

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 268**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2007** **PCT/US2007/078231**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2008** **WO08033890**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2007** **E 07853534 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 2066174**

54 Título: **Composiciones que contienen alfa-1-antitripsina y métodos para su uso**

30 Prioridad:

12.09.2006 US 844003 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2018

73 Titular/es:

**BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER,
INC. (50.0%)
330 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US y
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**FLIER, JEFFREY;
KOULMANDA, MARIA y
STROM, TERRY B.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 651 268 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

Composiciones que contienen alfa-1-antitripsina y métodos para su uso

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere en general al tratamiento de pacientes que son resistentes a la insulina y han sido diagnosticados de diabetes Tipo 2, o que presentan riesgo de desarrollar diabetes Tipo 2 y pacientes diagnosticados de síndrome metabólico. Los métodos de tratamiento son variados y pueden incluir la administración de un polipéptido de α 1-antitripsina (AAT) o un agente, tal como una molécula de ácido nucleico o compuesto orgánico, que promueva la expresión o la actividad de α 1-antitripsina.

Antecedentes

- 10 La diabetes es una enfermedad muy común que se desarrolla cuando el organismo no produce suficiente, o apreciablemente ninguna insulina o no puede utilizar o responder adecuadamente a la insulina. Existen dos tipos principales de diabetes. La diabetes Tipo 1 también se conoce como diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y es el resultado de la producción insuficiente de insulina. El inicio de la diabetes Tipo 1 ocurre con mayor frecuencia en niños, adolescentes o adultos jóvenes y se considera una enfermedad autoinmunitaria. La diabetes Tipo 2 se conoce como diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) y es la forma más común de la enfermedad, que representa aproximadamente 90% de todos los casos de diabetes. En muchos casos, la diabetes Tipo 2, en las fases iniciales, se caracteriza por una respuesta subóptima a la insulina. Aunque se produce insulina, la capacidad de una cantidad dada de insulina necesaria para efectuar una disminución dada de glucosa en sangre aumenta. En el Tipo 2, los pacientes manifiestan una respuesta de glucosa en sangre atenuada a la insulina, es decir, un estado de resistencia a la insulina. Las causas de la diabetes no se conocen por completo, aunque tanto los factores genéticos como ambientales, tales como la obesidad y la falta de ejercicio, aumentan el riesgo. También hay una forma de diabetes que se puede desarrollar durante el embarazo (diabetes gestacional) y una forma de diabetes autoinmunitaria que se desarrolla en la edad adulta, que se denomina diabetes autoinmune latente del adulto (DALA) o diabetes autoinmune que progresa lentamente.
- 25 La diabetes Tipo 1 se trata con insulina, aunque se han propuesto otros tratamientos y se ha probado el trasplante de células de los islotes productores de insulina del páncreas. La intervención no farmacéutica generalmente se prescribe inicialmente para la diabetes Tipo 2 (p.ej., modificación de la dieta, pérdida de peso y ejercicio). Si esto no tiene éxito, los pacientes generalmente son tratados con uno de tres tipos diferentes de medicamentos: fármacos que estimulan la liberación de insulina del páncreas; fármacos que aumentan la sensibilidad del paciente a la insulina; y fármacos que afectan directamente a los niveles circulantes de glucosa (p. ej., fármacos que disminuyen la producción de glucosa del hígado o aumentan su absorción por los músculos). Más específicamente, a un paciente se le puede recetar una sulfonilurea, un inhibidor de la α -glucosidasa, metformina (Glucophage™) o troglitazona (Rezulin™). En muchos casos, también se utiliza insulina. Después de muchos años de vivir con diabetes Tipo 2, algunos pacientes manifiestan agotamiento del aparato productor de insulina y, por lo tanto, requieren terapia con insulina.
- 30
- 35

A pesar del progreso en la comprensión y el tratamiento de la diabetes, ninguna de las estrategias actuales de tratamiento es óptima, y existe una gran necesidad de mejores formas de tratar a los pacientes que tienen diabetes o que están en riesgo de desarrollar diabetes.

Compendio de la invención

- 40 La presente invención presenta un polipéptido de α 1-antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de la α 1-antitripsina para su uso en un método para tratar a un paciente resistente a la insulina que ha sido diagnosticado de diabetes Tipo 2, que ha sido diagnosticado de riesgo de desarrollar diabetes Tipo 2, o que ha sido diagnosticado de síndrome metabólico, en donde el agente es una construcción genética que codifica un polipéptido de α 1-antitripsina completo o un fragmento o mutante del mismo biológicamente activos y en donde el fragmento o mutante biológicamente activos tienen actividad inhibidora de la α 1-proteinasa.
- 45

En general, el método mencionado anteriormente puede llevarse a cabo identificando a un paciente que es resistente a la insulina y administrando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de α 1-antitripsina (AAT, a veces abreviada A1 AT), que también es conocida como inhibidor de α 1-proteinasa.

- 50 Por ejemplo, se puede administrar un polipéptido de AAT (p.ej., una AAT purificada o recombinante, tal como AAT humana) o un homólogo, fragmento biológicamente activo u otro mutante activo del mismo. Alternativamente, o además, se puede administrar un agente que promueva la expresión o actividad de una α 1-antitripsina (p.ej., un gen que codifica una α 1 antitripsina). Si bien los autores de la presente invención describen la resistencia a la insulina y los pacientes susceptibles de tratamiento más adelante, los autores de la presente invención señalan aquí que los pacientes que muestran resistencia a la insulina no son capaces de utilizar la insulina de manera eficiente. Las pruebas actualmente disponibles pueden indicar si un paciente dado es resistente a la insulina. Por ejemplo, en una prueba de tolerancia a la insulina, se administra insulina y se mide la glucosa en sangre en respuesta. Si los niveles de glucosa en sangre no caen como se espera en respuesta a la insulina administrada, el paciente es resistente a la
- 55

insulina.

Un paciente que es resistente a la insulina también puede ser un paciente que ha sido diagnosticado de diabetes Tipo 1. Sin embargo, el tratamiento de dicho paciente no está comprendido en la presente invención. En esta circunstancia, el paciente es deficiente en insulina. La producción de insulina está comprometida, pero no está abolida. Además, el paciente también es resistente a la insulina, evitando o deteriorando de ese modo la masa residual de las células productoras de insulina para prevenir la hiperglucemia. El diagnóstico de diabetes Tipo 1 puede basarse en uno o más hallazgos o indicadores, tales como la hiperglucemia (es decir, un nivel de glucosa en sangre indicativo de diabetes) con: (a) hipoinsulinemia; (b) otra evidencia de pérdida de células β pancreáticas o insuficiencia funcional; (c) una respuesta de glucosa en sangre normal o ligeramente alterada a la insulina; (d) cetoacidosis; o (e) dependencia de la insulina (es decir, una dependencia de la insulina para obtener niveles de glucosa en sangre dentro o cerca de un intervalo normal (es decir, un intervalo generalmente observado en individuos sanos o no diabéticos). Los pacientes con diabetes Tipo 1 deben tomar insulina. De lo contrario, su salud se deteriora rápidamente.

La afirmación de los autores de la presente invención de que los pacientes que son resistentes a la insulina pueden tener diabetes Tipo 1 y la afirmación de los autores de la presente invención de que estos mismos pacientes pueden ser hiperglucémicos y mostrar una respuesta de glucosa en sangre normal a la insulina puede parecer contradictoria. Como se indicó anteriormente, la diabetes Tipo 1 se conoce como diabetes mellitus insulino dependiente porque se ha entendido históricamente como una afección que se produce cuando las células β en los islotes pancreáticos de Langerhans no producen suficiente insulina para facilitar la captación celular de glucosa desde la sangre. Sigue siendo cierto que la diabetes Tipo 1 está indicada cuando la glucosa en sangre está elevada y el nivel de insulina circulante es anormalmente bajo. También es cierto que algunos pacientes con diabetes Tipo 1 pueden responder de manera normal, o casi normal, cuando se administra insulina exógena, mientras que otros también pueden tener un estado resistente a la insulina. Lo que la investigación de los autores de la presente invención ha indicado, sin embargo, es que hay un componente resistente a la insulina en la diabetes Tipo 1 de inicio temprano, y la resistencia a la insulina puede contribuir a la diabetes Tipo 1 incluso en pacientes no obesos. Por ejemplo, los estudios de los autores de la presente invención con ratones diabéticos no obesos (NOD) con diabetes tipo 1 de inicio reciente, el mejor modelo disponible para la diabetes Tipo 1, muestran una prueba de tolerancia anormal a la insulina. Esta anomalía se ve en concierto con la reducción tanto en la fosforilación de tirosilo del receptor de insulina (IR) como en el sustrato de receptor de insulina 1 (IRS-1). La fosforilación normal de IR e IRS-1 se restableció mediante el tratamiento con una $\alpha 1$ -antitripsina (Aralast™) o un antagonista de TNF- α (véase la Figura 1). Este estado de resistencia a la insulina no se elimina mediante la normalización de los niveles de glucosa en sangre con terapia insulínica intensiva, y se asocia con signos moleculares de inflamación sutil dentro de la grasa y el músculo, los sitios principales para la eliminación de glucosa en la sangre impulsada por la insulina.

Los niveles de insulina se reflejan por el nivel de una proteína llamada péptido C (para péptido conector). En el curso de la producción de insulina, el cuerpo primero produce proinsulina, que posteriormente se escinde en insulina y péptido C. Por lo tanto, al tratar de distinguir a los pacientes que tienen diabetes Tipo 1 de los pacientes que tienen diabetes Tipo 2, un médico puede evaluar el péptido C. La hipoinsulinemia, como se observa en la diabetes Tipo 1, se refleja por una disminución de péptido C en la sangre circulante.

Cualquiera de los pacientes descritos en la presente memoria puede ser un paciente humano. En el pasado, la diabetes Tipo 1 era mucho más frecuente en los jóvenes que la diabetes Tipo 2. Lamentablemente, la epidemia de obesidad en nuestra cultura ha conducido a una gran cantidad de individuos obesos jóvenes con diabetes Tipo 2. Los jóvenes con diabetes Tipo 2 ya no son raros. Además, un paciente adulto puede desarrollar diabetes Tipo 1 de inicio tardío. Sin embargo, la edad del paciente o, más en general, si el paciente es un niño, un adolescente o un adulto pueden tomarse en consideración en el proceso de diagnóstico, al igual que la historia familiar del paciente.

Los pacientes resistentes a la insulina incluidos en la presente invención son aquellos diagnosticados de diabetes Tipo 2. Este diagnóstico puede basarse en la hiperglucemia con uno o más de: (a) un nivel de insulina normal o elevado; (b) otra evidencia de mantenimiento de células β pancreáticas; (c) una respuesta de glucosa en sangre atenuada a la insulina; o (d) un historial familiar de diabetes Tipo 2. Los métodos descritos en la presente memoria son aplicables al tratamiento de la resistencia a la insulina y no requieren diabetes franca. Al igual que con la diabetes Tipo 1, mientras que la insulina se puede medir directamente, un médico puede evaluar la producción de insulina midiendo el péptido C y, en algunos casos (p.ej., cuando un paciente ha recibido insulina exógena), el péptido C refleja con mayor precisión la producción de insulina. Un nivel normal de insulina (es decir, un nivel dentro de un intervalo típicamente observado en pacientes sanos y/o no diabéticos) se refleja por un nivel normal de péptido C (es decir, un nivel dentro de un intervalo típicamente observado en pacientes sanos y/o no diabéticos). El péptido C elevado refleja la insulina elevada. Si bien la presencia de niveles normales o elevados de insulina indica, pero no prueba que hay un número adecuado de células β presentes y funcionales, se pueden buscar otras pruebas de que estas células productoras de insulina son saludables (p.ej., se puede determinar si el paciente está portando anticuerpos contra células β). Una prueba de tolerancia a la insulina también puede ser útil para diagnosticar la diabetes Tipo 2. Cuando la respuesta de un paciente a la insulina está atenuada (es decir, cuando la insulina administrada no produce la reducción esperada en la glucosa en sangre), esto indica que los tejidos sensibles a la insulina del paciente, tejidos responsables de la eliminación de la glucosa en sangre en el tejido impulsada por insulina, son resistentes a la insulina, como ocurre en la diabetes Tipo 2. El problema no es principalmente la

producción de insulina, como es el caso con la diabetes Tipo 1. Como se señaló anteriormente, los autores de la presente invención han descubierto un grado de resistencia a la insulina en la diabetes Tipo 1.

Los métodos descritos en la presente memoria también son útiles en el tratamiento de pacientes que son diagnosticados por tener riesgo de desarrollar diabetes Tipo 2 (p.ej., que tienen un riesgo mayor que el promedio de desarrollar diabetes Tipo 2). Este diagnóstico puede basarse en uno o más de los siguientes hallazgos: (a) tolerancia alterada a la glucosa con o sin características del síndrome metabólico; (b) tolerancia a la glucosa normal o alterada con hiperinsulinemia; o (c) tolerancia alterada a la glucosa y antecedentes familiares de diabetes Tipo 2. La tolerancia alterada a la glucosa (TAG) está presente cuando un paciente tiene un nivel de glucosa en sangre que es más alto de lo normal, pero no lo suficientemente alto para que el paciente se considere diabético. La TAG también se puede conocer como diabetes límite, prediabetes o diabetes química. Una población específica de pacientes con riesgo conocido de diabetes Tipo 2 es la población de mujeres que han tenido diabetes gestacional.

Si bien los autores de la presente invención tienden a utilizar el término "tolerancia alterada a la glucosa" (TAG), un experto en la técnica también puede referirse a pacientes que tienen glucosa alterada en ayunas (GAA). La diferencia se deriva de la prueba exacta utilizada para diagnosticar a los pacientes (p.ej., pacientes con riesgo de desarrollar diabetes), y estas pruebas son conocidas en la técnica y se describen más adelante.

Los pacientes que son diagnosticados de síndrome metabólico muestran resistencia a la insulina. De hecho, el síndrome metabólico también se conoce como síndrome de resistencia a la insulina o síndrome X. Como se señaló anteriormente, se pueden considerar las características del síndrome metabólico cuando se determina si un paciente está en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 2, puesto que los pacientes con síndrome metabólico tienen más probabilidades de desarrollar diabetes Tipo 2. Sin embargo, se puede evaluar el riesgo de diabetes Tipo 2 sin considerar estas características y, aunque los pacientes que presentan características del síndrome metabólico tienen un mayor riesgo de diabetes, también tienen un mayor riesgo de desarrollar otras afecciones, tales como enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, se puede evaluar y tratar a un paciente que tiene síndrome metabólico como se describe en la presente memoria, y se puede realizar con el objetivo de reducir el riesgo del paciente de desarrollar diabetes o cualquier otra afección no deseable asociada con el síndrome metabólico.

Las características del síndrome metabólico incluyen obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica, un estado protrombótico, presión arterial elevada y niveles elevados de citoquinas inflamatorias. Más específicamente, un paciente puede ser diagnosticado de síndrome metabólico si tiene dos, tres o más de: (a) una circunferencia de cintura elevada; (b) triglicéridos elevados; (c) lipoproteínas de alta densidad (HDL) reducidas; (d) presión arterial elevada; y (e) glucosa elevada en ayunas.

La invención también describe métodos para tratar pacientes que están en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 1 (p.ej., pacientes que tienen un riesgo mayor que el promedio de desarrollar diabetes Tipo 1) o individuos con diabetes Tipo 1 de inicio reciente y baja producción de insulina residual. Estos métodos de tratamiento pueden llevarse a cabo mediante la identificación de un paciente que está en riesgo (p.ej., un mayor riesgo) de desarrollar diabetes Tipo 1 y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueva la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina. El paciente que ha sido identificado puede ser un paciente que fue diagnosticado de riesgo de desarrollar diabetes Tipo 1 en base a uno o más de los siguientes: (a) tener antecedentes familiares de diabetes Tipo 1, con o sin tolerancia alterada a la glucosa; o (b) tener tolerancia alterada a la glucosa y evidencia de pérdida de células β pancreáticas o insuficiencia funcional. Con respecto a los antecedentes familiares, un paciente tiene un mayor riesgo de desarrollar diabetes Tipo 1 cuando son hermanos de (p.ej., un gemelo idéntico) un paciente que tiene diabetes Tipo 1. La evidencia de pérdida de células β pancreáticas incluye, como ocurre en caso de hacer cualquier diagnóstico relacionado con la diabetes, hipoinsulinemia y/o la presencia de anticuerpos anti-células β .

En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de $\alpha 1$ -proteinasas. Por ejemplo, se puede administrar un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina, que puede ser un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina completo (de origen humano u otro) o un fragmento o mutante biológicamente activos del mismo. Los inhibidores de proteinasas $\alpha 1$ están disponibles comercialmente para el tratamiento de deficiencias de AAT, e incluyen Aralast™, Prolastin™ y Zemaira™. Como se ha indicado, el polipéptido AAT o el fragmento o mutante biológicamente activos del mismo pueden ser de origen humano y pueden purificarse a partir de tejido o plasma humanos. Alternativamente, puede ser producido recombinantemente. Para facilitar la lectura, los autores de la presente invención no repiten la frase "o un fragmento o mutante biológicamente activos del mismo" después de cada referencia a AAT. Debe entenderse que, siempre que se pueda utilizar un AAT completo que se produce de manera natural, también se puede utilizar un fragmento biológicamente activo u otro mutante biológicamente activo del mismo (p.ej., un mutante en el que uno o más residuos de aminoácidos han sido sustituidos). Del mismo modo, los autores de la presente invención no repiten en cada ocasión que un polipéptido natural (p.ej., AAT) puede purificarse a partir de una fuente natural o producirse recombinantemente. Debe entenderse que ambas formas pueden ser útiles. De forma similar, los autores de la presente invención no especifican repetidamente que el polipéptido puede ser de origen humano o no humano. Si bien puede haber ventajas en la administración de una proteína humana, la invención no es tan limitada.

Los agentes que promueven la expresión de $\alpha 1$ -antitripsina incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican un

polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina natural completo o un fragmento biológicamente activo u otro mutante del mismo. Las moléculas de ácido nucleico pueden incluir elementos reguladores tales como promotores constitutivamente activos o específicos de tejido para facilitar la expresión de la secuencia que codifica AAT. Se conocen en la técnica muchos vectores adecuados, que incluyen vectores plasmídicos y virales, y pueden utilizarse para administrar las presentes moléculas de ácido nucleico a pacientes. Las moléculas de ácido nucleico también pueden incluir secuencias que sirven como indicadores o etiquetas o secuencias que aumentan la vida media circulante de un polipéptido AAT al que se unen (p.ej., una porción de una inmunoglobulina (p.ej., una región Fc) o una albúmina (p.ej., albúmina humana). El fragmento o mutante biológicamente activos tienen actividad inhibidora de $\alpha 1$ -proteinasas.

Los agentes que promueven la actividad de $\alpha 1$ -antitripsina incluyen agentes que promueven la secreción de $\alpha 1$ -antitripsina (p.ej., PBA). Sin embargo, tales agentes no están específicamente incluidos en la presente invención como agentes que promueven la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina.

La invención abarca terapias combinadas. Por ejemplo, los pacientes pueden tratarse con un inhibidor de 1-proteinasas (p.ej., Aralast™) y un agente antiinflamatorio (p.ej., un agente que inhibe selectivamente el TNF α o un radical dentro de la ruta de señalización de TNF α). Por ejemplo, el agente que inhibe el TNF α es un anticuerpo anti-TNF α , que puede ser un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o monocatenario. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. Los anticuerpos anti-TNF α que están disponibles actualmente y que pueden utilizarse en los métodos descritos en la presente memoria incluyen adalimumab (Humira™) e infliximab (Remicade™). Estos anticuerpos se prescriben actualmente para el tratamiento de la artritis reumatoide o la artritis psoriásica. Otros anticuerpos útiles incluyen CDP571, que es un anticuerpo anti-TNF α monoclonal humanizado; D2E7, que es un anticuerpo monoclonal anti-TNF humano; y CDP870 (certolizumab pegol), que es un fragmento de anticuerpo pegilado anti-TNF α (FAB). CDP870 se ha utilizado en ensayos clínicos para el tratamiento de la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn.

Alternativamente, o además, los pacientes pueden tratarse con un inhibidor de $\alpha 1$ -proteinasas y, como un agente que inhibe selectivamente un radical dentro de la ruta de señalización de TNF α , un antagonista del receptor de TNF α soluble. Los agentes útiles pueden ser solubles e incluir una porción suficiente del receptor de TNF α para unirse a TNF α . Estos antagonistas pueden incluir una porción heteróloga (es decir, una porción no relacionada con el receptor de TNF α) que puede aumentar la semivida circulante del antagonista. Por ejemplo, los antagonistas pueden incluir una molécula de Tipo inmunoglobulina, como la incluida en etanercept (Enbrel™). También se puede utilizar Enbrel™ *per se*. En otras realizaciones, la porción heteróloga del antagonista puede ser una albúmina (p.ej., albúmina sérica humana) o polietilenglicol. El antagonista puede ser un factor de necrosis tumoral soluble PEGilado tipo I (PEG-sTNF-RI) *per se* o puede incluir o consistir en la porción p55 del receptor encontrado en este antagonista (véase, p.ej., Edwards y col., *Adv. Drug. Delivery Res.* 55:1315-1336, 2003).

Alternativamente, o además, los pacientes pueden tratarse con un inhibidor de $\alpha 1$ -proteinasas y, como un agente que inhibe selectivamente un radical dentro de la ruta de señalización de TNF α , un inhibidor de TACE (enzima convertidora de TNF α). Sin embargo, las composiciones que contienen un inhibidor de $\alpha 1$ -proteinasas y un inhibidor de TACE como inhibidor de un radical dentro de la ruta de señalización de TNF α no están específicamente incluidas en la invención.

Otros inhibidores de TNF α , aunque no están específicamente incluidos en la presente invención, incluyen agentes que inhiben selectivamente la expresión de TNF α , tales como moléculas de ARN que median ARNi (p.ej., un ARNip o ARNhp selectivo de TNF α) y oligonucleótidos antisentido. Más específicamente, se puede administrar una molécula que media ARNi (p.ej., un ácido nucleico de interferencia corto (ANip), un ARN de interferencia corto (ARNip), un ARN de doble hebra (ARNdh) o un ARN en horquilla corto (ARNhp) como se describe en la publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20050227935.

La expresión o actividad de TNF α también puede ser selectivamente inhibida por pequeños compuestos orgánicos o inorgánicos (p.ej., LMP420; Haraguchi *et al.*, *AIDS Res. Ther.* 3:8, 2006), talidomida o un análogo de talidomida, o un inhibidor de fosfodiesterasa tipo IV. Cuando se utilizan compuestos orgánicos pequeños y productos farmacéuticos como la talidomida, también se puede utilizar un profármaco.

Alternativamente, o además, los pacientes pueden tratarse con un antagonista de una citoquina inflamatoria tal como IL-1, IL-6 o IL-8. Por ejemplo, se puede utilizar anakinra (Kineret™) para inhibir IL-1.

Otros agentes útiles en los métodos descritos en la presente memoria (p.ej., en combinación con un AAT) incluyen agonistas de un receptor de péptido similar al glucagón (GLP) (p.ej., GLP-1) o de un receptor de exendina. Por ejemplo, el agonista del receptor de GLP o el agonista del receptor de exendina puede ser exendina-3, exendina-4 o GLP-1 (7-36)-amida.

Otros agentes útiles en los métodos descritos en la presente memoria (p.ej. en combinación con un AAT) incluyen antagonistas de CD3 (p.ej., un anticuerpo anti-CD3).

El número de pacientes en riesgo de desarrollar diabetes es sustancial. En una muestra representativa de adultos estadounidenses de 40 a 74 años de edad, que fueron evaluados durante el período de 1988 a 1994, 33,8 por ciento tenía GAA, 15,4 por ciento tenía TAG y 40,1 por ciento tenía prediabetes (TAG o GAA o ambos). Aplicando estos

porcentajes a la población de EE.UU. en el año 2000, aproximadamente 35 millones de adultos de 40 a 74 años tendrían GAA, 16 millones tendrían TAG y 41 millones tendrían prediabetes.

Otras características y ventajas de la presente invención se describen en el dibujo, la descripción detallada, los ejemplos y las reivindicaciones.

5 Breve descripción del dibujo

La Figura 1 es un par de gráficos de barras que representan los resultados obtenidos de los estudios de señalización de la insulina en el músculo esquelético. El gráfico superior representa la fosforilación del receptor de insulina (IR) y el gráfico inferior representa la fosforilación del receptor de insulina 1 (IRS-1) en animales de control, diabéticos y tratados.

10 Descripción detallada

Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para tratar pacientes que son resistentes a la insulina. Estos pacientes resistentes a la insulina son aquellos que tienen diabetes Tipo 2 (una afección que se sabe que está asociada con la resistencia a la insulina), individuos que están en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 2 y pacientes diagnosticados de síndrome metabólico.

15 Los pacientes con deficiencia de insulina con diabetes Tipo 1, función de islotes marginales y resistencia a la insulina no están incluidos en la presente invención.

Los autores de la presente invención han encontrado que un curso corto de AAT restablece la normoglucemia en ratones NOD diabéticos de inicio reciente, un modelo desalentador y clínicamente predictivo para la diabetes Tipo 1. Muchos agentes han demostrado ser efectivos en la prevención de la diabetes franca cuando se administran después de que haya signos tempranos de autoinmunidad, pero muy pocos de estos agentes son efectivos después del inicio de la hiperglucemia. Algunos, pero no muchos, de estos agentes funcionan después del establecimiento del daño significativo de las células de los islotes antes de los niveles elevados de glucosa en sangre.

Los autores de la presente invención proponen los regímenes terapéuticos de AAT e inclusivos de AAT para el tratamiento de la diabetes de inicio reciente. Por ejemplo, los regímenes terapéuticos de AAT e inclusivos de AAT pueden utilizarse para tratar pacientes en los que las pruebas de laboratorio revelan evidencia de autoinmunidad diabética. Esa evidencia actualmente incluye autoanticuerpos específicos de islotes, y se están desarrollando ensayos de células T relevantes. Como se observa aquí, los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen aquellos que exhiben pérdida o insuficiencia funcional de células β pancreáticas. Estos pacientes, particularmente cuando también exhiben tolerancia alterada a la glucosa, están en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 1 o se encuentran en el punto de inflexión entre un estado diabético y no diabético. Un experto en la técnica reconocerá que hay una progresión próxima de eventos asociados con la enfermedad y que los pacientes pueden tratarse en diversos puntos durante el seguimiento.

Si bien las presentes composiciones y métodos descritos en la presente memoria están claramente contemplados para su uso en pacientes humanos, la invención no está tan limitada. Las composiciones y los métodos también se pueden utilizar en entornos veterinarios (p.ej., para tratar un animal domesticado como un perro, gato o caballo).

Los métodos pueden incluir, aunque no necesariamente, etapas para determinar si un paciente es resistente o no a la insulina o tiene otra afección descrita en la presente memoria tratable con AAT o como se describe por otra parte en la presente memoria. Por lo tanto, los métodos pueden incluir, pero no necesariamente, una etapa en la que se identifica un paciente y una etapa en la que se administran uno o más agentes terapéuticos. La identificación del paciente puede comenzar con un examen físico y la consideración de los síntomas del paciente. Los pacientes que han adquirido diabetes, o que están en el proceso de convertirse en diabéticos, a menudo se quejan de polifagia, polidipsia y poliuria. También pueden quejarse de náuseas, con o sin vómitos. Mientras que los pacientes que son resistentes a la insulina o que son prediabéticos pueden no tener síntomas de diabetes, existen formas graves de resistencia a la insulina que producen manchas oscuras en la piel, generalmente en la parte posterior del cuello o alrededor del cuello. También puede haber manchas oscuras en los codos, rodillas, nudillos y axilas. Esta afección se llama acantosis nigricans. Con cualquiera de estos síntomas, y teniendo en cuenta los antecedentes familiares del paciente, un médico u otro profesional de la salud pueden solicitar análisis de sangre, como los que se describen a continuación, para evaluar la cantidad de azúcar e insulina en la sangre del paciente.

Los pacientes que son resistentes a la insulina no pueden utilizar la insulina como deberían. Las pruebas actualmente disponibles pueden indicar si un paciente dado es resistente a la insulina. Por ejemplo, para evaluar la tolerancia a la insulina, a un paciente se le administra insulina, y su respuesta se evalúa controlando los cambios resultantes en los niveles de glucosa en sangre. La pregunta es si la glucosa en sangre cae como se esperaría para un paciente sano o no diabético o si permanece alta o más alta de lo esperado. Cuando la glucosa en sangre no cae como se esperaría, el paciente exhibe resistencia a la insulina. Se conocen varios ensayos específicos en la técnica y se pueden utilizar para detectar resistencia a la insulina. Por ejemplo, se pueden inyectar 0,1 unidades/kg de insulina cristalina por vía intravenosa y se pueden extraer muestras de sangre para medir la glucosa a aproximadamente -5, 0, 3, 5, 10 y 15 minutos con respecto al momento de la inyección. La resistencia a la insulina

se puede calcular utilizando la pendiente de los niveles de glucosa en sangre descendente (SI1). En un estudio, se encontró que las mujeres sanas tenían un SI1 de 0,58 (el intervalo era de 0,53-0,63) (Sin *et al.*, *Revista medica de Chile* 124:931-937, 1996). Los investigadores que llevaron a cabo este estudio concluyeron que la prueba de tolerancia a la insulina es un buen método para medir la resistencia a la insulina y tiene una buena correlación con la prueba de tolerancia a la glucosa intravenosa frecuentemente muestreada.

Debido a que la prueba de tolerancia a la insulina puede causar que algunos pacientes experimenten síntomas desagradables, también se puede utilizar una prueba de tolerancia a la insulina "corta". Esta prueba es particularmente útil cuando un gran número de sujetos requieren exámenes de escrutinio o cuando el nivel de glucosa en ayunas del paciente es normal. La prueba "corta" emplea una dosis más baja de insulina que la inyección en bolo convencional de 0,1 unidades/kg o la infusión administrada en una pinza hiperinsulinémica euglucémica, y las mediciones se registran durante un período de tiempo más corto. Por ejemplo, se puede medir la sensibilidad a la insulina utilizando la pendiente de la concentración arterial de glucosa en sangre de aproximadamente 3 a 15 minutos después de un bolo intravenoso de insulina de acción corta (0,05 unidades/kg de peso corporal). Véase Gelding *et al.*, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 40:611-615, 1994).

Los pacientes que tienen diabetes no tratada, ya sea de Tipo 1 o Tipo 2, son hiperglucémicos (es decir, exhiben, preferiblemente en más de una ocasión, un nivel de glucosa en sangre elevado a un nivel típicamente observado en pacientes diabéticos). Los niveles de glucosa en sangre pueden evaluarse de varias maneras. Por ejemplo, un paciente puede ser sometido a una prueba de tolerancia a la glucosa. Esta prueba es bien conocida y se realiza rutinariamente. El paciente ayuna antes de extraer una muestra de sangre a tiempo cero (momento inicial). La sangre se extrae al menos una vez más después de que el paciente consume una bebida estandarizada con alto contenido de glucosa. Los intervalos y el número de muestras tomadas pueden variar de acuerdo con el propósito de la prueba. Para el escrutinio simple de la diabetes, generalmente se considera que la muestra más importante se obtiene dos horas después de que se haya consumido la glucosa. Sin embargo, se pueden tomar muestras adicionales en diferentes momentos (p.ej., 30 minutos, una hora, dos horas y tres horas) después de que se haya consumido la glucosa. La persona que se somete a la prueba comienza la prueba en ayunas, sin comida ni bebida, excepto agua, por lo general durante al menos las últimas ocho horas (p.ej., las últimas 10 a 16 horas o las últimas 8 a 14 horas). Después de que se extrae la muestra de sangre inicial, al paciente se le administra glucosa, generalmente en forma de bebida (típicamente 1,75 gramos de glucosa por kilogramo de peso corporal, hasta una dosis máxima de 75 g, a las mujeres embarazadas se les puede proporcionar más). Las muestras de sangre se extraen de nuevo a intervalos variables (p.ej., como se señaló anteriormente). Ciertas actividades, como fumar, afectan el resultado y se debe advertir a los pacientes que eviten esas actividades.

En una persona no diabética, los niveles de glucosa en la sangre aumentan después de beber la bebida que contiene glucosa, pero luego vuelven rápidamente a la normalidad porque la insulina se produce en respuesta a la glucosa y la insulina tiene su efecto normal de disminuir la glucosa en sangre. En un paciente diabético, los niveles de glucosa aumentan más de lo normal después de beber la bebida de glucosa y descienden a niveles normales mucho más lentamente porque la insulina no se produce (lo que indica Diabetes Tipo 1) o las células del paciente son resistentes a la insulina (lo que indica diabetes Tipo 2).

Un experto en la técnica será capaz de interpretar los resultados de una prueba de tolerancia a la glucosa, que incluye la prueba de tolerancia a la glucosa oral que se acaba de describir. La siguiente información se proporciona como guía, y no pretende limitar el alcance de la invención.

La glucosa en plasma en ayunas de un paciente debe estar por debajo de 6,1 mmol/l (110 mg/dl). Los niveles en ayunas entre 6,1 y 7,0 mmol/l (110 y 126 mg/dl) están en el límite. Se puede decir que estos pacientes tienen un nivel alterado de glucosa en ayunas y pueden estar en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 1 o Tipo 2. Los niveles en ayunas que son repetidamente de 7,0 mmol/l (126 mg/dl) o más son diagnósticos de diabetes. Estos pacientes pueden describirse como hiperglucémicos. El nivel de glucosa a las 2 horas debe estar por debajo de 7,8 mmol/l (140 mg/dl). Los niveles entre esto y 11,1 mmol/l (200 mg/dl) indican tolerancia alterada a la glucosa. Como se indica en la presente memoria, los pacientes que presentan tolerancia alterada a la glucosa corren el riesgo de desarrollar diabetes. La diabetes puede ser diabetes Tipo 2 o, cuando el paciente tiene antecedentes familiares de diabetes Tipo 1 y/o evidencia de pérdida de células pancreáticas β , el riesgo es mayor para la diabetes Tipo 1. Los niveles de glucosa superiores a 11,1 mmol/l (200 mg/dl) en la marca a las 2 horas confirman la hiperglucemia y el diagnóstico de diabetes. Para mayor comodidad, estas cifras se presentan en la siguiente Tabla.

Criterios de la OMS para la diabetes 1999 - interpretación de la prueba de tolerancia oral a la glucosa								
Niveles de glucosa	NORMAL		Glicemia alterada en ayunas		Tolerancia alterada a la glucosa		Diabetes Mellitus	
			(G.A.A.)		(T.A.G.)		(D.M.)	
Plasma venoso	Ayunas	2 horas	Ayunas	2 horas	Ayunas	2 horas	Ayunas	2 horas
(mmoles/l)	<6,1	<7,8	≥ 6,1 y <7,0	<7,8	<7,0	≥7,8	≥7,0	≥11,1
(mg/dl)	<110	<140	≥110 y <126	<140	<126	≥140	≥126	≥200

Si bien la glucosa se administra con frecuencia por vía oral, se puede administrar por vía intravenosa. La administración intravenosa está indicada cuando un médico sospecha anomalías tempranas de la secreción de insulina en estados prediabéticos.

Una mujer tiene diabetes gestacional cuando está embarazada y tiene dos de los siguientes: una glucosa en plasma en ayunas de más de 105 mg/dl, un nivel de glucosa de 1 hora de más de 190 mg/dl, un nivel de glucosa de 2 horas de más de 165 mg/dl, o un nivel de glucosa de 3 horas de más de 145 mg/dl.

Si los resultados de una prueba de tolerancia a la glucosa indican diabetes o riesgo de diabetes, la prueba utilizada puede repetirse un día diferente para mejorar la confianza en el diagnóstico. También se puede utilizar una combinación de diferentes pruebas. Por ejemplo, si un análisis de sangre revela un nivel de glucosa igual o superior a 200 mg/dl en algún momento de una prueba oral de tolerancia a la glucosa, la prueba puede repetirse y/o se pueden analizar los niveles de glucosa en plasma en ayunas.

En la prueba de glucosa en plasma en ayunas, la glucosa en sangre de una persona se mide una vez después de un ayuno de ocho a 12 horas. Una persona con glucosa en sangre normal tiene un nivel de glucosa en sangre por debajo de 100. Una persona con glucosa alterada en ayunas tiene un nivel de glucosa en sangre entre 100 y 125 mg/dl. Si el nivel de glucosa en sangre en ayunas aumenta a 126 mg/dl o más, la persona tiene diabetes. Como cuestión preliminar, se puede realizar una prueba de glucosa en plasma incluso si el paciente no ha ayunado.

Si bien los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para tratar pacientes que tienen diabetes Tipo 1 o Tipo 2, se puede desear probar las características clásicamente asociadas con una u otra forma. Una de estas características es el nivel circulante de insulina. Por lo tanto, antes de tratar a un paciente, se puede determinar si ese paciente tiene hiperglucemia e hipoinsulinemia (lo que indica diabetes Tipo 1) o hiperglucemia y un nivel normal o elevado de insulina (hiperinsulinemia, que indica diabetes Tipo 2).

Una prueba de laboratorio disponible actualmente para distinguir la diabetes Tipo 1 de la de Tipo 2 es la prueba del péptido C, que detecta la cantidad de insulina que se produce en el cuerpo. La resistencia a la insulina, determinada por una prueba de tolerancia a la insulina también se puede utilizar, con una falta de resistencia a la insulina, en el contexto de esa prueba, lo que sugiere diabetes Tipo 1. Más específicamente, niveles bajos o ausentes de péptido C indican que la producción de insulina está disminuida o no existe. Niveles por debajo del intervalo normal de 0,5 a 3,0 ng/ml de plasma significa que la producción de insulina se ha ralentizado de manera anormal.

Además de la falta de producción de insulina, se pueden buscar otras pruebas de pérdida o insuficiencia funcional de células P pancreáticas en pacientes con diabetes Tipo 1. Estos pacientes pueden exhibir, por ejemplo, anticuerpos contra algún componente de una célula de islote. Los anticuerpos primarios que se encuentran en 90% de los diabéticos de Tipo 1 son contra las proteínas citoplásmicas de las células de los islotes. Estos anticuerpos se han denominado ICCA (anticuerpos citoplásmicos de las células de los islotes). En los no diabéticos, la frecuencia de ICCA es solo del 0,5% - 4%. La presencia de ICCA es un predictor muy preciso del desarrollo futuro de DMID. Por lo tanto, se puede evaluar el contenido de anticuerpos en el curso del diagnóstico de pacientes en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 1. Ya sea una causa directa o un efecto de la destrucción de las células de los islotes, el título de los ICCA tiende a disminuir con el tiempo. Los autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de la superficie de las células de los islotes (ICSA) también se han descrito en hasta 80% de los diabéticos de Tipo 1. De forma similar a ICCA, el título de ICSA disminuye con el tiempo. Se ha identificado que algunos pacientes con diabetes Tipo 2 son positivos para ICSA. También se han identificado anticuerpos contra la ácido glutámico descarboxilasa (GAD) en más de 80% de los pacientes diagnosticados recientemente de DMID, y los anticuerpos anti-GAD disminuyen con el tiempo en los diabéticos Tipo 1. La presencia de anticuerpos anti-GAD es un fuerte predictor del desarrollo futuro de DMID en poblaciones de alto riesgo. Se han identificado anticuerpos antiinsulina en pacientes con DMID y en

familiares con riesgo de desarrollar DMID. Estos anticuerpos son detectables incluso antes del inicio de la terapia con insulina en diabéticos de Tipo 1, y se han encontrado en aproximadamente 40% de los niños pequeños con DMID.

- 5 Otra característica más que se puede evaluar es la respuesta del paciente a la insulina. Una respuesta de glucosa en sangre normal o ligeramente alterada a la insulina indica diabetes Tipo 1, mientras que una respuesta atenuada indica diabetes Tipo 2. La prueba de tolerancia a la insulina se describió anteriormente en el contexto de la resistencia a la insulina.

- 10 La cetoacidosis diabética (CAD) es una consecuencia de la diabetes mellitus severa, incontrolada. Como resulta de una deficiencia relativa de insulina, es un indicador de diabetes Tipo 1. La CAD puede estar presente antes del diagnóstico y puede ayudar en el diagnóstico, pero también puede aparecer después del diagnóstico como una indicación de que el régimen terapéutico es inapropiado o no se ha seguido bien. Por ejemplo, la CAD puede aparecer cuando un paciente deja de tomar la insulina prescrita. Los requerimientos de insulina pueden aumentar debido al estrés fisiológico (p.ej., una infección), que a su vez causa la liberación de catecolaminas, glucagón y cortisol.

- 15 La dependencia de insulina también es un indicador de diabetes Tipo 1. Cuando un paciente es dependiente de insulina, muestra una dependencia de la insulina para obtener niveles de glucosa en sangre dentro de, o más cerca de, un intervalo normal (es decir, un intervalo generalmente observado en individuos sanos o no diabéticos)). Actualmente, los pacientes con diabetes Tipo 1 deben tomar insulina.

- 20 Si bien se han revisado anteriormente muchas características de la diabetes Tipo 2, los autores de la presente invención reiteran que los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir la identificación, suministro o reconocimiento de un paciente con diabetes Tipo 2 basándose en la presencia de hiperglucemia con uno o más de: (a) un nivel normal o elevado de insulina; (b) otra evidencia de mantenimiento de células beta (p.ej., una falta de anticuerpos anti-células de los islotes); (c) una respuesta de glucosa en sangre atenuada a la insulina; y (d) un historial familiar de diabetes Tipo 2. Con respecto al tratamiento de un paciente que está en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 2 (p.ej., un paciente cuyo riesgo se determina que es elevado por encima del riesgo de los ciudadanos en general o por encima de un subgrupo identificado de ciudadanos en general al que pertenece el paciente), los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir identificar, proporcionar o reconocer a un paciente con: (a) tolerancia alterada a la glucosa, con o sin características del síndrome metabólico; (b) tolerancia a la glucosa normal o alterada con hiperinsulinemia; y/o (c) tolerancia alterada a la glucosa con antecedentes familiares de diabetes Tipo 2. Por ejemplo, el paciente puede tener un nivel de glucosa en sangre que es elevado, pero todavía no en el intervalo diabético, y un nivel de péptido C dentro o por encima de un intervalo normal apropiado. Los niveles de glucosa en sangre y los niveles de péptido C se describen en general anteriormente.

- 35 Una prueba que se puede realizar para identificar cualquier paciente resistente a la insulina es la prueba Mal1. Por consiguiente, los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir una etapa de identificación, suministro o reconocimiento de un paciente que es resistente a la insulina, o en riesgo de serlo, en base a esta prueba. Las transcritos Mal1 o una proteína Mal1 pueden detectarse en una muestra de tejido obtenida del paciente. Incluso un pequeño aumento (p.ej., un aumento de al menos 5% en el nivel de transcritos o proteínas Mal1) en la muestra de tejido en comparación con un tejido de control apropiado indica que el paciente tiene, o está en riesgo de desarrollar resistencia a la insulina. El transcrito de Mal1 puede incluir el SEQ ID NO: 4 o el complemento del mismo como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.056.662.

- 45 Mal1 es una proteína de unión a ácidos grasos (FABP). Las proteínas de esta familia de pequeñas proteínas citoplasmáticas funcionan para transportar lípidos dentro de las células. El gen que codifica Mal1 está regulado al alza en carcinogénesis cutánea de etapas múltiples, y el producto génico se expresa en adipocitos así como en otros tipos celulares tales como macrófagos. Como se indicó anteriormente, el aumento de expresión de Mal1 se puede utilizar para identificar pacientes susceptibles de tratamiento como se describe en la presente memoria. Además, se puede utilizar un inhibidor de Mal1 combinado con cualquiera de los regímenes terapéuticos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, un inhibidor de Mal1 se puede administrar con una AAT y/o un agente antiinflamatorio tal como un inhibidor de TNF α . La disminución de la expresión o actividad de Mal1 inhibe el desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina, diabetes, dislipidemia y aterosclerosis. El inhibidor de Mal1 puede inhibir la transcripción de Mal1 endógeno, por ejemplo, uniéndose a una secuencia reguladora que actúa en cis del gen Mal1 y disminuyendo la transcripción de Mal1. Alternativamente, el compuesto puede ser uno que inhiba la traducción del ARNm de Mal1 a un producto del gen Mal1 (p.ej., un ácido nucleico antisentido complementario a una porción suficiente de ARNm de Mal1). También se pueden utilizar ácidos nucleicos que producen ácidos nucleicos antisentido y pueden ser dirigidos, por ejemplo, por promotores específicos de adipocitos o macrófagos).

- 55 El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólicos, algunas de cuyas combinaciones (p.ej., dos, tres o más) se manifiestan en un individuo. Las características identificativas incluyen el sobrepeso o la obesidad, particularmente la obesidad abdominal (es decir, exceso de tejido adiposo en y alrededor del abdomen); dislipidemia aterogénica; hipertensión; resistencia a la insulina y/o intolerancia a la glucosa; un estado protrombótico; y un estado proinflamatorio. La dislipidemia aterogénica se refiere a un trastorno de la grasa en la sangre que fomenta la acumulación de placa en las paredes arteriales. La dislipidemia puede ocurrir, por ejemplo,

cuando un paciente tiene niveles altos de triglicéridos, bajos niveles de colesterol HDL ("bueno") y altos niveles de colesterol LDL ("malo"). La hipertensión (o presión arterial elevada) se asocia fuertemente con la obesidad y comúnmente ocurre en pacientes resistentes a la insulina. Por lo tanto, la hipertensión se enumera comúnmente entre los factores de riesgo metabólicos. Aunque algunos investigadores creen que la hipertensión es menos "metabólica" que otros componentes del síndrome metabólico, parece haber consenso en que la hipertensión debe considerarse un factor de riesgo para el síndrome metabólico. Un estado protrombótico es cualquier afección que predispone a un paciente a la trombosis venosa o arterial. Por ejemplo, un paciente puede tener niveles altos de fibrinógeno o inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en la sangre. Un estado proinflamatorio está presente cuando se eleva el nivel de proteína C-reactiva (o CRP, que no debe confundirse con la proteína C) en sangre. Existe una conexión entre la obesidad y el estado proinflamatorio porque el exceso de tejido adiposo libera citoquinas inflamatorias que pueden provocar niveles más altos de PCR. Los estados protrombótico y proinflamatorio también pueden estar interconectados metabólicamente. Más específicamente, al evaluar a un paciente para determinar la presencia de síndrome metabólico, se puede buscar una circunferencia de cintura elevada (40 pulgadas (102 cm) o más en hombres; 35 pulgadas (88 cm) o más en mujeres); triglicéridos iguales o superiores a 150 mg/dL; colesterol HDL a menos de 40 mg/dL en hombres y menos de 50 mg/dL en mujeres; presión arterial elevada a 130/85 mm Hg o más; y una glucosa elevada en ayunas igual o superior a 100 mg/dL. Se encuentra disponible una discusión adicional sobre las características del síndrome metabólico en la bibliografía científica (véase, p.ej., Grundy *et al.* (*Circulation* 109: 433-438, 2004). También se pueden consultar los criterios propuestos por el National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III) (Grundy) *et al.*, más arbina) y la American Heart Association y las recomendaciones del National Heart, Lung and Blood Institute. Otras afecciones asociadas con el síndrome incluyen inactividad física, envejecimiento, desequilibrio hormonal y predisposición genética.

Los pacientes diagnosticados de síndrome metabólico corren un mayor riesgo no solo de diabetes Tipo 2, sino también de enfermedad coronaria y otras enfermedades relacionadas con la acumulación de placa en las paredes arteriales (p.ej., accidente cerebrovascular (ACV o "ictus") y enfermedad vascular periférica).

Los pacientes que no son resistentes a la insulina pero que están en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 1 también pueden tratarse mediante los métodos descritos en la presente memoria. Mientras que muchas características de la diabetes Tipo 1 se han revisado anteriormente, los autores de la presente invención reiteran que los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir identificar, proporcionar o reconocer a un paciente en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 1 basándose en: (a) antecedentes familiares de diabetes Tipo 1, con o sin tolerancia alterada a la glucosa y/o (b) tolerancia alterada a la glucosa y evidencia de pérdida o insuficiencia funcional de células β pancreáticas.

El término diabetes "secundaria" se ha utilizado para referirse a los niveles elevados de azúcar en la sangre de otra afección médica (es decir, una afección diferente a la diabetes *per se*). La diabetes secundaria puede desarrollarse, por ejemplo, cuando el tejido pancreático responsable de la producción de insulina está ausente porque es destruido por una enfermedad distinta a la diabetes, como pancreatitis crónica, traumatismo o extirpación quirúrgica del páncreas. La diabetes también puede ser el resultado de otras alteraciones hormonales, como la producción excesiva de la hormona del crecimiento, como ocurre en la acromegalia y el síndrome de Cushing. En la acromegalia, un tumor de la glándula pituitaria en la base del cerebro causa una producción excesiva de la hormona del crecimiento, lo que lleva a la hiperglucemia. En el síndrome de Cushing, las glándulas suprarrenales producen un exceso de cortisol, que promueve la elevación de azúcar en la sangre. Además, ciertos medicamentos pueden empeorar el control de la diabetes o desenmascarar la diabetes latente. Esto se observa con mayor frecuencia cuando se toman medicamentos esteroides (corticosteroides, incluida la prednisona y la cortisona) y también con medicamentos utilizados en el tratamiento de la infección por VIH (el virus asociado con ARC y SIDA). Los pacientes que tienen diabetes secundaria, o que están en riesgo de desarrollar diabetes secundaria, se pueden tratar como se describe en la presente memoria (p.ej., con una AAT o con una AAT y un agente antiinflamatorio (p.ej., un inhibidor de TNF α) y/o un inhibidor de Mal1). Como con otras poblaciones de pacientes descritas en la presente memoria, los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir o no una etapa de identificación (p.ej., diagnóstico) de un paciente que tiene diabetes secundaria o que está en riesgo de desarrollar diabetes secundaria. Los métodos pueden abarcar el tratamiento sin referencia al diagnóstico.

Los regímenes de tratamiento requieren la administración de AAT, un fragmento biológicamente activo u otro mutante del mismo, o un agente que promueva la expresión o actividad de AAT.

AAT es una proteína que se encuentra en el plasma y que, debido a sus propiedades estructurales y funcionales, se clasifica en la superfamilia de serpinas (inhibidores de la serina proteasa). Es debido a su efecto inhibidor de serina proteasa que AAT también se conoce como inhibidor de α 1-proteinasa. Puesto que AAT es responsable de aproximadamente 90% de la capacidad de inhibición triptica del plasma normal, también se denomina serpina principal del plasma. La actividad inhibidora de las AAT respecto a la elastasa es particularmente importante.

La AAT es principalmente una proteína protectora; protege las células de las enzimas proteolíticas liberadas. Se sintetiza en el hígado y se secreta al plasma, donde tiene una semivida de aproximadamente seis días. La concentración normal de AAT en plasma es de aproximadamente 1,3 g/l.

La AAT humana es un polipéptido monocatenario de 394 residuos de aminoácidos con tres posiciones de glucosilación en los residuos de asparragina de las posiciones 46, 83 y 247. La sialización es descrita por Carrell *et al.* (*Nature* 298:329-334, 1982). Existen al menos dos formas de AAT en plasma. En una forma, se eliminan los cinco residuos de aminoácidos más N-terminales. Se han encontrado cambios sustanciales en la proporción relativa de las diversas isoformas en caso de inflamación y en respuesta a estrógenos (véase Patterson, *Comp. Biochem. Physiol.* 100:439-454, 1991).

La AAT inhibe las serina proteasas formando complejos con las proteasas que bloquean su actividad. La propia AAT es inhibida por los radicales liberados que se forman en el curso de la inflamación. Cuando la AAT se bloquea en las inmediaciones de la inflamación, las proteasas tales como la elastasa y la catepsina G están más disponibles para atacar las células bacterianas que puedan estar causando la inflamación. Sin embargo, un lugar donde la inactivación de AAT puede ser perjudicial es en los pulmones. Si la AAT, que ayuda a proteger la superficie de los pulmones, particularmente en el tracto respiratorio inferior, está comprometida (p.ej., por deficiencia genética o radicales libres contenidos en el humo del cigarrillo), el tejido pulmonar puede dañarse y se puede producir enfisema o se puede exacerbar. Por lo tanto, la AAT se ha desarrollado como una terapia para el tratamiento del enfisema (véase la discusión de los autores de la presente invención referente a Aralast™). El inhibidor de α 1-proteinasa también inhibe las elastasas humanas en el páncreas y en los leucocitos. Véanse Pannell *et al.*, *Biochemistry* 13:5339, 1974; Johnson *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72:33, 1976; Del Mar *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88:346, 1979; y Heimburger *et al.*, *Proc. Int. Res. Conf. Proteinase Initiators* Primero, 1-21, 1970.

Se conocen más de 70 variantes cualitativas y cuantitativas de AAT humana que se heredan como alelos co-dominantes autosómicos. Hasta 10% de la población europea puede ser portadora de una variante patológica de AAT. Los resultados patológicos más notables de la varianza del gen AAT son la enfermedad pulmonar degenerativa y la enfermedad hepática grave. También se sospecha que los trastornos renales, la artritis y las neoplasias malignas están relacionados con una varianza del gen AAT.

En plasma, AAT aparece tanto en forma activa como en forma inactiva (véase, p.ej., Pajdak *et al.*, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 24:169-172, 1986).

Existen diversos métodos para producir AAT, algunos de los cuales implican el procesamiento de diversas fracciones de plasma (precipitado de la fracción IV-1 de Cohn o sobrenadante A o A+1 de Kistler y Nitschmann) (Feldman y Winkelman, *Blood Separation and Plasma Fractionation*, Wiley-Liss, Inc., pág. 341-383, 1991). En esquemas más elaborados, las fracciones de sangre respectivas se purifican por medio de celulosa DEAE (Basis *et al.*, *Vopr. Medicina. Khim.* 33:54-59, 1987), tratados con materiales cromatográficos de afinidad o con materiales cromatográficos de intercambiador de cationes (documento EP-0 698 615-A1). Basis *et al.* describen un método para purificar AAT mediante precipitación con sulfato de amonio del plasma y posterior cromatografía de celulosa DEAE y cromatografía de hidroxipatita. Este método emplea mercaptoetanol, que protege la proteína contra la oxidación de grupos que contienen S. Después de la cromatografía de hidroxipatita, la AAT se recupera en dos fracciones, pero la AAT y la albúmina no están completamente separadas.

Se han desarrollado otros métodos para separar más completamente AAT inactiva de AAT activa. Por ejemplo, se ha obtenido AAT natural purificada cromatográficamente que tiene una pureza de al menos aproximadamente 0,7 UP/mg de proteína (determinada en un ensayo de inhibición de elastasa) y una actividad relativa de AAT en plasma de al menos o aproximadamente 120% (véase la Patente de Estados Unidos Núm. 6.974.792).

Estos métodos de purificación pueden utilizarse para obtener AAT para su uso en los métodos descritos en la presente memoria relacionados con la resistencia a la insulina y la diabetes (p.ej., en el tratamiento de un paciente que tiene un riesgo suficientemente alto de desarrollar diabetes Tipo 1 para merecer el tratamiento). En resumen, se puede preparar un isómero de AAT que tenga un pl de entre 4,3 y 4,4 mediante un método que incluya las etapas de: (a) proporcionar un material de partida que contenga AAT activa e inactiva (p.ej., una fracción de plasma obtenida a partir del plasma humano agrupado); (b) proporcionar un sustrato de hidroxipatita; (c) pasar el material de partida sobre el sustrato de hidroxipatita; y (d) eluir una preparación de AAT biológicamente activa que tiene un pl de entre 4,3 y 4,4. El método puede incluir adicionalmente una etapa en la que se hace pasar la preparación de AAT biológicamente activa sobre un material de intercambio aniónico en presencia de un detergente. En otros métodos, se puede purificar AAT biológicamente activa mediante un procedimiento que incluye las etapas de: (a) proporcionar una fracción que contiene AAT de un conjunto de plasma humano; (b) ajustar el pH de la fracción que contiene AAT a aproximadamente 6,5; (c) absorber la fracción que contiene AAT acidulada en un intercambiador de aniones cromatográfico en presencia de un detergente; y (d) eluir la AAT biológicamente activa del intercambiador de aniones cromatográfico. Los isómeros de AAT resultantes pueden tener pl de entre 4,3 y 4,4.

La AAT purificada se puede combinar con un diluyente fisiológicamente aceptable (p.ej., un excipiente). Las preparaciones farmacéuticas pueden incluir opcionalmente sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como tampones, estabilizadores, adyuvantes, antioxidantes y sales. Adicionalmente, las preparaciones se pueden tratar para inactivar cualquier patógeno en las mismas, y se pueden proporcionar en formas estables durante el almacenamiento (p.ej., en forma liofilizada o como una solución ultracongelada). Se pueden formular otras preparaciones para administración intravenosa o como aerosol o pulverización (p.ej., para la aplicación de la mucosa). Las preparaciones también pueden proporcionarse en asociación con liposomas o fosfolípidos o con otras

micropartículas o nanopartículas. La AAT también está disponible comercialmente. Al poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria, se pueden utilizar inhibidores de la proteasa $\alpha 1$ comercialmente disponibles tales como Aralast™, Prolastin™ o Zemaira™. La pureza de estas preparaciones que contienen AAT se ha evaluado utilizando cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa y de exclusión por tamaños (RP-HPLC y SEC-HPLC), electroforesis en zona capilar (CZE), electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico, electroforesis en gel capilar con dodecilsulfato sódico y análisis de transferencia Western (Cowdin *et al.*, *Curr. Med. Res. Opin.* 21:877-883, 2005). La identidad de las impurezas proteicas se determinó mediante inmunonefelometría; la funcionalidad calculando la razón de mg de A1-P1 activo presente (mediante análisis de actividad anti-elastasa de neutrófilos) con respecto a los mg de A1-PI antigénico (mediante inmunonefelometría); y la normalidad del patrón de la isoforma de A1-PI mediante isoelectroenfoque (IEF). Para el análisis, estuvieron disponibles tres muestras de Zemaira™ y una muestra de cada uno de Aralast™ y Prolastin™. Zemaira™ tuvo la actividad específica más alta. Utilizando análisis de RP-HPLC, Zemaira™ promedió 99% de pureza, Aralast™ 70% y Prolastin™ menos de 62%. Utilizando SEC-HPLC Zemaira™ fue monomérico en 95,98%, Prolastin™ 79,00% y Aralast™ 63,55%. La prolantina tuvo menor actividad/mg de A1-PI antigénico que los otros dos productos. Un cambio en las isoformas en Aralast™ fue sugerido por los resultados de CZE, y fue confirmado por IEF (Cowdin *et al.*, más arriba).

Si bien la AAT purificada a partir de plasma humano es una forma eficaz y útil de AAT, los suministros de plasma pueden ser limitados y existe la posibilidad de contaminación viral. De acuerdo con ello, AAT, o un fragmento biológicamente activo o un mutante de la misma, pueden producirse recombinantemente en células vegetales o animales. La AAT se puede obtener a partir de células vegetales, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.127.145.

Se transformaron células de plantas monocotiledóneas con una secuencia codificante de AAT y se cultivaron en condiciones que permitían la expresión y secreción de proteínas. La secuencia de ácido nucleico utilizada puede optimizarse con codones para una traducción más eficiente en cultivos de células vegetales.

La AAT también puede producirse y purificarse a partir de la leche de un animal transgénico no humano tal como una vaca. Se describe un método para purificar inhibidores de $\alpha 1$ -proteinasas humanas u otros a partir de una solución, que puede derivarse de la leche de un animal transgénico no humano en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.194.553, e incluye las etapas de poner en contacto la solución con un sustrato de intercambio catiónico en condiciones suficientes para unir contaminantes inhibidores de la $\alpha 1$ -proteinasas no transgénica al sustrato mientras que no se une sustancialmente al inhibidor de la $\alpha 1$ -proteinasas transgénica. Se informó que el inhibidor de la $\alpha 1$ -proteinasas transgénica contenía tan poco como 40 pg de proteína de suero no inhibidora de $\alpha 1$ -proteinasas por mg de proteína total.

Como con otros agentes farmacéuticos, las sales y otros derivados de una AAT se pueden formar utilizando técnicas convencionales. Estas sales y otros derivados pueden tener una actividad que es comparable a la de una AAT de origen natural o una propiedad mejorada (p.ej., mejor estabilidad o actividad). Más específicamente, se puede preparar una sal de metal alcalino, una sal de adición de ácido o un éster utilizando métodos tales como los utilizados convencionalmente para modificar los productos terapéuticos basados en polipéptidos.

Como se indicó, además de administrar un polipéptido AAT biológicamente activo y de origen natural, se puede administrar un fragmento biológicamente activo u otro mutante de AAT. El fragmento biológicamente activo puede diferir de una AAT de Tipo salvaje correspondiente por tan poco como 1-5 residuos de aminoácidos en el extremo N o C o en el extremo N y C. Sin embargo, también se pueden realizar grandes deleciones. Por ejemplo, se puede suprimir el residuo más N-terminal; se pueden suprimir los dos residuos más N-terminales; se pueden suprimir los tres residuos más N-terminales; etcétera. Como se señaló, se puede realizar cualquier delección N-terminal (p.ej., una delección de 1-10 de los residuos de aminoácidos N-terminales) junto con cualquier delección C-terminal (p.ej., una delección de 1-10 de los residuos de aminoácidos C-terminales). La extensión del truncamiento también se puede expresar como un porcentaje. En ese caso, el fragmento biológicamente activo puede diferir de una AAT de tipo salvaje correspondiente en al menos 1-10%, al menos 11-20%, al menos 21-30% o al menos 31-40%. En este contexto, por "al menos" X-Y% los autores de la presente invención quieren significar al menos X% pero no más que Y%. Por ejemplo, el fragmento biológicamente activo puede incluir al menos 75, 80, 85, 90, 95 o 99% de los residuos de aminoácidos consecutivos de una AAT de tipo salvaje correspondiente. También se pueden utilizar otros mutantes de AAT en los que las deleciones se realizan en posiciones distintas del extremo N y/o C, siempre que permanezcan biológicamente activas. Por ejemplo, se pueden eliminar al menos 1-5 o más (p.ej., 10) residuos de aminoácidos consecutivos o no consecutivos de una AAT. Al igual que con los fragmentos truncados, la delección se puede expresar en términos de una diferencia porcentual relativa a una AAT de tipo salvaje correspondiente. Por ejemplo, una AAT mutante biológicamente activa puede diferir de una AAT de tipo salvaje en al menos 1-10%, al menos 11-20%, al menos 21-30% o al menos 31-40%. Por ejemplo, el mutante biológicamente activo puede ser al menos 75, 80, 85, 90, 95 o 99% idéntico a una AAT de tipo salvaje correspondiente. Los grados de identidad descritos anteriormente también son relevantes para otros tipos de mutantes. Por ejemplo, un mutante AAT biológicamente activo puede, además de, o como una alternativa a, un truncamiento o delección interna, incluir una o más mutaciones por sustitución (p.ej., un número dado de residuos de aminoácidos, de acuerdo con el grado de identidad expuesto anteriormente, puede reemplazarse por uno o más residuos de aminoácidos, algunos de los cuales, o todos, representan una sustitución conservativa). Un mutante de AAT biológicamente activo también puede incluir uno o más residuos adicionales (es decir, la AAT puede incluir una mutación por inserción). Por supuesto, se

pueden incluir combinaciones de estos tipos de variantes. Por ejemplo, se podría producir una AAT en la que 1-5 de los residuos de aminoácidos N-terminales son suprimidos y 1-5 de los residuos restantes son sustituidos por otro residuo aminoácido. A continuación, los autores de la presente invención describen la administración de AAT a un paciente. Esto se puede lograr mediante la administración de un polipéptido AAT *per se* o de una secuencia de ácido nucleico que codifica la AAT. Los autores de la presente invención observan aquí que el ácido nucleico puede ser uno que codifica cualquiera de los polipéptidos variantes de AAT biológicamente activos.

La AAT inhibe la actividad enzimática de elastasa de neutrófilos, catespina G, proteinasa 3, trombina, tripsina y quimotripsina. En consecuencia, se puede examinar cualquier agente (p.ej., un fragmento de un polipéptido AAT, un polipéptido mutante de AAT, o una molécula orgánica pequeña) para determinar su capacidad para inhibir la actividad enzimática de una o más de estas enzimas. El agente puede examinarse adicionalmente en un modelo animal (p.ej., un modelo animal de diabetes) o en un ensayo clínico.

El término "idéntico" cuando se utiliza para describir dos o más ácidos nucleicos o dos o más polipéptidos significa que los dos o más ácidos nucleicos o los dos o más polipéptidos tienen las mismas secuencias de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. Cuando se requiere un cierto porcentaje de identidad entre dos ácidos nucleicos o dos polipéptidos, las secuencias de nucleótidos o las secuencias de aminoácidos, respectivamente, deben tener un número suficiente de residuos idénticos para satisfacer el grado requerido de identidad. Las secuencias que se van a comparar se pueden alinear para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o una región designada, y la identidad se puede medir utilizando algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros por defecto recomendados por el programa. El porcentaje de identidad también puede determinarse por alineamiento manual e inspección visual.

Para la comparación de secuencias, una secuencia típicamente actúa como una secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de referencia y de ensayo simplemente se introducen en un ordenador, con posterioridad se designan las coordenadas, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se pueden utilizar parámetros de programa por defecto, y es sobre la base de esos parámetros que se determina el porcentaje de identidad para las secuencias de AAT variantes descritas en la presente memoria. El algoritmo de comparación de secuencia calcula a continuación el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una ventana de comparación es un segmento de una cualquiera de las posiciones contiguas a lo largo de un polipéptido o ácido nucleico relacionado con AAT o que codifica AAT, que puede extenderse para incluir la longitud completa de un polipéptido o ácido nucleico de AAT mutante o de origen natural. Los métodos de alineamiento de secuencias para su comparación (p.ej., secuencias dentro de una ventana de comparación) son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de soporte lógico Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, p.ej., *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, Eds., Suplemento de 1995)).

Un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia así como la similitud u homología de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que son descritos por Altschul *et al.* (*Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1997) y Altschul *et al.* (*J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se utilizan, con los parámetros descritos en la presente memoria, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas que codifican AAT y relacionados con AAT (es decir, variante) que se pueden combinar y administrar para el tratamiento de un paciente como se describe en la presente memoria. El soporte lógico para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; dirección URL: tipo de archivo http, www host server, nombre de dominio ncbi.nlm.nih.gov).

En caso de que se deseen alinear más de dos secuencias (p.ej., una secuencia de referencia y dos o más secuencias de ensayo), se puede utilizar el algoritmo PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de secuencia múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineamientos progresivos por pares para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencia. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencias y designando los parámetros del programa. Utilizando PILEUP, una secuencia de referencia se compara con otras secuencias de ensayo para determinar la relación de porcentaje de identidad de secuencia utilizando los siguientes parámetros: peso de espacio por defecto (3,00), peso de longitud de espacio por defecto (0,10) y espacios finales ponderados. PILEUP puede obtenerse del paquete de soporte lógico de análisis de secuencia GCG, por ejemplo, la versión 7.0 (Devereaux *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:387-395 (1984)).

También hay pruebas funcionales de identidad sustancial. Por ejemplo, cuando dos secuencias de ácido nucleico

son sustancialmente idénticas, las dos secuencias o sus dos complementos hibridan entre sí en condiciones rigurosas. En condiciones rigurosas, una sonda hibridará con su subsecuencia diana (p.ej., una secuencia que codifica una AAT de tipo salvaje), típicamente en una mezcla compleja de ácido nucleico, pero con ninguna otra secuencia. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy nucleic acid assays" (1993) En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1,0 M de iones de sodio, típicamente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de concentración de iones de sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (p.ej., 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (p.ej., más de 50 nucleótidos). También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizadores tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces (y preferiblemente más (p.ej., aproximadamente 10 veces) el nivel de hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas ilustrativas pueden ser las siguientes: formamida al 50%, 5X SSC y SDS al 1%, con incubación a 42°C o 5X SSC, SDS 1%, con incubación (para hibridación) a 65°C, seguido de lavado en 0,2X SSC y SDS al 0,1% a 65°C.

Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden utilizar condiciones alternativas de hibridación y lavado para proporcionar condiciones de rigurosidad igualmente altas.

Los fragmentos y otros mutantes de AAT descritos anteriormente se han denominado biológicamente activos y los autores de la presente invención quieren decir con esto que el fragmento u otros mutantes retienen actividad suficiente para ser terapéuticamente útiles (es decir, útiles en el tratamiento de un paciente como se describe en la presente memoria). Para comenzar a determinar la utilidad terapéutica, se puede administrar el fragmento de AAT u otro mutante a un ratón NOD. Más específicamente, se puede administrar el fragmento de AAT u otro mutante en las circunstancias en las que se administró Aralast™ en los Ejemplos a continuación y después examinar los niveles de glucosa en sangre de los animales. Un fragmento biológicamente activo u otro mutante es terapéuticamente útil cuando promueve la normoglucemia. Por supuesto, antes de la aprobación por la Administración de Alimentos y Fármacos y la administración a pacientes humanos en general, dichos fragmentos u otros mutantes deben examinarse en ensayos clínicos en seres humanos. Si se desea, se pueden llevar a cabo otros análisis en cultivo celular o *in vitro* (p.ej., se puede someter a ensayo una actividad de una AAT contra la elastasa mediante métodos conocidos en la técnica) para recopilar datos relevantes para la actividad biológica.

1-AZT es un mutante mal plegado pero funcionalmente activo de AAT (Burrows *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1796-1801, 2000). Se puede utilizar 1-AZT en las presentes composiciones y métodos descritos en la presente memoria.

Otras variantes útiles de AAT incluyen aquellas que tienen una secuencia que es idéntica a una AAT de tipo salvaje, natural, pero que se modifican postraduccionalmente de una manera que difiere de la AAT de tipo salvaje, natural. Por ejemplo, debido al tipo de célula en el que se produce una AAT, ésta puede ser glicosilada de forma diferente. Los fragmentos y otros mutantes también pueden exhibir modificaciones postraduccionales variables (p.ej., glicosilación) cuando se producen recombinantemente en tipos de células variables (p.ej., en una célula bacteriana como una *E. coli* vs. una célula eucariótica).

Como se indicó, en lugar de, o además de, administrar AAT o una de las variantes de AAT descritas en la presente memoria, se puede administrar un agente que promueva la expresión o actividad de AAT. El agente que promueve la expresión es una construcción genética que codifica AAT o una de las variantes de AAT descritas en la presente memoria. Para facilitar la lectura, los autores de la presente invención no continúan repitiendo la frase "o una de las variantes de AAT descritas en la presente memoria". Cuando se hace referencia a un ácido nucleico que codifica AAT, debe entenderse que el ácido nucleico también puede codificar cualquier variante biológicamente activa de AAT (p.ej., los fragmentos u otros mutantes descritos anteriormente).

Se puede utilizar una variedad de construcciones de expresión para expresar un ácido nucleico que codifica AAT en una célula (p.ej., en una célula (p.ej., una célula autóloga) que se transfecta en cultivo o en una célula *in vivo*) Los vectores virales adenoasociados (AAV) se han utilizado para expresar el gen de AAT humano tanto del promotor de citomegalovirus (CMV) como del promotor del factor de elongación humano 1-alfa (véase Song *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14384-14388, 1998) Por consiguiente, los vectores virales, tales como vectores de AAV, y promotores, tales como CMV, se pueden utilizar para suministrar secuencias de ácidos nucleicos que codifican AAT a células en cultivo, a partir de las cuales se puede purificar a continuación AAT, o para suministra secuencias de ácidos nucleicos que codifican AAT a los pacientes en el contexto de los métodos descritos en la presente memoria. También se puede utilizar la secuencia reguladora naturalmente asociada con AAT. Por ejemplo, se puede incorporar un fragmento KpnI-KpnI que contiene la región promotora, el primer exón no codificante y la porción 5' del intrón 1 de AAT (cuya secuencia viene dada por Long *et al.*, *Biochemistry* 23:4828, 1984), o una porción del mismo, en un vector tal como pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, *Gene* 33:103, 1985).

También se pueden utilizar otros plásmidos. Para la expresión en anfitriones procarióticos, por ejemplo, los vectores plasmídicos adecuados incluyen pBR322 (disponible de American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) (Núm. 37.017)), pHG107 (ATCC Núm. 40.011), pBO475, pS0132, pRIT5, cualquier vector en la serie pRIT20 o pRIT30 (Nilsson y Abrahmsen, *Meth. Enzymol.*, 185:144-161, 1990), pRIT2T, pKK233-2, pDR540 y pPL-λ. Las células anfitrionas procarióticas que se pueden utilizar con los vectores de expresión ilustrativos que se acaban de describir (y otros) incluyen *E. coli*. Por ejemplo, se puede expresar una AAT en la Cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC Núm. 31.446), la cepa JM101 *E. coli* (Messing *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 9:309,1981), la cepa B de *E. coli*, la cepa χ1776 de *E. coli* (ATCC Núm. 31.537), c600 de *E. coli* (Appleyard, *Genetics* 39:440, 1954), W3110 de *E. coli* (F-, gamma-, prototrófica, ATCC Núm. 27,325), la cepa 27C7 de *E. coli* (W3110, tona, phoA E15, (argF-lac) 169, ptr3, degP41, ompT, kanr) (Patente de Estados Unidos Núm. 5.288.931; ATCC Núm. 55.244). Otras células anfitrionas procarióticas útiles incluyen *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y especies de *Pseudomonas*.

Además de los procariotas, se pueden utilizar organismos eucarióticos, tales como levaduras o células derivadas de organismos multicelulares como células anfitrionas. Para la expresión en células anfitrionas de levadura, tales como la levadura de panadería común o *Saccharomyces cerevisiae*, los vectores adecuados incluyen vectores de replicación episómica basados en el plásmido de 2 micras, vectores de integración y vectores cromosómicos artificiales de levadura (YAC). Para la expresión en células anfitrionas de insectos, tales como células Sf9, los vectores adecuados incluyen vectores baculovirales. Para la expresión en células anfitrionas vegetales, particularmente anfitriones vegetales dicotiledóneos, tales como tabaco, los vectores de expresión adecuados incluyen vectores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

También se pueden utilizar células anfitrionas de vertebrados. Los ejemplos de células anfitrionas de mamífero útiles incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión (Graham y col., *J. Gen Virol.* 36:59, 1977); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:4216, 1980); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); células tumorales mamarias de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68, 1982); Células MRC 5; Células FS4; y las células de una línea celular de hepatoma humano (Hep G2).

Para la expresión en células de mamífero, incluidas las células anfitrionas de mamífero en cultivo, los vectores útiles incluyen vectores derivados de SV40, vectores derivados de citomegalovirus tales como los vectores pRK, incluidos pRK5 y pRK7 (véanse Suva *et al.*, *Science* 237: 893-896, 1987; documento EP 307.247 (15 de marzo de 1989); y documento EP 278.776 (17 de agosto de 1988), vectores derivados de virus vaccinia u otros virus de viruela, y vectores retrovirales tales como vectores derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV). También se pueden utilizar vectores de vaccinia Ankara modificados.

Opcionalmente, el ácido nucleico que codifica la AAT de interés está conectado operablemente a una secuencia líder secretora que da como resultado la secreción del producto de expresión por parte de la célula anfitriona al medio de cultivo o desde una célula *in vivo*. La secuencia líder puede ser una asociada naturalmente con AAT o una secuencia heteróloga. Los ejemplos de secuencias líder secretoras heterólogas incluyen secuencias líder stII, ecotin, lamB, herpes GD, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa y factor alfa. También es adecuada para su uso la secuencia líder de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen y col., *EMBO J.* 4: 3901, 1985). Se puede utilizar procedimientos de clonación convencionales descritos por Maniatis *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) para construir plásmidos que dirigen la translocación de las diversas especies de AAT al espacio periplásmico de *E. coli*.

Las células anfitrionas pueden transfectarse o transformarse con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente y cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula anfitriona, se exprese o no de hecho cualquier secuencia codificante. Numerosos métodos de transfección son conocidos en la técnica. Estos incluyen precipitación con CaPO₄ y electroporación. La transfección satisfactoria generalmente se reconoce cuando se produce cualquier indicación del funcionamiento de este vector dentro de la célula anfitriona.

La transformación es la introducción de ácido nucleico en una célula para que sea replicable, ya sea como un elemento extracromosómico o después de la integración cromosómica. Los protocolos de transfección convencionales están disponibles. Varios tratamientos, incluidos los tratamientos basados en calcio, son descritos por Sambrook y col., *Molecular Cloning* (2ª ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989). La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, como describen Shaw *et al.* (*Gene* 23:315, 1983) y el documento WO 89/05859. Para las células de mamíferos, que no tienen tales paredes celulares, se prefiere el método de precipitación con fosfato de calcio descrito, por ejemplo,

por Sambrook *et al.*, más arriba. Los aspectos generales de las transformaciones del sistema anfitrión de células de mamíferos han sido descritos por Axel en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.399.216. Las transformaciones en levaduras típicamente se llevan a cabo de acuerdo con el método de Van Solingen *et al.* (*J. Bact.* 130: 946, 1977) y Hsiao *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3829, 1979). También se pueden utilizar otros métodos para introducir ADN en células, tales como la inyección nuclear, la electroporación o la fusión de protoplastos.

Las células anfitrionas procarióticas utilizadas para producir un polipéptido de interés (p.ej., una AAT) se puede cultivar como describen generalmente Sambrook *et al.*, más arriba.

Las células anfitrionas de mamífero utilizadas para producir un polipéptido de interés (p.ej., una AAT) se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), Medio mínimo esencial ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células anfitrionas. Además, se puede utilizar cualquiera de los medios descritos por Ham y Wallace (*Meth. Enz.* 58:44, 1979), Barnes y Sato *Anal. Biochem.* 102: 255, 1980), Patentes de los Estados Unidos Núm. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; o 4.560.655; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; documento Pat. U.S. Re. Núm. 30.985; o Patente de los Estados Unidos Núm. 5.122.469 como medio de cultivo para las células anfitrionas. Cualquiera de estos medios puede completarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como GentamycinTM), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros suplementos necesarios a concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula anfitriona seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos en la técnica.

Las células anfitrionas a las que se hace referencia en esta descripción abarcan células en cultivo así como células que están dentro de una planta o animal anfitriones.

En un sistema de expresión intracelular o sistema de secreción al espacio periplásmico, la AAT expresada de forma recombinante se puede recuperar de las células cultivadas alterando la membrana celular y/o la pared celular del anfitrión (p.ej., por choque osmótico o solubilización de la membrana de la célula anfitriona en detergente). Alternativamente, en un sistema de secreción extracelular, se puede recuperar del medio de cultivo la proteína recombinante. Como primera etapa, el medio de cultivo o producto lisado se centrifuga para eliminar cualquier residuo celular particulado. La membrana y las fracciones de proteína soluble se separan a continuación. Los extractos brutos se pueden purificar adicionalmente mediante procedimientos adecuados tales como fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; resinas de afinidad hidrófobas y afinidad por ligando utilizando el receptor de interferón inmovilizado en una matriz.

Un agente que promueve la actividad de AAT puede hacerlo aumentando la secreción de AAT de una célula. Se ha demostrado que el ácido 4-fenilbútrico (PBA) provoca un marcado aumento en la secreción de 1-AZT, un mutante mal plegado pero funcionalmente activo de α 1-antitripsina, en un sistema de cultivo celular modelo (Burrows *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1796-1801, 2000) Sin embargo, PBA no está incluido en las presentes composiciones como un agente que promueve la expresión o actividad de α 1-antitripsina.

Los autores de la presente invención pueden hacer referencia a AAT (p.ej., AralastTM), variantes terapéuticamente activas de AAT (que incluyen variantes que difieren de una AAT de tipo salvaje en virtud de la manera en la que se modifican postraduccionalmente), ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos (es decir, que codifican AAT o una variante terapéuticamente activa de la misma (p.ej., un fragmento biológicamente activo u otro mutante)), o un agente que aumenta la actividad (p.ej., la secreción) de AAT como agentes relacionados con AAT. Aunque estos agentes se pueden utilizar para tratar a los pacientes descritos en la presente memoria, cualquiera de estos agentes relacionados con AAT, o cualquier combinación de los mismos, se puede combinar con al menos un agente farmacéutico adicional y/o co-administrar a un paciente descrito en la presente memoria. Cuando dos agentes son co-administrados, los autores de la presente invención pueden hacer referencia al "primer" y "segundo" agentes cuando se co-administran tres agentes, los autores de la presente invención pueden hacer referencia a "primer", "segundo" y "tercer" agentes; etcétera.

La co-administración se puede lograr combinando los agentes en una sola formulación, en cuyo caso los agentes se administrarían al mismo tiempo y por la misma vía. Las formulaciones que contienen al menos dos de los agentes descritos en la presente memoria (p.ej., un primer agente tal como AralastTM y un segundo agente tal como un anticuerpo anti-TNF α) se describen adicionalmente a continuación y están dentro del alcance de la presente invención. La co-administración también se puede lograr cuando los agentes se formulan de manera diferente (p.ej., uno en una formulación intravenosa y uno en una preparación oral) y se administran en el mismo o diferentes momentos (p.ej., secuencialmente y dentro de un marco de tiempo suficiente para tratar al paciente). La co-administración de más de un agente o más de un tipo de agente (p.ej., un agente relacionado con AAT y un agente

antiinflamatorio) puede provocar normoglucemia más pronto o producir un estado normoglucémico que persista más tiempo después del cese del tratamiento que con cualquier agente solo (sin embargo, no se requiere ningún beneficio particular como una característica de la invención). Las combinaciones de agentes útiles en los métodos descritos en la presente memoria incluyen la combinación de un agente relacionado con AAT y un agente antiinflamatorio. Por ejemplo, AAT o cualquier otro agente relacionado con AAT descrito en la presente memoria pueden co-administrarse con un agente antiinflamatorio tal como un agente antiinflamatorio no esteroideo (o AINE). Los AINE útiles incluyen pirazonas (p.ej., fenilbutazona (ButazolidinTM)), ácidos antranílicos (p.ej., ácido mefenámico (PonstelTM) y meclofenamato sódico (MeclomenTM), diflunisal (DolobidTM) y derivados del ácido acético (p.ej., diclofenaco sódico (VoltarenTM), indometacina (IndocinTM), sulindaco (ClinorilTM), etodolaco (LodineTM), ceterolaco (ToradolTM), nabumetona (RelafenTM) y tolmetina sódica (TolectinTM) y derivados ácido propiónico (p.ej., ibuprofeno (MotrinTM), fenoprofeno (NalfonTM), flurbiprofeno (AnsaidTM), carprofeno (RimadylTM), cetoprofeno (OrudisTM) y naproxeno sódico (AnaproxTM, NaprosynTM) y oxicamos (p.ej., piroxicam (FeldeneTM)).

Un agente relacionado con AAT también se puede co-administrar con un antagonista de TNF α . El TNF α , también conocido como caquectina, fue denominado así debido a su capacidad para causar necrosis tumoral *in vivo* cuando se inyectaba a ratones portadores de tumores. El TNF α se expresa inicialmente como una proteína unida a la membrana de 26 kDa, y posteriormente se escinde mediante la enzima convertidora de TNF α (TACE) para liberar un monómero soluble de 17 kDa que forma homotrímeros en la circulación. El TNF α recombinante existe como homodímeros, homotrímeros y homopentámeros. Funcionalmente, se cree que el TNF α tiene no solo actividad antitumoral sino también influencia en la modulación del sistema inmunitario, la inflamación, la anorexia, la caquexia, el choque séptico, la replicación viral y la hematopoyesis.

Los antagonistas de TNF α útiles incluyen agentes que interfieren con TNF α directamente (que es un anticuerpo anti-TNF α) o indirectamente (inhibiendo un radical en la ruta que se requiere para que TNF α afecte a los procesos celulares que es un antagonista del receptor de TNF α soluble).

Un anticuerpo anti-TNF α es uno que se une selectivamente a TNF α y puede ser un anticuerpo completo, incluyendo un anticuerpo humano completo, o un fragmento de anticuerpo o subfragmento del mismo. El anticuerpo puede ser una inmunoglobulina completa de cualquier clase (p.ej., IgG, IgM, IgA, IgD e IgE), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo híbrido con especificidades antigénicas o epitópicas duales o múltiples. Los fragmentos pueden ser, por ejemplo, F(ab)₂, Fab', Fab, y similares, incluyendo fragmentos híbridos. Además de los fragmentos de anticuerpos monovalentes clásicos tales como Fab y scFv, también se pueden utilizar variantes modificadas tales como diacuerpos, triacuerpos, minicuerpos y anticuerpos de dominio único. El anticuerpo puede ser adicionalmente cualquier inmunoglobulina o cualquier proteína natural, sintética o modificada genéticamente que actúa como un anticuerpo uniéndose a TNF α para formar un complejo. En particular, las moléculas de Fab se pueden expresar y ensamblar en un anfitrión genéticamente transformado como *E. coli*. Un sistema de vector lambda está disponible para expresar una población de Fab con una diversidad potencial igual o superior a la del sujeto que genera el anticuerpo predecesor (véase Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281, 1989). El anticuerpo anti-TNF α puede ser un anticuerpo monoclonal.

Como se indicó, se puede utilizar adalimumab (HumiraTM) y/o infliximab (RemicadeTM) en las presentes composiciones y métodos descritos en la presente memoria. También se pueden utilizar CDP571 (un anticuerpo anti-TNF α monoclonal humanizado), otros anticuerpos monoclonales anti-TNF α y D2E7 (un mAb anti-TNF humano).

Los métodos para preparar y utilizar anticuerpos son ahora bien conocidos en la técnica (véanse, p.ej., *Antibodies*, Ed Harlow y David Lane (Eds.), CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988; *Using Antibodies*, Ed Harlow y David Lane (Eds.), CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998), y esas técnicas se pueden aplicar para generar un anticuerpo anti-TNF α útil en los métodos descritos en la presente memoria.

Alternativamente, o además, un agente relacionado con AAT se puede formular con y/o co-administrar con un agente que inhibe selectivamente un radical con la ruta de señalización de TNF α (que es un antagonista de receptor soluble). El receptor se puede unir a una molécula de inmunoglobulina o una porción de la misma (p.ej., una región Fc (p.ej., una región Fc de una molécula de IgG)). Más específicamente, el antagonista del receptor soluble puede ser etanercept (EnbrelTM). Etanercept es una proteína de fusión recombinante que consiste en dos receptores de TNF solubles unidos por el fragmento Fc de una molécula de IgG1 humana. Etanercept actualmente está aprobado sólo para la artritis reumatoide y se administra en forma de inyección subcutánea de 25 mg administrada dos veces por semana. Este régimen produce niveles máximos en sangre en un promedio de 72 horas.

El antagonista del receptor soluble puede incluir un receptor de TNF α soluble completo o una porción u otro mutante del mismo que retiene suficiente actividad de unión a TNF α para reducir la actividad de TNF α en un grado clínicamente útil. Por ejemplo, el antagonista puede ser, o puede incluir, la forma truncada C-terminal previamente identificada del receptor de TNF humano soluble tipo I (sTNF-RI) que se incluyó en el antagonista denominado PEG-sTNF-RI o PEG(sTNF-RI) (p55). Este antagonista ha sido producido en *E. coli*, que es una fuente comúnmente utilizada de proteínas recombinantes, y contiene los primeros 2,6 de los cuatro dominios de la molécula de sTNF-RI intacta. Como se indicó, el receptor puede PEGilarse. Se ha producido una forma mono-PEGilada de esta molécula utilizando un aldehído de metoxi-PEG de 30 kDa con aproximadamente 85% de selectividad para el grupo amino N-terminal. Los antagonistas que contienen menos de un receptor de TNF α completo pueden ser menos

inmunogénicos que los que contienen un receptor completo. Los sitios de PEGilación y el peso molecular del PEG utilizado pueden variar y pueden ser idénticos a los de PEG-sTNF-RI. El PEG de 30 kDa utilizado previamente puede conferir una semivida en suero más larga a los antagonistas que los PEG de peso molecular más bajo (véase Edwards y col., *Adv. Drug. Res. Delivery* 55:1315-1336, 2003).

- 5 Otros inhibidores de TNF α aunque no están específicamente incluidos en la presente invención, incluyen agentes que inhiben selectivamente la expresión de TNF α , tales como moléculas de ARN que median en ARNi (p.ej., un ARNip o ARNhp selectivo de TNF α) y oligonucleótidos antisentido. Más específicamente, se puede administrar una molécula que media ARNi (p.ej., un ácido nucleico de interferencia corto (ANip), un ARN de interferencia corto (ARNip), un ARN de doble hebra (ARNdh) o un ARN en horquilla corto (ARNhp) como se describe en la publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20050227935.

Por consiguiente, alternativamente, o además, un agente relacionado con AAT se puede formular y/o co-administrar con un agente que inhibe selectivamente la expresión de TNF α (p.ej., una molécula de ARN anti-TNF α que media ARNi).

- 15 Alternativamente, o además, los pacientes se pueden tratar con un agente relacionado con AAT y, como agente que inhibe selectivamente un radical dentro de la ruta de señalización de TNF α , un inhibidor de TACE (enzima convertidora de TNF α). Sin embargo, las composiciones que contienen un agente relacionado con AAT y un inhibidor de TACE como un inhibidor de un radical dentro de la ruta de señalización de TNF α no están específicamente incluidos dentro del alcance de la invención.

- 20 Alternativamente, o adicionalmente, un agente relacionado con AAT se puede formular y/o co-administrar con un pequeño compuesto orgánico o inorgánico que inhibe el TNF α (p.ej., LMP420; Haraguchi *et al.*, *AIDS Res. Ther.* 3:8, 2006), talidomida o un análogo de talidomida, que, sin embargo, no está específicamente incluido en la presente invención como un inhibidor de TNF α , o un inhibidor de fosfodiesterasa tipo IV. La talidomida se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 2.830.991. Este agente tiene el nombre químico 3-ftalimido-piperidinodiona 2,6 y es un derivado del ácido glutámico. Las composiciones útiles, que incluyen las formuladas para administración tópica, pueden incluir talidomida, o un análogo de la misma, solubilizados en polietilenglicol. Las preparaciones adecuadas incluyen las descritas en la Patente de Estados Unidos Núm 5.443.824.

La talidomida se ha sugerido para la administración oral a niveles de dosificación en el intervalo de 10 mg a 300 mg.

- Los inhibidores de fosfodiesterasa tipo IV adecuados incluyen rolipram (p.ej., (-)-rolipram). Otros inhibidores adecuados de fosfodiesterasa tipo IV incluyen: (1) 1,3-Dibutil-3,7-dihidro-7-(2-oxopropil)-1H-purino-2,6-diona (Denbufilinas, BRL 30892); (2) 4-[(3-butoxi-4-metoxifenil)metil]-2-imidazolidinona (Ro 20-1724); (3) 4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]-2-pirrolidinona (rolipram, ZK 62711); (4) ácido 5,6-dietoxibenzo[b]tiofeno-2-carboxílico (Tibenelast, LY 186655); (5) 3-etil-1-(3-nitrofenil)-2,4(1H,3H)-quinazolidinona (nitracuazonas, TVX 2706); (6) 6-(3,6-dihidro-6-metil-2-oxo-2H-1,3,4-tiadiazin-5-il)-1-(3,4-dimetoxibenzoil)-1,2,3,4-tetrahidro-4,4-dimetilquinolina (EMD 54622); (7) etil éster de ácido 1-etil-4-[(1-metiletilideno)hidrazino]-1H-pirazolo[3,4-b]piridina-5-carboxílico (etazolatos); (8) N-hidroxi-5,6-dimetoxi-benzo[b]tiofeno-2-carboximidamida (Org 30029); (9) 2-amino-6-metil-4-propil-(1,2,4)triazolo[1,5-a]pirimidin-5(4H)-ona (ICI 63197); y (10) 6-[4-(difluorometoxi)-3-metoxifenil]-3(2H)-piridazinona (zardaverinas) (así como sus sales farmacológicamente compatibles).

- Los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo IV, particularmente el rolipram racémico u ópticamente activo, pueden producirse tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.193.626 o de acuerdo con el documento WO 92/06077. La dosis total diaria de rolipram es usualmente de 0,001-10 mg (p.ej., 0,01-5 mg). Si

(-)-rolipram se administra como ingrediente activo, la dosis diaria es preferiblemente de 0,001-5 mg. Después de varios días de titulación, la dosis total puede aumentarse significativamente si fuera necesario. Se puede obtener orientación adicional de la bibliografía conocida, que incluye la Patente de Estados Unidos Núm. 5.891.904.

- 45 Alternativamente, o además, un agente relacionado con AAT se puede formular y/o co-administrar con un antagonista de una citoquina inflamatoria (p.ej., un antagonista de IL-1, IL-6 o IL-8). Un antagonista de IL-1 conocido y útil, que puede incorporarse a las presentes composiciones y métodos es anakinra (KineretTM).

- Alternativamente, o además, un agente relacionado con AAT se puede formular y/o co-administrar con un agonista de un receptor de péptido similar a glucagón (GLP) o un agonista de un receptor de exendina (p.ej., GLP-1, Exendina-3, Exendina-4 o GLP-1(7-36)-amida). La Exendina-4, que también es conocida como exenatida (ByettaTM) se encuentra dentro de una clase relativamente nueva de medicamentos aprobados para el tratamiento de la diabetes Tipo 2. Es un mimético de incretina, que tiene efectos glucoreguladores (las incretinas conocidas, GLP-1 y GIP, no son útiles en el tratamiento debido a que su semivida circulante es demasiado corta; se encontró que la exenatida tiene una secuencia de aminoácidos similar, desencadena respuestas similares y tiene una semivida relativamente larga)). Se debe utilizar junto con medicamentos orales tales como la metformina y/o una sulfonilurea para mejorar el control de la glucosa. De acuerdo con los protocolos actuales, el medicamento se inyecta dos veces al día, y la respuesta humana típica es tanto una mejora en la liberación de insulina interna por parte del páncreas como la supresión de la liberación de glucagón en el páncreas.

Alternativamente, o además, un agente relacionado con AAT se puede formular y/o coadministrar con un agonista de CD3 (p.ej., un anticuerpo anti-CD3).

Como se indicó anteriormente, puesto que se sabe que muchos de los agentes, o tipos de agentes útiles en los métodos descritos en la presente memoria son útiles en el tratamiento de otras afecciones, un experto en la materia tiene acceso a información sustancial que puede utilizarse para formular y administrar los presentes agentes o combinaciones de agentes para los fines descritos en la presente memoria. Si se desea realizar estudios de toxicidad, eso se puede llevar a cabo.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de cualquier agente dado se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación. Por ejemplo, los cultivos celulares y los modelos animales experimentales pueden utilizarse para determinar la DL50 (la dosis letal para 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la razón DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos. Aunque pueden utilizarse compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios. Esto se verifica particularmente si se contempla la administración crónica.

Los datos obtenidos de los análisis de cultivo celular y los estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método descrito en la presente memoria, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de análisis de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración de plasma circulante que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Tal información puede utilizarse para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido (es decir, una dosis efectiva) (p.ej., de una AAT, un anticuerpo o antagonista de receptor soluble) puede oscilar entre aproximadamente 0,001 y 30 mg/kg de peso corporal (p.ej., de aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal; de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal; o de aproximadamente 1 a 10 mg/kg (p.ej., 2 a 9 mg/kg, 3 a 8 mg/kg, 4 a 7 mg/kg o 5 a 6 mg/kg de peso corporal)). El polipéptido se puede administrar de forma aguda o crónica. Por ejemplo, un polipéptido se puede administrar una vez por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas (p.ej., 2 a 8 semanas, 3 a 7 semanas o durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas). A pesar de esta pauta y otras pautas de dosificación y formulación proporcionadas aquí, un experto en la técnica apreciará que ciertos factores influirán en la dosificación y el tiempo requeridos para tratar eficazmente a un sujeto. Estos factores incluyen, entre otros, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido (p.ej., un anticuerpo) puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos.

Para los anticuerpos, las dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal (generalmente 10 mg/kg a 20 mg/kg) pueden ser más eficaces. En general, los anticuerpos parcialmente humanos y los anticuerpos completamente humanos tienen una semivida más larga en el cuerpo humano que otros anticuerpos. En consecuencia, a menudo son posibles dosis más bajas y una administración menos frecuente cuando se utilizan estos tipos de anticuerpos. El régimen de tratamiento también puede variar dependiendo de si se han usado modificaciones tales como lipidación para estabilizar los anticuerpos y/o mejorar la captación y la penetración en el tejido. Cruikshank y col. (*J. Acquired Immunodeficiency Syndrome y Human Retrovirology* 14:193, 1997)) describen un método para la lipidación de anticuerpos.

En el presente caso, un experto en la técnica puede considerar las dosificaciones de una AAT (p.ej., de Aralast™, Prolastin™ o Zemaira™) administrada previamente para determinar una dosis segura y eficaz para las indicaciones descritas aquí. La dosis recomendada de Aralast™ es de 60 mg/kg de peso corporal (p.ej., 15-90 mg/kg), y típicamente se administra una vez a la semana mediante infusión intravenosa. De acuerdo con las recomendaciones anteriores, Aralast™ debe administrarse en el plazo de las tres horas posteriores a su reconstitución para evitar el posible efecto nocivo de cualquier contaminación microbiana inadvertida que pueda haber ocurrido (p.ej., durante la reconstitución). Al igual que con otras terapias administradas de manera similar, cualquier contenido no utilizado debe descartarse. Con respecto a la infusión, Aralast™ se puede administrar a una velocidad que no exceda los 0,08 ml/kg de peso corporal/minuto (2,0 mg/kg de peso corporal/minuto). Si se producen eventos adversos, la velocidad debe reducirse o la infusión debe interrumpirse hasta que desaparezcan los síntomas. La infusión puede reanudarse a una velocidad que sea mejor tolerada por el sujeto. Con el tiempo, el tratamiento puede suspenderse si los síntomas diabéticos o prediabéticos del paciente se resuelven suficientemente bien. Otras vías de administración parenteral incluyen inhalación. Por ejemplo, puede incorporarse una AAT en una unidad de aerosol de dosis medidas que contiene, por ejemplo, una suspensión microcristalina del fármaco en una mezcla de propelentes de hidrocarburos halogenados solo o con un vehículo tal como ácido oleico. Los métodos descritos en la presente

memoria pueden llevarse a cabo utilizando cualquiera de las siguientes vías de administración: subcutánea, intravenosa, intratecal, intramuscular, intranasal, oral, transepidérmica, parenteral, mediante inhalación o intracerebroventricular. Las rutas intracerebroventriculares e intratecales son más invasivas y se espera que solo se utilicen con trastornos graves.

Los pacientes descritos en la presente memoria pueden ser sometidos a un régimen agudo, en cuyo caso pueden recibir solo una dosis única de uno o más de los agentes descritos, 2-3 dosis de uno o más de los agentes descritos, o hasta un tratamiento de un mes (de administraciones diarias o repetidas). Si bien los resultados experimentales de los autores de la presente invención indican que el tratamiento agudo puede ser eficaz y suficiente, puede ser necesario repetir un régimen agudo, o el tratamiento puede ser crónico (p.ej., en curso durante más de aproximadamente un mes (p.ej., por 30 días o más)).

En general, y a modo de ilustración, los antagonistas de TNF α pueden administrarse por vía subcutánea y se pueden administrar por esta vía a una dosificación en el intervalo de 5 mg a 50 mg (para regímenes agudos o crónicos); por vía intranasal y se pueden administrar por esa vía a una dosis en el intervalo de 0,1 mg a 10 mg (para regímenes agudos o crónicos); intramuscularmente y se pueden administrar por esa vía a una dosificación en el intervalo de 25 mg a 100 mg; por vía intravenosa y se pueden administrar por esa vía a una dosificación en el intervalo de 2,5 mg/kg a 20 mg/kg; por vía intratecal y se pueden administrar por esa vía a una dosis en el intervalo de 0,1 mg a 25 mg (p.ej., administrar de una vez al día a cada tres meses); transepidérmicamente y se pueden administrar por esa vía a una dosificación en el intervalo de 10 mg a 100 mg; mediante inhalación y se pueden administrar por esa vía a una dosificación en el intervalo de 0,2 mg a 40 mg; intracerebroventricularmente y se pueden administrar por esa vía a una dosis en el intervalo de 0,1 mg a 25 mg (p.ej., administrar de una vez al día a una vez cada 3 meses); por vía oral y se pueden administrar por esa vía a una dosificación en el intervalo de 10 mg a 300 mg.

Generalmente, y a modo de ilustración, el etanercept se puede administrar por vía intramuscular y se puede administrar por esa vía a una dosificación en el intervalo de 25 mg a 100 mg; por vía subcutánea y se puede administrar por esa vía a una dosificación en el intervalo de 5 mg a 50 mg; por vía intratecal y se puede administrar por esa vía a una dosis en el intervalo de 0,1 mg a 25 mg (p.ej., administrar de una vez al día a una vez al mes).

Generalmente, y a modo de ilustración, el infliximab se puede administrar por vía intravenosa y se puede administrar por esta vía en una dosificación en el intervalo de 2,5 mg/kg a 20 mg/kg; por vía intratecal y se puede administrar por esa vía a una dosis en el intervalo de 0,1 mg/kg a 5 mg/kg (p.ej., administrar de una vez por semana a una vez cada tres meses).

De las vías de administración disponibles, se espera que etanercept e infliximab se administren por vía subcutánea, intramuscular, intraventricular o intratecal o intravenosa.

Cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede llevarse a cabo junto con terapias de primera línea diseñadas para reducir los principales factores de riesgo de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. Estos incluyen programas e intervenciones farmacológicas para reducir o detener el hábito de fumar y para reducir el colesterol LDL, la presión arterial, el peso y los niveles de glucosa a los niveles recomendados. El exceso de peso también contribuye a la resistencia a la insulina porque demasiada grasa interfiere con la capacidad de los músculos de utilizar insulina. La falta de ejercicio reduce aún más la capacidad de los músculos de utilizar insulina.

Ejemplos

Animales: Se adquirieron ratones hembra NOD (NOD/LtJx) y NOD.SCID (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J) de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) de 4 semanas de edad y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en una instalación convencional para animales en el Hospital General de Massachusetts (Boston, MA). Todos los estudios en animales fueron aprobados por las juntas de revisión institucional de los autores de la presente invención. Los niveles de glucosa en sangre de ratones NOD se controlaron semanalmente con el sistema de verificación de glucosa en sangre Accu-CheckTM (Roche, Indianapolis, IN). Cuando se encontró que los niveles de glucosa en sangre no en ayunas de ratones NOD eran >300 mg/dl en tres días consecutivos, los ratones NOD se diagnosticaron como ratones diabéticos de inicio reciente y comenzó el tratamiento. Para los receptores de trasplante de islotes singénicos, los niveles de glucosa en sangre se controlaron en el momento del trasplante, a continuación diariamente durante las dos primeras semanas, y a continuación de 2 a 3 veces por semana después de eso.

Aislamiento de islotes: Se utilizaron ratones NOD.SCID de 10-12 semanas de edad como donantes para el trasplante de islotes. Los islotes se aislaron utilizando un método convencional, que era una modificación del método de Gotoh *et al.* en el que el conducto pancreático es distendido con colagenasa P (Gotoh *et al.*, *Transplantation* 40: 437, 1985). Después de la purificación en un gradiente de Histopaque (Histopaque^R-1077, Sigma Chemical Co., San Luis, MO), se recogieron a mano islotes con diámetros entre 75 y 250 μ m y se transplantaron debajo de la cápsula renal. Cada receptor recibió 600-800 islotes NOD.SCID.

Reactivos y protocolos de tratamiento:

Aralast™: Aralast™ (inhibidor de la α 1-proteinasa, humana) es un importante inhibidor de serina-proteasa en suero que inhibe la actividad enzimática de la elastasa de los neutrófilos, catespina G, proteinasa 3, trombina, tripsina y quimotripsina. Aralast™ se adquirió de Baxter (Westlake Village, CA) y se administró a una dosis de 2 mg i.p. cada 3 días, para un total de 5 inyecciones.

- 5 Anti-Factor de necrosis tumoral- α monoclonal: El anticuerpo producido en el clon TN3-19.12 de hámster (IgG1 de hámster) mAb específico para TNF murino, se adquirió de Sigma (San Luis, Misuri) y se administró a una dosis de 100 mg por vía i.p. cada dos días para 10 dosis.

- 10 Exendina-4: La Exendina-4, un agonista del receptor del péptido similar al glucagón (GLP-1), se adquirió de Sigma (San Luis, Misuri) y se administró i.p. una vez al día durante cuatro series de cinco días consecutivos, con una interrupción de dos días entre las cuatro administraciones de tratamiento.

Estudios *in vivo* de señalización de insulina: Los experimentos *in vivo* de señalización de insulina se realizaron en ratones después de un ayuno de 16 horas. A los ratones se les inyectaron i.p. 20 U/kg de PC de insulina humana (Eli Lilly) o solución salina. El músculo esquelético (gastronemio) se disecó y se congeló en nitrógeno líquido para el análisis de inmunotransferencia de las proteínas de señalización de la insulina.

- 15 Inmunotransferencia (IT): El músculo esquelético (gastronemio), obtenido en el contexto de los estudios de señalización de insulina *in vivo* de los autores de la presente invención se homogeneizaron en un tampón de análisis de radioinmunoprecipitación modificado (RIPA) que contenía Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,25%, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, Na_3VO_3 200 μM , con un suplemento de cóctel inhibidor de proteasa al 1% (Sigma) y cóctel inhibidor de tirosina fosfatasa al 1% (Sigma). Los productos homogeneizados de células se incubaron en hielo durante 45 minutos para solubilizar todas las proteínas, y las porciones insolubles se eliminaron mediante centrifugación a 14.000 g a 4°C durante 15 minutos. Los productos lisados celulares completos se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (PAGE). Las proteínas en los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Las membranas transferidas se bloquearon, se lavaron, se incubaron con diversos anticuerpos primarios y a continuación se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-receptor de insulina (IR; pY1162/1163) y anti-sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1; pY612) se adquirieron de BioSource (BioSource International, Inc., Camarillo, CA). El anticuerpo anti-IR policlonal de conejo se adquirió de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA). El anti-IRS-1 policlonal de conejo se obtuvo de Upstate (Lake Placid, NY). La visualización se realizó con reactivo de quimioluminiscencia, utilizando el sistema de análisis de transferencia Western ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Las transferencias se cuantificaron utilizando densitometría (Molecular Dynamics, Sunnvale, CA).

- 35 Prueba de tolerancia a la insulina: La prueba de tolerancia a la insulina (ITT) se realizó en (1) ratones NOD diabéticos de inicio reciente tratados con Aralast™; (2) ratones NOD diabéticos de inicio reciente tratados con mAb anti-TNF- α ; (3) ratones NOD diabéticos de inicio reciente tratados con Aralast™ y mAb anti-TNF- α ; (4) ratones NOD no diabéticos (NOD) emparejados por edad; y (5) ratones NOD diabéticos de inicio reciente (NODsp). El alimento comida fue retenido 3 horas antes de la prueba. Los animales se pesaron y las muestras de sangre se recogieron a los 0 minutos. A los animales se les inyectaron i.p. 0,75 U/kg de insulina humana regular (Novolin, Novo Nordisk Pharmaceutical Industries, Inc. Clayton, NC), y se tomaron muestras de sangre 15, 30 y 60 minutos más tarde. Los resultados se expresaron como porcentaje de la concentración inicial de glucosa en sangre.

- 40 Resultados: Los resultados que obtuvieron los autores de la presente invención tratando los animales con Aralast™, anticuerpos anti-TNF- α , Exendina-4 y diversas combinaciones de estos agentes se muestran en la Tabla 1. En todos los paradigmas, se logró la normoglucemia, a menudo después de un breve período de tiempo, en 80-90% de los ratones tratados con Aralast™, anticuerpos anti-TNF- α y 65% en los animales tratados con Exendina-4 sola. Dos animales tuvieron valores atípicos, alcanzando normoglucemia solo después de 49 y 55 días (véase la columna 2 de la Tabla 1). La última columna muestra durante cuánto tiempo los animales fueron normoglucémicos. Los animales todavía estaban vivos hasta este escrito.

Tabla 1: Compendio de diferentes grupos de tratamiento que utilizan Aralast, Anti-TNF- α o Exendina-4.

Tratamiento	Normoglucemia alcanzada (intervalo en días)	Normoglucemicos/Número total de ratones tratados	Días después del tratamiento
Aralast™	1-22 (49, 55)	14/16	90-300
Anti-TNF- α	1-38	22/24	180-230
Aralast™ + Anti-TNF- α	1-12	11/14	120-250

ES 2 651 268 T3

Tratamiento	Normoglucemia alcanzada (intervalo en días)	Normoglucemicos/Número total de ratones tratados	Días después del tratamiento
Aralast™ + Exendina-4	1, 1, 4, 15, 38	5/5	180-250
Anti-TNF- α + Exendina-4	1, 1, 2, 11, 22	5/5	170-210
Exendina-4	1, 14, 41, 55	4/6	170-300

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para su uso en un método para tratar a un paciente resistente a la insulina que ha sido diagnosticado de diabetes Tipo 2, que se diagnostica con riesgo de desarrollar diabetes Tipo 2, o que ha sido diagnosticado de síndrome metabólico, en donde el agente es una construcción genética que codifica un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina completo o un fragmento o mutante del mismo biológicamente activos y en donde el fragmento o mutante biológicamente activos tienen actividad inhibidora de $\alpha 1$ -proteínasa .
2. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un agente que inhibe selectivamente TNF α o un radical de la ruta de señalización de TNF α para su uso en dicho método, en donde el agente que inhibe selectivamente el TNF α o un radical de la ruta de señalización de TNF α es un anticuerpo anti-TNF α o un antagonista del receptor de TNF α soluble.
3. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente anakinra para su uso en dicho método.
4. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente un anticuerpo anti-CD3 para su uso en dicho método.
5. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el paciente es un paciente humano, en particular en donde el paciente humano es un niño o un adolescente.
6. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para el uso de la reivindicación 1, en donde el paciente ha sido diagnosticado de diabetes Tipo 2 en base a uno o más de los siguientes hallazgos:
 - (a) hiperglucemia junto con un nivel de insulina normal o elevado;
 - (b) hiperglucemia junto con evidencia de mantenimiento de células β pancreáticas;
 - (c) hiperglucemia junto con una respuesta de glucosa en sangre atenuada a la insulina; o
 - (d) hiperglucemia y antecedentes familiares de diabetes Tipo 2.
7. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para el uso de la reivindicación 6, en donde el nivel normal o elevado de insulina se refleja por un nivel normal o elevado de péptido C.
8. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para el uso de la reivindicación 6 o 7, en donde el paciente es un paciente humano, en particular en el que el paciente humano es un adulto.
9. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para el uso de la reivindicación 1, en donde se ha diagnosticado que el paciente está en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 2 en base a uno o más de los siguientes hallazgos:
 - (a) tolerancia alterada a la glucosa con o sin características del síndrome metabólico;
 - (b) tolerancia a la glucosa normal o alterada con hiperinsulinemia; o
 - (c) tolerancia alterada a la glucosa y antecedentes familiares de diabetes Tipo 2,
- en particular, en donde las características del síndrome metabólico incluyen obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica, un estado protrombótico, presión sanguínea elevada y niveles elevados de citoquinas inflamatorias, en donde la hiperinsulinemia se refleja por un nivel elevado de péptido C, o en donde se ha diagnosticado que el paciente está en riesgo de desarrollar diabetes Tipo 2 es una paciente que ha tenido diabetes gestacional.
10. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para el uso de la reivindicación 9, en donde el paciente es un paciente humano, en particular en donde el paciente humano es un adulto.
11. Un polipéptido de $\alpha 1$ -antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de $\alpha 1$ -antitripsina para el uso de la reivindicación 1, en donde el paciente ha sido diagnosticado de síndrome metabólico basándose en una combinación de dos o más de las siguientes características:
 - (a) obesidad abdominal;

- (b) dislipidemia aterogénica;
- (c) un estado protrombótico;
- (d) presión arterial elevada; y
- (e) niveles elevados de citoquinas inflamatorias.

5 12. Un polipéptido de α 1-antitripsina o un agente que promueve la expresión o actividad de α 1-antitripsina para el uso de la reivindicación 11, en donde el paciente ha sido diagnosticado de síndrome metabólico basándose en la presencia de tres o más de:

- (a) circunferencia de cintura elevada;
- (b) triglicéridos elevados;

- 10
- (c) lipoproteínas de alta densidad reducidas;
 - (d) presión arterial elevada; y
 - (e) glucosa elevada en ayunas

FIG. 1

