concentración de leptina en suero inferior a 4 ng/ml puede ser el grupo de pacientes preferible para la terapia de sustitución con leptina. Los niveles de leptina se pueden medir utilizando un fluido corporal, preferiblemente sangre o alguna porción de la misma. Aquí se utilizaron sueros de individuos. Otros fluidos corporales también pueden contener leptina medible, como la sangre completa, el líquido cerebroespinal, el plasma y posiblemente la orina. Las mediciones presentes de 4 ng de leptina/ml de suero pueden estar correlacionadas con los correspondientes niveles en otros fluidos corporales. Por ejemplo, si se emplea sangre completa, la concentración de leptina se diluirá para tener en cuenta el efecto diluyente de utilizar sangre no fraccionada.

De acuerdo con la presente divulgación, una persona cualificada en el campo podrá averiguar las dosis efectivas administrando leptina, un análogo o derivado de la leptina, y observando el efecto terapéutico deseado. El objetivo de la terapia de sustitución consiste en conseguir unas concentraciones casi fisiológicas de leptina en plasma. Se calcula que la dosis de sustitución fisiológica de la leptina es de unos 0,02 mg por kilogramo de peso corporal y día en los hombres de todas las edades, unos 0,03 mg por kilogramo y día en las mujeres menores de 18 años y unos 0,04 mg por kilogramo y día en las mujeres adultas. Cuando se intentan conseguir unas concentraciones casi fisiológicas de leptina, se puede, por ejemplo, tratar a un paciente con un 50% de la dosis de sustitución estimada en el primer mes de tratamiento, un 100% de la dosis de sustitución durante el segundo mes de tratamiento, un 200% de la dosis de sustitución durante el tercer mes de tratamiento, etc. Durante el transcurso de la terapia de sustitución de leptina, se pueden medir determinados marcadores bioquímicos para controlar el efecto terapéutico del tratamiento con leptina. Los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) y de triglicéridos (en ayunas) se encuentran entre los marcadores preferibles para medir el efecto terapéutico al objeto de controlar la eficacia del tratamiento con leptina.

Alternativamente, los niveles de leptina en suero se pueden medir empleando inmunoensayos disponibles en el mercado, como se divulga en los Ejemplos más adelante. En general, un ensayo de diagnóstico para medir la cantidad de leptina en sangre (o plasma o suero) puede emplearse primero para determinar los niveles endógenos de proteína. Estas herramientas de diagnóstico pueden ser en forma de un ensayo de anticuerpos, como un ensayo tipo sándwich de anticuerpos. La cantidad de leptina endógena se cuantifica inicialmente y se determina la línea basal. Las dosis terapéuticas se determinan como la cuantificación de proteína leptina endógena y exógena (es decir, leptina, análogo de leptina o derivado de leptina, que se encuentra en el organismo, tanto autoproducidos como administrados). Durante el transcurso de la terapia se siguen controlando los niveles de leptina del paciente.

[La presente divulgación también proporciona métodos para utilizar composiciones farmacéuticas de leptina, análogos de leptina o derivados de leptina. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser para administración por inyección, transdérmica o para otras formas de administración. Entre los métodos preferibles para la administración de proteína leptina se incluyen la vía subcutánea, sistémica y la terapia génica.

En general, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden cantidades efectivas de leptina, análogos de leptina o derivados de leptina, junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido de solución tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y potencia iónica; aditivos como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo,

ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (por ejemplo, tiomersal, alcohol bencílico) y sustancias de relleno (por ejemplo, lactosa, manitol); incorporación del material en preparaciones de partículas de compuestos poliméricos como el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico, etc. o en liposomas. También se puede emplear el ácido hialurónico y esto puede tener el efecto de favorecer la duración sostenida en la circulación. Estas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y el índice de eliminación *in vivo* de las proteínas y derivados presentes. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712, que se incorporan al presente como referencia. Las composiciones se pueden preparar en forma líquida o pueden ser en polvo seco, como la forma liofilizada. También se contemplan formulaciones de liberación sostenida implantables, como las formulaciones transdérmicas.

Para facilitar la disolución del agente terapéutico en el entorno acuoso, se puede añadir un tensioactivo como un agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos como el lauril sulfato de sodio, el dioctil sulfosuccinato de sodio y el dioctil sulfonato de sodio. Se pueden utilizar detergentes catiónicos, entre los que se podrían incluir el cloruro de benzalconio o el cloruro de bencetonio. La lista de potenciales detergentes no iónicos que podrían incluirse en la formulación como tensioactivos se compone de laurómacrogol 400, polioxil 40 estearato, polioxietileno de aceite de ricino hidrogenado 10, 50 y 60, glicerol monoestearato, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. Estos tensioactivos pueden encontrarse presentes en la formulación de la proteína o el derivado, solos o como una mezcla en diferentes proporciones.

Algunos aditivos que mejoran potencialmente la absorción de la proteína leptina, su análogo o derivado, son, por ejemplo, los ácidos grasos oleico, linoleico y linoléico.

Puede ser deseable una formulación de liberación controlada. La proteína leptina, su análogo o derivado, se podría incorporar a una matriz inerte que permite la liberación por difusión o por mecanismos de lixiviación, por ejemplo gomas. También se pueden incorporar matrices de degeneración lenta a la formulación, como alginatos y polisacáridos. Otra forma de liberación controlada de esta terapia es un método basado en el sistema terapéutico Oros (Alza Corp.), es decir que la proteína leptina, su análogo o derivado, se recubre de una membrana semipermeable, que permite entrar el agua y empujar la proteína hacia fuera a través de una única abertura pequeña, debido a los efectos osmóticos. Algunos revestimientos entéricos también tienen un efecto de liberación retardada.

Asimismo, la presente divulgación contempla kits mejorados para determinar la predisposición de un paciente humano con lipoatrofia a responder al tratamiento con leptina, con un análogo o derivado de la misma. En un aspecto de la divulgación, un kit mejorado puede proporcionar medios para determinar si el nivel de leptina del paciente anterior al mencionado tratamiento con leptina es inferior o igual a aproximadamente 4 ng/ml. En un aspecto relacionado de la divulgación, un kit mejorado puede tener en cuenta el sexo de un paciente a la hora de determinar su nivel de leptina anterior al mencionado tratamiento con leptina. En ese caso, el kit puede proporcionar medios para determinar si el nivel de leptina del paciente anterior al mencionado tratamiento con leptina es inferior o igual a aproximadamente 2 ng/ml, en el caso de que el paciente sea un hombre, o inferior o igual a aproximadamente 4 ng/ml, en el caso de que el paciente sea una mujer. Preferiblemente el kit contiene instrucciones de uso. El kit también puede contener reactivos, tubos, envases y/u otros componentes de la reacción.

Basándose en la descripción, una persona cualificada en el campo puede introducir modificaciones y variaciones en las realizaciones preferibles, sin desviarse del ámbito de aplicación de la invención.

EJEMPLO I

El siguiente ejemplo muestra que la evolución del síndrome de lipoatrofia asociada a VIH (HIV-LS) puede verse influida por un descenso de la leptina en suero, que contribuye a la acumulación, pérdida o redistribución de grasa corporal.

En particular, se realizó un estudio con el objeto de determinar si el fenotipo de la lipoatrofia en el HIV-LS está asociado con variaciones en la leptina sérica tras el comienzo de una terapia antirretroviral de alta actividad (HAART). Este estudio incluía a ciento cuarenta y seis (146) hombres VIH positivos cuyas concentraciones de leptina sérica se compararon antes y después de la HAART. A través de un examen físico, los hombres fueron explorados y clasificados en los dos principales fenotipos: lipoatrofia sola y lipoatrofia con aumento de grasa central (HIV-LS «mixto»).

De los 146 hombres, se descubrió que cuarenta y dos (42/146) presentaban una lipoatrofia o lipohipertrofia moderada o severa en más de una superficie corporal después de la HAART. Veintisiete de los 146 (27/146) tenían lipoatrofia solamente y quince (15/146) tenían variaciones «mixtas» tras la HAART. Treinta y nueve de los 146 (39/146) no presentaron cambios en la estructura corporal y estos pacientes sirvieron como controles. Por lo general, los hombres con HIV-LS eran mayores y habían empleado durante más tiempo inhibidores de la proteasa.

También tenían unos recuentos inferiores de CD4 en la línea basal y habían perdido una media de 4 kg de peso corporal desde ese momento.

Antes de la HAART, los niveles de leptina medios en la línea basal tanto para el grupo de la lipoatrofia como para el «mixto» eran de 3,6 ng/ml y el nivel de leptina medio para el control era de 4,1 ng/ml. En aquellos que desarrollaron lipoatrofia solamente tras la HAART, la concentración de leptina en suero se redujo notablemente, de 3,6 a 2,8 ng/ml (Wilcoxon $p = 0,006$). Por otra parte, los niveles de leptina en suero se mantuvieron estables tanto en el grupo de HIV-LS «mixto» (4,0 ng/ml) [$p=NS$] como en los 39 controles VIH positivos que no desarrollaron HIV-LS (3,7 ng/ml) [$P=NS$].

Estos datos sugieren que un nivel de leptina reducido tras la terapia antirretroviral de alta actividad en pacientes VIH positivos puede contribuir al desarrollo de un síndrome de lipoatrofia.

EJEMPLO II

Para determinar la eficacia del uso de la leptina en el tratamiento de la lipoatrofia en seres humanos, también se practicó una terapia de sustitución de leptina en nueve pacientes de sexo femenino a las que se les habían diagnosticado diversas formas de lipoatrofia. Las pacientes de este estudio fueron referidas por múltiples médicos de los Estados Unidos y Europa. Para poder participar, las pacientes tenían que presentar unos bajos niveles (definidos como una concentración de leptina en suero inferior a 3,0 ng/ml en los hombres y 4,0 ng/ml en las mujeres) asociados con la lipodistrofia y al menos una de las anomalías metabólicas siguientes: (1) presencia de diabetes mellitus según los criterios de la American Diabetes Association (véase Peters et al., 1998); (2) concentraciones séricas de triglicéridos en ayunas superiores a 200 mg/dL; y/o (3) concentraciones séricas de insulina en ayunas superiores a 30 μ U/ml. El diagnóstico de la lipodistrofia se basó en criterios clínicos bien conocidos por las personas cualificadas en el campo.

La Tabla 1 resumen las características clínicas de la línea basal de las pacientes tratadas en el estudio.

TABLA 1: Características de las pacientes

Paciente	Edad/sexo/tipo	Terapia hipolipemiente	Insulina ayunas ¹ (iU/mL)	Leptina ² (ng/mL)	RMR ³ (kcal/día)	Total grasa ⁴ (%)
NIH-1	17/F Adquirida Generalizada	Fenofibrato Atorvastatina Orlistat, Plasmaféresis Semanal	31,2	<0,5	2010	7
NIH-2	17/F Congénita Generalizada	Ninguna	334	1,0	2030	17
NIH-3	27/F Adquirida Generalizada	Ninguna	19	0,7	1570	18
NIH-4	17/F Congénita Generalizada	Ninguna	211	1,1	2480	17
NIH-5	15/F Congénita Generalizada	Ninguna	115	0,8	2670	15
NIH-6	37/F Congénita Generalizada	Ninguna	25	0,6	1370	15
NIH-7	42/F Familiar Parcial	Gemfibrozilo	40,3	3,6	1980	26
UTSW-1	31/F Congénita Generalizada	Fenofibrato	61,5	0,7	1702	8
UTS W-2 ^b	33/F Adquirida Generalizada	Gemfibrozilo	123	2,4	1497	14

¹ Insulina en ayunas, factor de conversión a pmol/L: 7,15X (cabe señalar que algunas pacientes siguen una terapia de insulina exógena)

² Factor de conversión a nmol/mL: 0/08X

³ Índice metabólico en reposo

5 ⁴ Obtenida mediante mediciones utilizando absorciometría de rayos X de doble energía, donde las mediciones son un 7-8% superiores que con la técnica de peso bajo el agua.

⁵ Paciente no diabética.

10 Los nueve pacientes participantes en el estudio eran mujeres. A pesar de que el estudio estaba abierto a ambos sexos, las mujeres tienden a ser reconocidas antes y con mayor frecuencia. Cinco de las nueve pacientes tenían lipodistrofia congénita generalizada o el síndrome de Seip-Berardinelli. Este diagnóstico se estableció por la evidencia de pérdida de grasa generalizada desde el nacimiento, en asociación con otros criterios clínicos (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM #269700; Garg et al., 1992). Tres pacientes parecían haber adquirido lipodistrofia generalizada con un historial de evidente pérdida de grasa en la niñez. Una de estas pacientes (UTSW-2) desarrolló lipodistrofia generalizada con dermatomiositis juvenil. Otras paciente (NIH-7) presentaba lipodistrofia parcial familiar tipo Dunnigan (OMIM # 151660; Gaig, 1999; y Cao et al., 2000).

Diseño del estudio

20 El estudio se diseñó como un estudio prospectivo abierto en el Diabetes Branch of National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), y en el University of Texas Southwestern (UT Southwestern) Medical Center de Dallas. Amgen Inc., (Thousand Oaks, CA) proporcionó metionil-leptina humana recombinante (leptina recombinante) para el ensayo. La respuesta de cada paciente se comparó con su estado en la línea basal. Dado el carácter excepcional de los síndromes de lipoatrofia y la variabilidad de las características clínicas, no fue factible incluir un grupo de control aleatorizado tratado con placebo. Las juntas de revisión institucionales del NIDDK y el University of Texas Southwestern Medical Center aprobaron el estudio. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de las pacientes o sus tutores legales.

30 Las pacientes fueron evaluadas como pacientes hospitalizadas en el Clinical Center of the National Institutes of Health y el the General Clinical Research Center of the University of Texas Southwestern Medical Center antes del tratamiento y también transcurridos 1, 2 y 4 meses de la terapia de leptina. Todas las pacientes recibieron dosis estables de medicaciones concomitantes durante al menos las seis semanas previas al comienzo de la leptina. Durante el estudio, se redujeron o interrumpieron los fármacos hipoglucémicos, según necesidad.

35 El objetivo de este estudio consistía en conseguir unas concentraciones de leptina casi fisiológicas en plasma. La dosis de sustitución fisiológica calculada era de 0,02 mg/kg/día para los hombres de todas las edades, 0,03 mg/kg/día para mujeres menores de 18 años y 0,04 mg/kg/día para mujeres adultas. La leptina recombinante se administró por vía subcutánea cada 12 horas. Es importante señalar que la dosis de sustitución es aproximadamente una décima parte de la dosis empleada habitualmente en los ensayos sobre obesidad. Las pacientes fueron tratadas con el 50% de la dosis de sustitución durante el primer mes, el 100% de la dosis de sustitución el mes siguiente y el 200% de la dosis de sustitución los dos meses siguientes. Las variables primarias para determinar la eficacia de la leptina recombinante eran la hemoglobina A_{1c} y los niveles séricos de triglicéridos en ayunas.

Análisis bioquímico

45 Los niveles séricos de glucosa y triglicéridos se determinaron mediante métodos estándar, empleando un equipo Hitachi automático (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) y un Beckman Instrument (Beckman, CA). La hemoglobina A_{1c} se determinó mediante cromatografía líquida de alta presión e intercambio iónico (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Los niveles séricos de ácidos grasos libres (FFA) se determinaron con un kit disponible en el mercado (Wako, Richmond, VA). Los niveles séricos de insulina se determinaron mediante inmunoensayos, empleando reactivos proporcionados por Abbott Imx Instrument (Abbott Park, IL) y un kit disponible en el mercado (Ltnco Research, Inc., St., Charles, MO). Los niveles séricos de leptina se determinaron mediante inmunoensayos, empleando un kit disponible en el mercado (Linco Research, Inc. St. Charles, MO).

Procedimientos

55 El gasto energético en reposo se midió utilizando Deltatrac Equipment (Sensormedics, Yorba Linda, CA). La prueba se realizó tras un ayuno nocturno de más de ocho horas en pacientes en reposo después de despertar, entre las 6.00 y las 8.00 horas. La prueba de tolerancia a la glucosa oral se realizó tras un ayuno nocturno, empleando 75 gramos de dextrosa. La glucosa en suero se midió a los -10, 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos de la carga de glucosa.

Se realizó una prueba de tolerancia a una dosis elevada de insulina utilizando 0,2 IU/kg de insulina regular para evaluar la sensibilidad a la insulina. La insulina se administró por vía intravenosa tras un ayuno nocturno. Las

muestras para la glucosa se recogieron a los -10, 0, 5, 10, 15, 20 y 30 de la administración de la insulina. La constante K (la tasa de desaparición de la glucosa como reflejo de la sensibilidad corporal total a la insulina) se calculó como la tasa constante para el descenso de la glucosa en sangre tras la insulina intravenosa, utilizando cinética de primer orden (Harrison et al., 1976).

5 La grasa corporal se determinó empleando un absorciómetro de rayos X de doble energía (DEXA, Hologic QDR 4500) (Hologic, Inc., Bedford, MA) (Lambrinouadaki et al., 1998). Se obtuvieron imágenes axiales ponderadas en T1 de resonancia magnética del hígado con un escáner 1,5 tesla (General Electric Medical Systems, Milwaukee) (Abate et al., 1994). Los volúmenes hepáticos se calcularon empleando un paquete de software de análisis de imágenes MEDx (Sensor Systems, Inc..., Sterling, VA), en una estación de trabajo Sun. Colocando un punto de siembra para un borde siguiendo un algoritmo, se trazaron los márgenes exteriores del hígado en cortes contiguos individuales. Entonces se calcularon los volúmenes hepáticos basándose en el área de píxeles y en el grosor del corte. Se pidió a los sujetos participantes en el centro NIH que informaran en la línea basal sobre los alimentos que habían ingerido en los tres últimos días y también a los cuatro meses, al objeto de calcular la ingesta de alimentos diaria estimada (Feskanich et al., 1993).

Análisis estadístico

20 Las mediciones se presentan como \pm SEM medio. Para comparar variables del estudio durante diversos periodos del mismo, se empleó un análisis de la varianza de medidas repetidas. Los datos asimétricos, como las concentraciones de triglicéridos y las constantes K calculadas, fueron sometidos a transformación logarítmica. Se utilizó el test t pareado para comparar los datos de la línea basal con diversos puntos temporales, cuando resultaba aplicable. Las concentraciones plasmáticas de glucosa durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral se compararon utilizando un análisis de la varianza de dos factores, con el período de estudio y el tiempo durante la prueba modelados como factores repetidos. Los intervalos de confianza del noventa y cinco por ciento de las diferencias entre las medias fueron obtenidos del análisis de la varianza y para las diferencias entre las medias (Hanh et al., 1991). Los cambios se consideraron estadísticamente significativos para $p < 0,05$. No se realizó ningún ajuste para las comparaciones simultáneas por lo que respecta a los análisis estadísticos de hipótesis específicas a priori.

Resultados

Características de las pacientes en la línea basal

30 Ocho de las nueve pacientes del estudio eran diabéticas y todas ellas eran hiperlipidémicas (Tabla 1). A todas las pacientes diabéticas se les administró farmacoterapia antes del estudio (Tablas 1 y 2) y cuatro de ellas recibieron farmacoterapia para el tratamiento lipídico (Tabla 1). La HbA_{1c} media de las pacientes diabéticas era de $9,1 \pm 0,5\%$ (normal: $< 5,6\%$). Los niveles medios de triglicéridos se elevaron a 1405 mg/dL (rango: 322-7,420 mg/dL; rango normal: 35-155 mg/dL) [16 mmol/L, rango: 3,6-8,7 mmol/L]. Los niveles de ácidos grasos libres (FFA) se incrementaron hasta triplicar prácticamente el límite máximo de la normalidad (1540 ± 407 $\mu\text{mol/L}$; normal: 350-550 $\mu\text{mol/L}$). Seis de las siete pacientes NIH tenían el hígado graso en el examen de ultrasonidos y de tamaño aumentado en la exploración física. Tres de las pacientes se sometieron a biopsias hepáticas y a dos de ellas se les diagnosticó una esteatohepatitis no alcohólica basándose en criterios histopatológicos (Manton et al. 2000; Berasain et al. 2000; Luyckx, et al. 2000).

40 La concentración media de leptina en suero era de $1,3 \pm 0,3$ ng/mL en la línea basal (Tabla 1) y aumentó con la terapia hasta $2,3 \pm 0,5$ ng/mL al final del primer mes, $5,5 \pm 1,2$ ng/mL al final del segundo mes y $11,1 \pm 2,5$ ng/mL al final del cuarto mes. Por tanto, la administración de leptina recombinante a las dosis empleadas en este estudio produjo unos niveles séricos de leptina aproximadamente normales en estas pacientes.

45 Efecto de la leptina sobre la primera paciente: ejemplo de un caso (Fig. 1)

La primera paciente tratada en el estudio (NIH-1) es la más gravemente afectada y su evolución es instructiva para demostrar el radical efecto de la sustitución de leptina en esta población, aún cuando todas las demás potenciales terapias se hayan agotado. Esta paciente nació sana, aunque experimentó una pérdida de grasa entre los 10 y los 12 años. Desarrolló una hipertrigliceridemia severa a los 13 y diabetes a los 14. Se presentó en el NIH Clinical Center a los 15, con unos niveles de triglicéridos constantemente superiores a 10.000 mg/dL (> 113 nmol/L) y diabetes con una HbA_{1c} del 9,5%. Tenía xantoma cutáneo eruptivo doloroso distribuido por todo el cuerpo y hepatomegalia masiva extendiéndose a la cresta ilíaca. Se añadió terapia de plasmaféresis semanal y Orlistat para aliviar la hipertrigliceridemia (Figura 1 A) (Bolan et al.). Otras características clínicas destacables incluían un apetito voraz (afirmó que ingería más de 3.200 kcal/día) y un índice metabólico en descanso notablemente elevado de 2.010 kcal/día, 180% de lo previsto. Durante un periodo de cuatro meses, la leptina recombinante provocó una mejora progresiva notable en la hipertrigliceridemia e hiperglicemia que permitió interrumpir la plasmaféresis y la medicación para la diabetes (Figura 1A). Las mejoras de los parámetros

metabólicos estuvieron acompañadas por la desaparición del xantoma cutáneo. Por otra parte, el volumen de su hígado se redujo en un 40% (de 4.213 mL en la línea basal a 2.644 mL a los cuatro meses, como se muestra en la Figura 1B).

La leptina mejoró el control metabólico en todas las pacientes lipoatróficas diabéticas

5 Antes de comenzar la terapia de leptina, las ocho pacientes lipoatróficas diabéticas tenían un mal control metabólico. Con cuatro meses de terapia de sustitución de leptina, la HbA_{1c} descendió una media de 1,9 puntos porcentuales (95% CI, 1,1 a 2,7 %, p=0,0012) (Fig. 2). Las respuestas individuales de las pacientes se muestran en la Tabla 3. Cabe señalar que el control glicémico mejoró, a pesar de haberse reducido o interrumpido la terapia contra la diabetes de la línea basal (Tabla 2)

10 **Tabla 2: Cambios en la terapia hipoglicémica durante el estudio**

Paciente	Terapia hipoglicémica durante el periodo de la línea basal	Terapia hipoglicémica a los 4 meses de terapia
NIH-1	Metformina (500 mg bid) Acarbosa (50 mg tid)	Ninguna
NIH-2	Insulina (800 U/día)	Ninguna
NIH-3	Insulina (40U/día) Metformina (500 mg tid)	Ninguna
NIH-4	Insulina (1200 U/día)	Ninguna
NIH-5	Insulina (3000 U/día)	Ninguna
NIH-6	Metformina (500 mg tid)	Ninguna
NIH-7	Insulina (200 U/día) Proglitazona (45 mg qd)	Insulina (60 U/día)
UTSW-1	Insulina (700 U/día)	Insulina (300 U/día)
UTSW-2 Paciente no diabética	Ninguna	Ninguna

15 Los niveles de glucosa en plasma durante la prueba de tolerancia a la insulina demostraron una significativa mejora al final de los cuatro meses en comparación con la línea basal (Fig. 3A). El valor K (tasa de desaparición de la glucosa) se incrementó de 0,0071±0,0012 a 0,0169±0,0039 lo que indica una mejora de la sensibilidad a la insulina de todo el organismo (p=0,035). Por otra parte, la tolerancia a la glucosa oral también mejoró de forma notable con respecto a la línea basal (Figura 3B).

Después de cuatro meses con terapia de leptina recombinante, los niveles de triglicéridos en ayunas cayeron un 60% (CI, 43 a 77%, p<0,001, Fig. 4). Durante este mismo periodo, los ácidos grasos libres en ayunas cayeron de 1540±407 µmol/L a 790±164 µmol/L (p=0,045). Las respuestas individuales se muestran en la Tabla 3.

20 **Tabla 3: Parámetros metabólicos de las pacientes durante las diferentes fases de la terapia**

Pacientes	HbA _{1c} (%)				Triglicéridos ¹ (mg/dL)				Ácidos grasos libres ² (pmol/L)			
	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4
Mes ³												
NIH-1	8,6	7,6	7,4	7,0	7420	6440	1632	1214	3977	3517	2216	1701
NIH-2 ⁴	9,8	8,3	7,4	10,0	633	523	471	405	2922	1452	1372	1244
NIH-3	9,3	7,8	8,4	7,9	450	579	233	281	919	368	451	454
NIH-4	7,6	6,7	6,1	5,0	322	232	160	106	1838	1388	866	446
NIH-5	9,5	9,4	6,5	6,1	913	427	143	123	1066	1842	723	629
NIH-6	9,2	8,6	7,2	7,4	663	355	242	303	1672	1367	1315	428
NIH-7	9,5	8,4	7,4	6,6	802	366	295	215	384	315	306	345
UTSW-1	9,5	8,1	7,5	7,3	995	827	383	192	560	360	525	560
UTSW-2 ^b	5,4	4,8	5,0	5,1	447	656	276	424	520	630	1690	1310

¹Niveles plasmáticos de triglicéridos en ayunas, factor de conversión a mmol/L: 0,1129X, normal 35-155 mg/dL

²Niveles de ácidos grasos libres en ayunas, normal 135-550 pmol/L

³Mes de terapia, 0 se refiere al periodo de evaluación de la línea basal

⁴Esta paciente tuvo un incumplimiento del tratamiento entre los meses de terapia tercero y cuarto. Después de dos meses de cumplimiento estricto documentado mediante los viales de medicación utilizada, los parámetros registrados fueron respectivamente: 7.3%, 283 mg/dL y 799 pmol/L

⁵Paciente no diabética

5 Variaciones del volumen hepático y pruebas funcionales hepáticas

El volumen hepático medio en la línea basal era de 3097±391 mL (unas cuatro veces más elevado que el de los individuos de peso normal de la misma edad y del mismo sexo). La leptina redujo el volumen del hígado una media de un 28% (CI, 20 a 36%) con respecto a la línea basal. La reducción media del volumen hepático fue de 987 mL (CI, 546 a 1428 mL, $p=0,0024$). La reducción del tamaño del hígado estuvo asociada con una mejora en las pruebas de la función hepática. Las concentraciones de alanina-transaminasa de la línea basal cayeron de 66±16 U/L a 24±4 U/L al final de los cuatro meses ($p=0,023$). De igual modo, las concentraciones séricas de transaminasa aspártica fueron de 53±12 U/L en la línea basal y 21±2 U/L al final de los cuatro meses ($p=0,03$).

15 Variaciones en el equilibrio energético

La ingesta calórica diaria comunicada por las propias pacientes se redujo en gran medida desde la línea basal de 2.680±250 kcal/día a 1600±150 kcal/día ($p=0,005$, $n=7$). También se produjo un descenso paralelo en el índice metabólico en reposo medido de 1920±150 kcal/día a 1580±80 kcal/día ($p=0,003$, $n=9$).

20 Todos los sujetos menos uno (NIH-3) habían experimentado una pérdida de peso al final de los cuatro meses. La pérdida de peso media fue de 3,6±0.9 kg con un rango entre -1,7 y 7.3 kg. Una fracción importante de la pérdida de peso (50-65%) se puede atribuir a la pérdida de peso del hígado.

Tolerabilidad y eventos adversos

25 No se documentaron ni observaron reacciones cutáneas en los sitios de la inyección. No se registró ninguna tendencia a efectos adversos en los parámetros bioquímicos o hematológicos rutinarios. La paciente NIH-1 tuvo un episodio severo de náuseas y vómitos tras la primera dosis. La paciente NIH-6 sufrió un empeoramiento de la hipertensión tras la segunda dosis, asociado a sofocos.

30 La paciente NIH-7 estuvo hospitalizada debido a una infección por estreptococo durante el tercer mes de terapia. Ninguno de estos eventos se repitió con la continuación de la terapia.

Debate

35 En este estudio, la sustitución de leptina conllevó unos beneficios metabólicos claros y notables para un grupo de pacientes con lipodistrofia y deficiencia de leptina. Durante el estudio, la sustitución con leptina recombinante produjo una mejora de la HbA_{1c} de 1,9 puntos porcentuales, lo que se prevé que reduzca los riesgos relativos de desarrollar una retinopatía en ~22% en la población diabética (UK PDS, 1998). Por otra parte, los niveles de triglicéridos cayeron un 60%, lo que se prevé que reduzca el riesgo relativo de eventos cardiovasculares en la población general en un 35-65% (Kieisberg, 1998; Garg, 2000).

45 Estos resultados proporcionan una nueva percepción de los mecanismos de acción de la leptina. La señal de la leptina parece regular la sensibilidad corporal total a la insulina y los niveles de triglicéridos, además de su función conocida en el control de la homeostasis de la energía. Este estudio es la primera prueba *in vivo* en seres humanos de que la leptina funciona como agente sensibilizador a la insulina y de ahorro de insulina.

A pesar de que no se empleó un diseño del estudio aleatorizado, el peso de la prueba sugiere que la mejora del control metabólico estuvo provocada por la leptina y no por una mejora del cumplimiento de la terapia asociada con la participación en un estudio. De hecho, la magnitud y reproducibilidad de la mejora de la HbA_{1c} son más coherentes con el efecto de un fármaco que con un efecto placebo. A pesar de la heterogeneidad de las pacientes incluidas en nuestro estudio, observamos una mejora uniforme del control metabólico en todas las pacientes diabéticas. Se registró una evidencia de incumplimiento en la paciente NIH-2, lo que explica el empeoramiento de su HbA_{1c} entre los meses segundo y cuarto, que fue corregido con la terapia prolongada (Tabla 3). El abandono de los fármacos de esta paciente que había experimentado una mejora representa una evidencia sólida de que el efecto sobre unos niveles de HbA_{1c} mejorados es consecuencia de la administración de leptina.

Efecto de la leptina sobre la ingesta de alimentos

Se sabe que el hecho de limitar la ingesta calórica en la diabetes lipoatrófica mejora las anomalías asociadas con la glucosa y los lípidos (Trygstad et al., 1977). Sin embargo, los pacientes tienen dificultades para cumplir las limitaciones en las comidas debido a su apetito. La leptina redujo claramente la ingesta de alimentos en estas pacientes. Se realizó un estudio limitado con la paciente NIH-1 para determinar el efecto de la reducción de la ingesta de alimentos sobre los parámetros metabólicos. En el hospital, se sometió a 9 días de retirada de la leptina con una ingesta calórica limitada a los niveles previos a la retirada. A pesar de seguir una dieta constante, sus concentraciones de glucosa, triglicéridos e insulina en ayunas aumentaron en el plazo de 48 horas. Estas observaciones indican que la leptina afecta a la sensibilidad a la insulina y al metabolismo de los triglicéridos, independientemente de sus efectos sobre la ingesta de alimentos. Se han documentado datos similares empleando experimentos de alimentación pareada en ratones lipoatróficos con o sin administración de leptina (Shimomura et al., 1999; Ebihara et al., 2001).

Correlación con modelos de ratón

Los diversos modelos de ratón de lipoatrofia sugirieron que la ausencia de tejido adiposo es la causa de la resistencia a la insulina en este síndrome (Burant et al., 1997; Moitra et al., 1998; Shimomura et al., 2000). La demostración de que el trasplante de tejido adiposo a ratones lipoatróficos mejora de forma notable la resistencia a la insulina y el control metabólico respalda firmemente esta hipótesis (Gavrilova et al., 2000). No obstante, no estaba claro por qué el tejido adiposo era necesario para mantener la sensibilidad a la insulina del organismo en general. Las observaciones y los resultados debatidos anteriormente, junto con Shimomura et al. más arriba, sugieren que la mayoría de la acción reguladora del tejido adiposo sobre la sensibilidad a la insulina del organismo en general actúa a través de la leptina.

Un posible mecanismo por el que la leptina regula tanto la sensibilidad a la insulina como el metabolismo de los lípidos se puede basar en SREBP1c, un factor de transcripción que estimula la lipogénesis. En el hígado, el SREBP1c es regulado al alza por la hiperinsulinemia observada en la lipoatrofia. La deficiencia de leptina y la hiperinsulinemia causan una regulación a la baja del sustrato del receptor de insulina, IRS-2, obstaculizando la acción de la insulina y aumentando la producción de glucosa hepática. El incremento de la lipogénesis y de la producción de glucosa hepática generan un círculo vicioso: el aumento de los niveles de lípidos en los tejidos está asociado con una reducción de la sensibilidad a la insulina del organismo en general y, por tanto, con una mayor producción de glucosa hepática. Se ha demostrado que la sustitución de leptina corrige este círculo vicioso. A pesar de que la tasa de síntesis de triglicéridos no se ha estudiado en seres humanos con lipoatrofia, los estudios calorimétricos indirectos proporcionan ciertas evidencias de que la lipogénesis podría efectivamente desregularse (Arioglu et al., 2000). Otra observación fue el descenso del gasto energético en reposo en las pacientes tratadas en este estudio. Esto se puede deber a la disminución de la ingesta de alimentos resultante en una reducción de la termogénesis inducida por la dieta.

Leptina: una hormona antiesteatosis

Se ha documentado que la administración de leptina en ratas Zucker produce una corrección de la esteatosis en diversos órganos que actúan como puntos de acumulación de lípidos, tales como las células islotes del hígado o las células del corazón (Unger, 1995; Unger et al., 1999). La acumulación de lípidos fuera de los adipocitos puede ser un fenómeno de desbordamiento provocado por el hecho de que los adipocitos han alcanzado su capacidad máxima para almacenar triglicéridos. En la lipodistrofia, estos órganos son los únicos puntos que pueden almacenar lípidos. El tratamiento con leptina en ratones con lipodistrofia causa una importante reducción de las reservas de triglicéridos en el hígado. Al mismo tiempo, la terapia con leptina en seres humanos con lipodistrofia genera una destacada y sumamente significativa reducción de los volúmenes hepáticos.

Momento de la sustitución de leptina

El concepto de que el tejido adiposo es un órgano endocrino estuvo firmemente respaldado por el descubrimiento de la leptina. La leptina tiene efectos, tanto directos como indirectos, sobre los principales órganos del metabolismo, incluyendo el cerebro, el hígado, los músculos, la grasa y el páncreas. Obviamente la leptina no es la única señal de los adipocitos en circulación. Por ejemplo, otra hormona de los adipocitos es la proteína relacionada con el complemento específico de los adipocitos (ACRP) 30/Adiponectina/AdipoQ que parece ser importante para inducir la oxidación de las grasas en el músculo y el hígado (Yamauchi et al., 2001; Fruebis et al., 2001; Berg et al., 2001). La falta de adipocitos resultaría en una deficiencia de todas las señales derivadas de las grasas y todavía por descubrir, contribuyendo así a muchas de las anomalías observadas en los síndromes que se caracterizan por la ausencia de grasa. Este estudio es el primero realizado con seres humanos que analiza la eficacia metabólica de sustituir una hormona derivada de la grasa en un estado de deficiencia de grasa. Parece que la deficiencia de leptina es el factor que más contribuye (aunque probablemente no el único) a las anomalías metabólicas observadas en relación con la

lipoatrofia. Por tanto, este estudio subraya una razón importante para considerar la terapia de sustitución de leptina en seres humanos, en concreto una lipodistrofia severa.

EJEMPLO III

5 La secuencia de aminoácidos de la metionil-leptina humana recombinante madura se recoge en el presente como SEC. ID. N° 1, donde el primer aminoácido de la proteína madura es valina (en la posición 1) y un residuo de metionil se encuentra en la posición -1 (denominada en el presente rHu-Leptina 1-146, SEC. ID. N° 1)

V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V
 T R I N D I S H T Q S V S S K Q K V T G
 L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L
 A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N

10

D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L
 P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G
 Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W
 Q L D L S P G C

15

Alternativamente, se puede emplear una variante natural de la leptina humana, que tiene 145 aminoácidos y que, a diferencia de la rHu-Leptina 1-146, tiene una glutamina ausente en la posición 28, que se recoge a continuación (denominada en el presente rHu-Leptina 1-145, SEC. ID. N° 2, donde la posición en blanco («*») indica que no hay ningún aminoácido).

V P I Q K V Q D D T K T L I K T I V
 T R I N D I S H T * S V S S K Q K V T G
 L D F I P G L H P I L T L S K M D Q T L
 A V Y Q Q I L T S M P S R N V I Q I S N
 D L E N L R D L L H V L A F S K S C H L
 P W A S G L E T L D S L G G V L E A S G
 Y S T E V V A L S R L Q G S L Q D M L W
 Q L D L S P G C

20

Otros ejemplos de proteínas leptinas, análogos, derivados, preparaciones, formulaciones, composiciones farmacéuticas, dosis y vías de administración se han descrito con anterioridad en las siguientes Solicitudes PCT, que quedan incorporadas al presente como referencia como si se recogiesen íntegramente en el mismo. Número de publicación internacional PCT WO 96/05309; WO 96/40912; WO 97/06816; WO 00/20872; WO 97/18833; WO 97/38014; WO 98/08512 y WO 98/28427.

25

Las proteínas leptinas, análogos y moléculas relacionadas también se documentan en las publicaciones siguientes. No obstante, no se realiza ninguna manifestación con respecto a la actividad de ninguna de las composiciones documentadas.

Patentes estadounidenses nº 5.521.283; 5.525.705; 5.532.336; 5.552.522; 5.552.523; 5.552.524; 5.554.727; 5.559.208; 5.563.243; 5.563.244; 5.563.245; 5.567.678; 5.567.803; 5.569.743; 5.569.744; 5.574.133; 5.580.954; 5.594.101; 5.594.104; 5.605.886; 5.614.379; 5.691.309; 5.719.266 (Eli Lilly and Company);

5 PCT WO96/23513; WO96/23514; WO96/23515; WO96/23516; WO96/23517; WO96/23518; WO96/23519; WO96/34111; WO 96 37517; WO 96/27385; WP 97/00886; EP 725078; EP 725079; EP 744408; EP 745610; EP 835879 (Eli Lilly and Company);

10 PCT WO96/22308 (Zymogenetics);
 PCT WO96/31526 (Amylin Pharmaceuticals, Inc.)
 PCT WO96/34885; WO 97/46585 (SmithKline Beecham, PLC);
 PCT WO96/35787 (Chiron Corporation);
 15 PCT WO97/16550 (Bristol-Myers Squibb);
 PCT WO 97/20933 (Schering Corporation);
 EP 736599 (Takeda);
 EP741187 (F. Hoffman La Roche).

20 En la medida en que estas referencias proporcionen proteínas leptinas útiles, análogos de las mismas, o composiciones o métodos asociados, dichas composiciones y/o métodos se podrán emplear conjuntamente con los presentes métodos.

EJEMPLO IV

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, se puede emplear un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para determinar los niveles de leptina en suero de los pacientes lipoatróficos. El método ELISA puede emplear un anticuerpo anti-rmetHu-Leptina monoclonal de rata purificado para capturar la leptina del suero.
 25 También se puede emplear un anticuerpo policlonal anti-rmetHu-leptina de conejo purificado por afinidad conjugado con peroxidasa de rábano para detectar la leptina capturada. El límite de detección del mencionado ensayo empleando estos anticuerpos puede estar en el rango de 0,5-0,8 ng/ml. Aunque se han podido emplear determinados anticuerpos, los anticuerpos preferibles son aquellos que reaccionan específicamente con la leptina humana nativa y que son sensibles para detectar cantidades de leptina iguales o inferiores a 5 ng/ml en suero.

30 Preferiblemente, el momento para determinar los niveles de leptina de la línea basal de un paciente es después de 8-12 horas de ayuno, como durante las horas de la mañana. Los niveles de leptina de la línea basal no se deben confundir por el aumento de los niveles observado después de comer o debido a la subida durante el ciclo de sueño que se observa en la mayoría de los individuos (por ejemplo, el aumento de los niveles de leptina que se produce a las tres de la mañana). Estos niveles de la línea basal se pueden emplear, por ejemplo, para observar la elevación
 35 nocturna de los niveles de leptina, aunque deben ser comparados con niveles similares de pacientes en una situación similar.

Basándose en los anteriores datos, se puede aplicar un método para determinar la predisposición de los pacientes lipoatróficos al tratamiento con leptina, estableciendo el nivel de leptina correspondiente a la concentración sérica de leptina y averiguando si la concentración sérica de leptina es de unos 4 ng/ml o inferior.
 40

Referencias citadas

- 45 1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Lepold L., Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994; 372:425-32.
2. Cosidine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med 1996; 334:292-5.
- 50 3. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al, Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature 1996: 382:250-2.
4. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early onset obesity in humans. Nature 1997; 387:903-8.
- 55 5. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G. et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. N Engl J Med 1999; 341:8 79-84.
6. Reitman ML, Arioglu E, Gavrilova O, Taylor SI. Lipoatrophy revisited. Trends Endocrinol Metab. 2000; 11:410-6.

7. Lawrence RD. Lipodystrophy and hepatomegaly with diabetes, lipaemia, and other metabolic disturbances: a case throwing new light on the action of insulin. *Lancet* 1946; 1:724-731 and 773- 775.
- 5 8. Magre J, Delepine M, Khallouf E, et al., Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13 *Nat Genet* 2001;28:365-70.
9. Gavrilova O, Marcus-Samuels B; Graham D, et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipodystrophic mice. *J Clin Invest* 2000; 105:271-8.
- 10 10. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL., c Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999; 401:73-6.
11. Peters AL, Schriger DL. The new diagnostic criteria for diabetes: the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. *Am J Med* 1998; 105:15s-19s
- 15 12. Garg A, Fleckenstein JL, Peshock RM, Grundy S. Peculiar distribution of adipose tissue in patients with congenital generalized lipodystrophy,. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:358-61.
13. Garg A Peshock RM, Fleckenstein JL, Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety), *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:170-4.
- 20 14. Cao H, Hegele RA, Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2000; 9:109-12.,
15. Harrison LC, Martin FI, Melick R4. Correlation between insulin receptor binding in isolated fat cells and insulin sensitivity in obese human subjects. *J Clin Invest* 1976; 58:1435-41.
- 25 16. Lambrinoudaki I, Georgiou E, Douskas G, Tsekos G, Kyriakidis M, Proukakis C. Body composition assessment by dual-energy x-ray absorptiometry: comparison of prone and supine measurements, *Metabolism* 1998; 47:1379-82..
- 30 17. Abate N, Bums D, Peshock RM, Garg A, Grundy SM. Estimation of adipose tissue mass by magnetic resonance imaging: validation against dissection in human cadavers. *J Lipid Res* 1994; 35:1490-6.
18. Feskanich D, Rimm EB, Giovannucci EI, et al., Reproducibility and validity of food intake measurements from a semiquantitative food frequency questionnaire, *J Am Diet Assoc* 1993; 93:790-6,
- 35 19. Hahn G, Meeker W. *Statistical Intervals: a guide to practitioners*, Nueva York: John Wiley and Sons, 1991.
20. Manton ND, Lipsett J, Moore DJ, Davidson GP, Bourne AT, Couper RT. Nonalcoholic steatohepatitis in children and adolescents, *Med J Aust* 2000; 173:476-9.
- 40 21. Berasain C, Betes M, Panizo A, et al. Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasaemia of unknown etiology. *Gut* 2000;47:429-35.
22. Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* 2000; 26:98-106.
- 45 23. Bolan C, Arioglu E, Gorden E, Taylor S, Lietman S. Intensive, long-term plasma exchange therapy for severe hypertriglyceridemia in acquired generalized lipodystrophy, *J Clin Endocrinol and Metab* (presentado).
24. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or- insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352:837-53.
- 50 25. Kreisberg-R.A. Diabetic dyslipidemia, *Am J Cardiol* 1998; 82:67U-73U
- 55 26. Gotto AM, Jr. Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease, *Am J Cardiol* 1998; 82:22Q-25Q..
27. Garg A, Lipodystrophies, *Am J Med* 2000; 108:143-52.
28. Arioglu E, Duncan-Morin J, Sebring N, et al. Efficacy and safety of troglitazone in the treatment of lipodystrophy syndromes. *An Intern Med* 2000; 133:263-74.
- 60 29. Trygstad O, Seip M, Oseid S, Lipodystrophic diabetes treated with fenfluramine. *Int J Obes* 1977: 1:287-92.

30. Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, et al. Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipoatrophic diabetes. *Diabetes* 2001; 50:1440-8.
- 5 31. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269:546-9.
32. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269:543-6.
- 10 33. Pellemounter MA, Cullen JM, Baker MB, et al.. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice., *Science* 1995; 269:540-3.
34. Mantzoros CS, Flier JS.. Editorial: leptin as a therapeutic agent-trials and tribulations. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4000-2.
- 15 35. Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial [véanse los comentarios] *Jama* 1999; 282:1568-75.
- 20 36. Burant CF, Sreenan S, Hirano K, et al. Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J Clin Invest* 1997; 100:2900-8.
37. Moitra J, Mason MM, Olive M, et al. Life without white fat; a transgenic mouse. *Genes Dev* 1998; 12: 3168-81.
- 25 38. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy *Genes Dev* 1998; 12:3182-94.
39. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice, *Mol Cell* 2000; 6:77-86
- 30 40. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM, Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995; 44:863-70.
- 35 41. Unger RH, Zhou YT, Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:2327-32.
42. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7:941-6.
- 40 43. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:2005-10.
- 45 44. Berg AH, Cumbs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7:947-53.

50 **Las siguientes cláusulas forman parte de la divulgación:**

1. Un método para determinar una predisposición de un paciente lipoatrófico para responder al tratamiento con leptina, un análogo o derivado de la leptina, comprendiendo dicho método:
- 55 (a) la determinación del nivel de leptina del paciente antes de dicho tratamiento; y
 (b) la averiguación de si el nivel de leptina es inferior o igual a aproximadamente 4 ng/ml.
2. El método de la cláusula 1, donde dicho paciente es un hombre y dicho nivel de leptina es inferior o igual a aproximadamente 2 ng/ml antes del tratamiento.
- 60 3. El método de la cláusula 1, donde dicho paciente es una mujer.

4. Un método para determinar una predisposición de un paciente lipoatrófico para responder al tratamiento con leptina, un análogo o derivado de la leptina, comprendiendo dicho método:
- 5 (a) la determinación del nivel de leptina del paciente antes de dicho tratamiento; y
(b) la averiguación de si el nivel de leptina de (i) un paciente de sexo masculino es inferior o igual a aproximadamente 2 ng/ml, o (ii) un paciente de sexo femenino es inferior o igual a aproximadamente 4 ng/ml.
5. El método de cualquiera de las cláusulas 1-4, donde dicho nivel de leptina se determina mediante un inmunoensayo con anticuerpo.
- 10 6. Un método para tratar la lipoatrofia, que comprende un régimen farmacéutico consistente en una combinación de inhibidor de proteasa y leptina, un análogo o derivado de la leptina.
- 15 7. Un método para tratar la lipoatrofia, que comprende un régimen farmacéutico consistente en una combinación de leptina, un análogo o derivado de la leptina, y al menos un compuesto seleccionado del grupo compuesto por tiazolidinedionas, fibratos, estatinas y metformina.
- 20 8. Un método para tratar a un ser humano con anomalías metabólicas asociadas con la lipoatrofia, consistente en administrar leptina, un análogo o derivado de la leptina.
9. Un método para tratar a un paciente humano con una condición de lipoatrofia, donde dicha lipoatrofia es una forma adquirida de la enfermedad, que consiste en administrar al paciente una dosis efectiva de leptina, un análogo o derivado de la leptina.
- 25 10. El método de la cláusula 10, donde la forma adquirida de lipoatrofia está relacionada con el tratamiento de un paciente VIH positivo sometido a una terapia antirretroviral de alta actividad (HAART).
- 30 11. Un kit mejorado para determinar la predisposición de un paciente humano con lipoatrofia para responder a un tratamiento con leptina, un análogo o derivado de la leptina, consistiendo esta mejora en medios para determinar si el nivel de leptina del paciente antes del mencionado tratamiento con leptina es:
- (i) inferior o igual a unos 2 ng/ml, si dicho paciente es un hombre, o
(ii) inferior o igual a unos 4 ng/ml, si dicho paciente es una mujer.

35

40

45

50

55

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Amgen, Inc.
DePaoli, Alexander M.
Garg, Abhimanyu
Oral, Elif A.
Taylor, Simeon I.
- <120> Uso de leptina para el tratamiento de la lipoatrofia humana y método para determinar la predisposición a dicho tratamiento
- 10 <130> 1311EP-D1
- <150> EP02793811.7
- <151> 22-10-2002
- <150> PCT/US02/033875
- <151> 22-10-2002
- 15 <150> US 60/336,394
- <151> 22-10-2001
- <160> 2
- <170> Versión de la patente 3.4
- 20 <210> 1
- <211> 146
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia artificial: Leptina recombinante humana 146 (rHu-Leptina 1-146)

ES 2 418 954 T3

<400> 1

Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
20 25 30

Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
35 40 45

Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
50 55 60

Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
65 70 75 80

Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
85 90 95

His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
100 105 110

Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 2

<211> 145

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial: Leptina recombinante humana 145 (rHu-Leptina 1-145)

ES 2 418 954 T3

<400> 2 .

Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15

Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Ser Val Ser Ser Lys
 20 25 30

Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu
 35 40 45

Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60

Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
 65 70 75 80

Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His
 85 90 95

Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val
 100 105 110

Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125

Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro Gly
 130 135 140

Cys
 145

REIVINDICACIONES

1. Una proteína leptina para su uso en un método para tratar la lipoatrofia o una anomalía metabólica asociada con la misma en un paciente humano con lipoatrofia, donde el método consiste en la administración al paciente de una dosis de la proteína leptina efectiva para tratar la lipoatrofia o la anomalía metabólica asociada con la misma.
- 5 2. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 1, donde dicha proteína leptina se administra junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable o donde dicha proteína leptina se administra en un diluyente farmacéuticamente aceptable.
3. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 1, donde dicho paciente tiene un nivel de leptina de 4 ng/ml o inferior antes de la administración de la proteína leptina y preferiblemente donde el paciente tiene un nivel de leptina de 2 ng/ml o inferior antes de la administración de la proteína leptina.
- 10 4. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 1, donde el paciente tiene una forma adquirida de lipoatrofia; preferiblemente donde el paciente es VIH positivo; más preferiblemente, donde la forma adquirida de lipoatrofia está relacionada con el tratamiento del paciente VIH positivo con terapia antirretroviral de alta actividad (HAART).
- 15 5. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 1, donde el paciente tiene una forma congénita de lipoatrofia; preferiblemente, donde la forma congénita de lipoatrofia es la lipoatrofia congénita generalizada.
6. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 1, donde la anomalía metabólica se selecciona del grupo compuesto por hiperglicemia, dislipidemia, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, aterosclerosis, restenosis vascular, hígado graso, esteatohepatitis, hepatomegalia, diabetes y resistencia a la insulina; o donde la anomalía metabólica comprende diabetes; o donde la anomalía metabólica comprende resistencia a la insulina; o donde la anomalía metabólica comprende hipertrigliceridemia; o donde las anomalías metabólicas comprenden hígado graso; o donde las anomalías metabólicas comprenden esteatohepatitis.
- 20 7. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 1, donde la lipoatrofia comprende hepatomegalia; o donde la lipoatrofia comprende una anomalía en la distribución del tejido graso; o donde la lipoatrofia comprende esteatohepatitis; o donde la lipoatrofia comprende hígado graso.
- 25 8. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 1, donde dicha proteína leptina se administra por vía subcutánea.
9. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 8, donde dicha proteína leptina se selecciona del grupo compuesto por metionil-leptina recombinante humana, SEC. ID. N° 1, y SEC. ID. N° 2; preferiblemente, donde dicha proteína leptina se administra junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable; o donde dicha leptina se administra en un diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30 10. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 1, donde dicha proteína leptina es metionil-leptina recombinante humana; o donde dicha leptina recombinante humana es la SEC. ID. N° 1; o donde dicha leptina recombinante humana es la SEC. ID. N° 2.
- 35 11. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 1, en combinación con:
- a. un inhibidor de proteasa; o
- b. al menos un compuesto seleccionado del grupo compuesto por tiazolidinedionas, fibratos, estatinas y metformina,
- 40 para formar un régimen farmacéutico para su uso en un método para tratar la lipoatrofia o una anomalía metabólica asociada con la misma en un paciente humano con lipoatrofia, donde el método consiste en la administración al paciente de una cantidad del régimen farmacéutico que es efectiva para tratar la lipoatrofia o la anomalía metabólica asociada con la misma.
12. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 1, para emplearla en un método de tratamiento de un ser humano que presenta al menos una anomalía metabólica asociada con la lipoatrofia, que comprende la administración de la proteína leptina a una dosis efectiva para tratar la anomalía metabólica asociada con la lipoatrofia.
- 45 13. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 12, donde esta anomalía metabólica se selecciona del grupo compuesto por hiperglicemia, dislipidemia, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, aterosclerosis, restenosis vascular, hígado graso, esteatohepatitis y resistencia a la insulina; o donde esta anomalía metabólica comprende diabetes; o donde esta anomalía metabólica comprende resistencia a la insulina; o donde esta anomalía metabólica comprende hipertrigliceridemia; o donde esta anomalía metabólica comprende hígado graso; o donde esta anomalía metabólica comprende esteatohepatitis.
- 50

14. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 12, donde dicha proteína leptina se administra por vía subcutánea.

5 15. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 12, donde dicha proteína leptina se selecciona del grupo compuesto por metionil-leptina recombinante humana, SEC. ID. N° 1, y SEC. ID. N° 2; preferiblemente, donde dicha proteína leptina se administra junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable; o donde dicha leptina se administra en un diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 16. La proteína leptina para su uso conforme a la reivindicación 12, donde dicha proteína leptina es metionil-leptina recombinante humana; o donde dicha leptina recombinante humana es la SEC. ID. N° 1; o donde dicha leptina recombinante humana es la SEC. ID. N° 2.

15

20

25

30

35

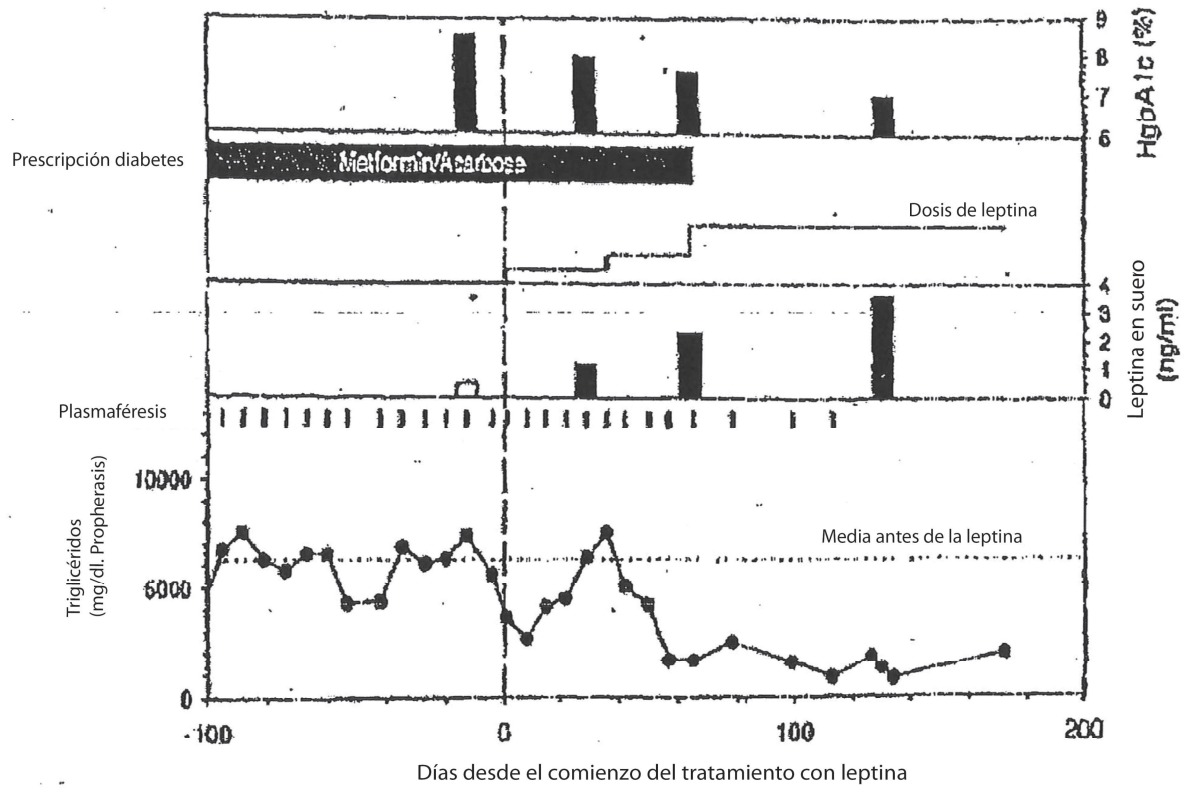
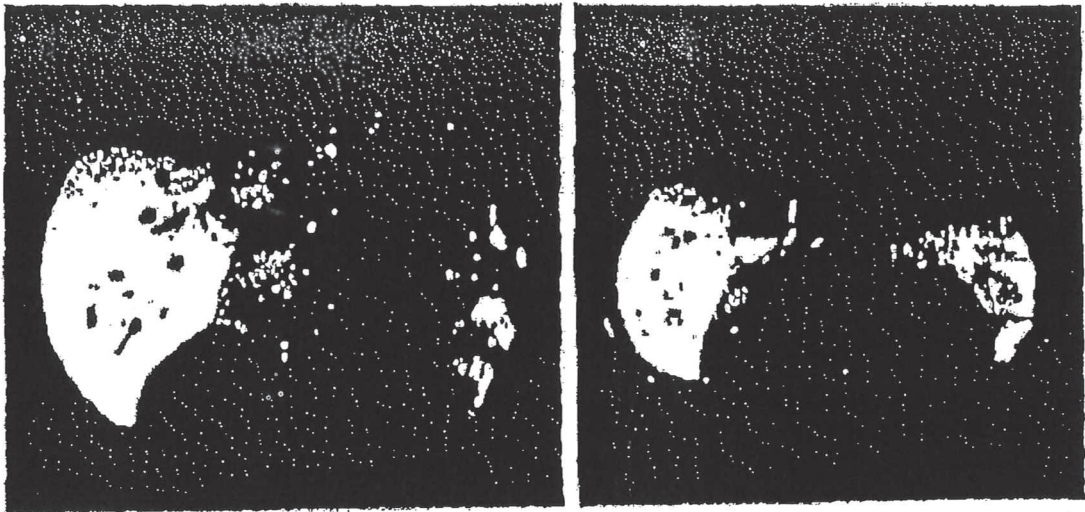


FIG.1A



Línea basal

Cuatro meses

FIG. 1B

Línea basal 9.1 ± 0.5 %	Cuatro meses 7.2 ± 0.5 %
--------------------------------	---------------------------------

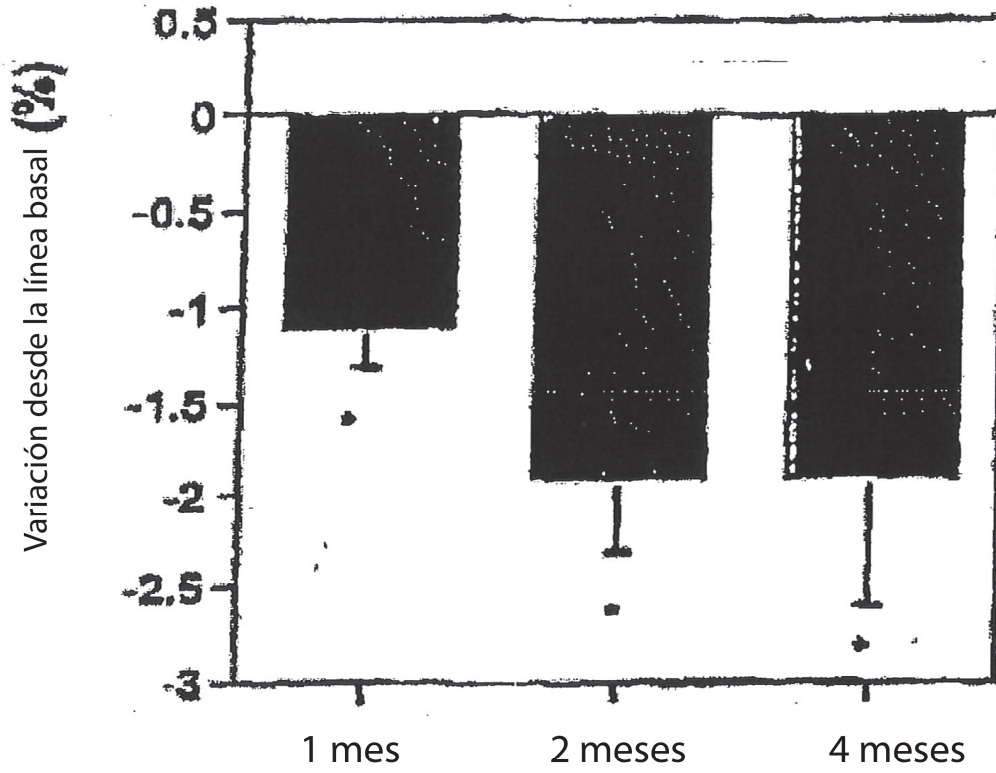


FIG.2

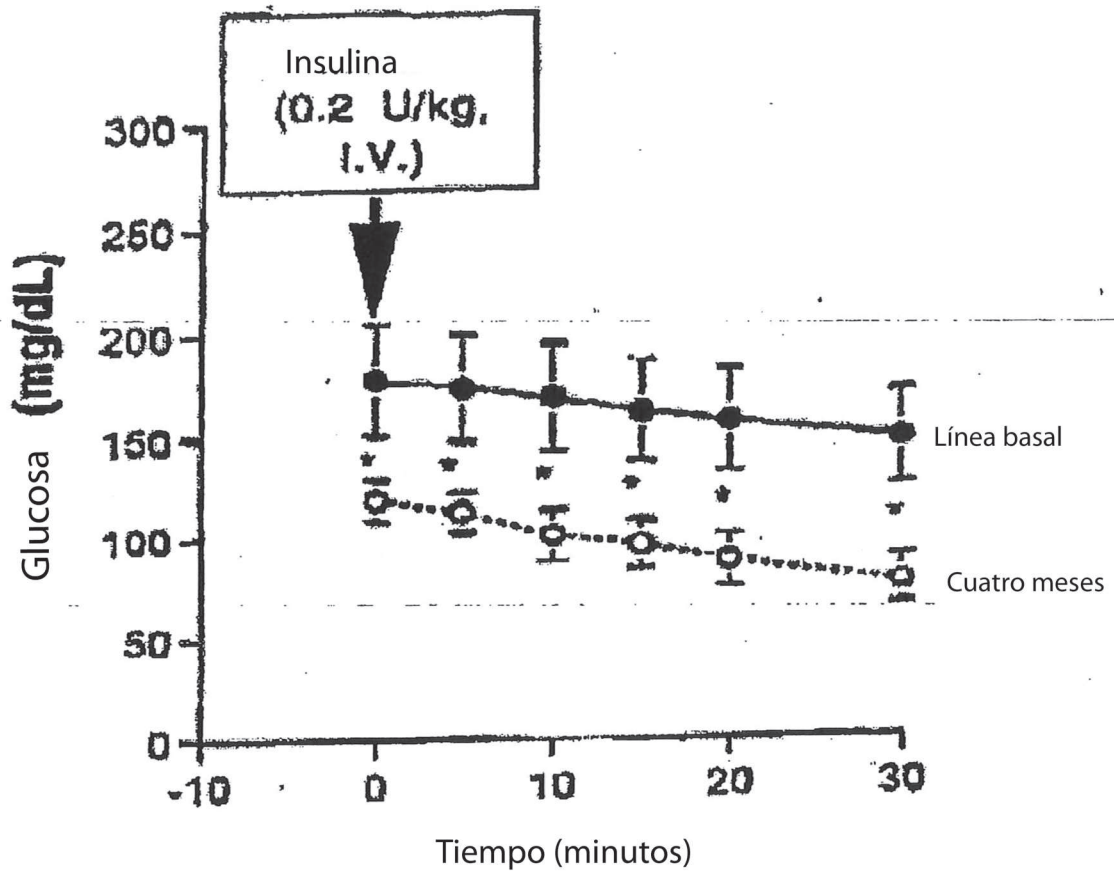


FIG.3A

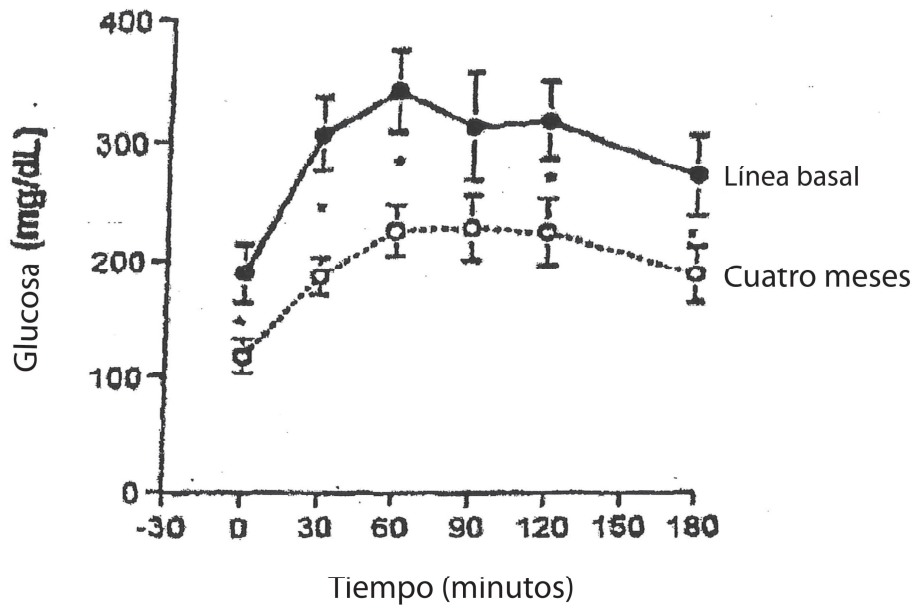


FIG.3B

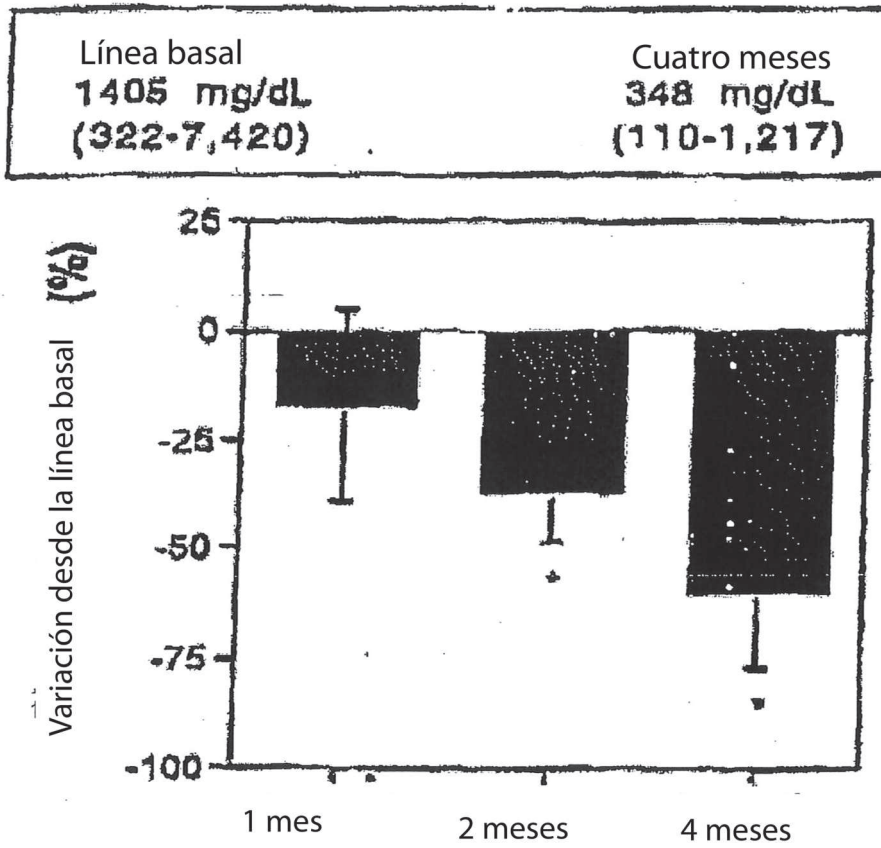


FIG.4