



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 350 924**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02793811 .7**

(96) Fecha de presentación : **22.10.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1444516**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2004**

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

(30) Prioridad: **22.10.2001 US 336394 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.01.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.01.2011

(73) Titular/es: **AMGEN, Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US
The Board of Regents, The University of Texas
System y
The Government of The United States of America,
Represented by the Secretary, Department of
Health and Human Services

(72) Inventor/es: **Garg, A.;**
Oral, Elif, Arioglu;
Depaoli, Alex M. y
Taylor, Simeon I.

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).

USO DE LEPTINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA LIPOATROFIA HUMANA Y MÉTODO PARA DETERMINAR LA PREDISPOSICIÓN A DICHO TRATAMIENTO.
DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al uso terapéutico de leptina, análogos de leptina y derivados de leptina en el tratamiento de la lipoatrofia humana.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Citas completas de las referencias pueden hallarse al final de la descripción detallada.

[0003] Los síndromes de lipoatrofia (conocida también como lipodistrofia) constituyen un grupo heterogéneo de síndromes caracterizados por una escasez de tejido adiposo o graso. Esta enfermedad puede tener también asociadas anormalidades metabólicas. Esas anormalidades metabólicas incluyen la hipertrigliceridemia y la resistencia grave a la insulina acompañada habitualmente por diabetes mellitus (Reitmann et al., 2000). En humanos la lipoatrofia puede ser heredada genéticamente o adquirida. Hay más de una forma genética de lipoatrofia. Por ejemplo, se ha demostrado que las mutaciones en el gen que codifica el lamin A/C (LMNA) están relacionadas con la lipodistrofia parcial familiar tipo Dunnigan (FPLD, Familiar Partial Lipodystrophy) (Cao et al., 2000). Los individuos con FPLD de Dunnigan nacen con una distribución de grasa normal, pero al llegar a la pubertad desarrollan una pérdida progresiva de grasa en las extremidades y troncal, que no afecta al tejido adiposo visceral y de cabeza y cuello. Una localización cromosómica distinta (9q34) se ha asociado también a un gen de enfermedad de lipodistrofia congénita generalizada (Garg et al., 1999). La lipodistrofia congénita generalizada es un trastorno recesivo caracterizado por una casi completa ausencia de tejido adiposo desde el nacimiento, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia y acantosis nigricans.

[0004] Algunas formas de lipoatrofia en humanos son adquiridas. Por ejemplo, muchos pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y tratados con terapia antirretroviral de alta actividad (HAART, Highly Active Antiretroviral Therapy) desarrollan una lipodistrofia parcial, caracterizada por la pérdida de grasa subcutánea del rostro, extremidades y tronco, con aumento de la grasa visceral y una “joroba de búfalo” semejante a la que se observa en el síndrome de Cushing. Estos pacientes pueden desarrollar también trastornos metabólicos, tales como resistencia insulínica e hipertrigliceridemia. Las formas adquiridas de lipoatrofia pueden estar también relacionadas con la dermatomiositis juvenil y otras enfermedades autoinmunes.

[0005] Investigaciones realizadas en modelos animales han demostrado que esas anomalías metabólicas pueden ir asociadas a pérdida de grasa (Gavrilova et al., 2000). Pero la resistencia insulínica y la hipertrigliceridemia que caracterizan a la lipoatrofia han demostrado ser extremadamente refractarias al tratamiento, aún cuando se han probado diversos enfoques (Garg, 2000). Uno de esos enfoques incluye el tratamiento con tiazolidinedionas, que son agonistas PPAR γ Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , receptor γ activado por proliferador de peroxisomas). Si bien las tiazolidinedionas son atractivas porque favorecen la diferenciación de adipocitos y la sensibilidad a la insulina, los pacientes a quienes se administran tiazolidinedionas son tratados generalmente con una terapia combinada, incluyendo insulina a altas dosis, agentes hipoglicémicos orales (ej. metformina y tiazolidinedionas), y fármacos hipolipemiantes (ej., fibratos y estatinas). A pesar de estas terapias, los pacientes con lipoatrofia siguen presentando hipertrigliceridemia grave (lo que provoca episodios recurrentes de pancreatitis aguda), hiperglicemia grave (que plantea el riesgo de retinopatía y nefropatía diabéticas), y esteatohepatitis no alcohólica (que puede provocar cirrosis) (Arioglu et al., 2000). De hecho, una de las tiazolidinedionas, la troglitazona, fue eliminada del mercado en los EE UU debido a su hepatotoxicidad, rara pero grave, lo que dejó a dos tiazolidinedionas (rosiglitazona y pioglitazona) disponibles (Reitmann, et al.). Por tanto, es necesario un tratamiento alternativo para la lipoatrofia.

[0006] Se han desarrollado y comprobado diversos modelos animales de lipoatrofia modificados genéticamente. Pero estos modelos proporcionan resultados contradictorios en cuanto a la sensibilidad de esos animales al tratamiento con leptina. Por ejemplo, en un modelo de ratón transgénico, que expresa una versión nuclear truncada de SREBP-1

c e imita las características de la lipodistrofia generalizada congénita con resistencia a la insulina y un tejido adiposo marcadamente escaso, la infusión sistémica continua de leptina superó la resistencia a la insulina de los ratones (Shimomura et als., 1999). Por otra parte, un ratón transgénico distinto, que expresa el gen A-ZIP/F-1 y se caracteriza por la falta de tejido graso, una resistencia a la insulina grave, diabetes y unos niveles de leptina sérica muy reducidos, no respondió a la leptina a dosis similares, y dosis superiores resultaron mínimamente efectivas (Gavrilova et als, 2000). Toda eficacia con leptina disminuye también con la edad del animal (Id.). Además, aunque la resistencia a la insulina fue superada con leptina en los ratones transgénicos SREBP-1c, no se observó una regresión de la lipoatrofia (Shimomura et al.).

[0007] Actualmente, el uso de la leptina en terapia humana se ha centrado principalmente en la reducción de la obesidad y su disfunción metabólica asociada (Heymsfield et als. 1999). Los pacientes con ausencia de leptina debido a mutaciones en el gen de la leptina tienen obesidad mórbida desde la infancia y presentan diversas anormalidades hormonales, incluyendo resistencia insulínica e hipogonadismo hipogonadotrópico (Montague et als., 1997). En uno de esos pacientes, la sustitución fisiológica con leptina recombinante durante un año resultó en una significativa reducción de peso y mejoría de las anormalidades hormonales (Farooqi et als., 1999; Solicitud PCT N°.: WO 00/20872). En estos estudios previos no se abordó el empleo de leptina en el contexto de la lipoatrofia humana.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La presente invención, como se reivindica, propone la proteína de leptina para su uso en el tratamiento en humanos con lipoatrofia y las anormalidades metabólicas asociadas, y un método para determinar la predisposición al tratamiento con leptina. En una versión, la leptina humana es usada en la terapia de sustitución hormonal en pacientes lipoatróficos con una baja concentración de leptina en suero. De preferencia se utiliza leptina recombinante humana. Las proteínas de la leptina pueden ser administradas por vía subcutánea o sistémica, o por cualquier otra vía, incluyendo métodos de terapia genética.

[0009] Al evaluar la predisposición del paciente lipoatrófico al tratamiento con leptina, puede determinarse la concentración sérica de leptina. De preferencia son sometidos al tratamiento con leptina los pacientes con una concentración sérica de leptina inferior a 4 ng/ml, y aún mejor inferior a 2 ng/ml, y preferiblemente inferior a 0,5 ng/ml. También es preferible que el tratamiento con leptina se administre a pacientes del sexo femenino con una concentración sérica de leptina < 4 ng/ml y a pacientes del sexo masculino con una concentración sérica de leptina < 3 ng/ml. Preferiblemente, la leptina se administra a pacientes masculinos con una concentración sérica de leptina < 2 ng/ml.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA

[0010] La Figura 1A muestra la evolución clínica de la paciente NIH-1 con 4 meses de terapia con leptina. Se presentan datos históricos anteriores a la terapia con leptina (iniciada el Día 0) para demostrar la gravedad de los datos metabólicos. Se muestran importantes hitos de la terapia y de la mejoría de los parámetros metabólicos. La Figura 1B presenta imágenes de resonancia magnética axial ponderada en T1 de la paciente NIH-1 a nivel de L4 basal y a los 4 meses de terapia con leptina. Obsérvese la reducción del tamaño del hígado, y los consiguientes cambios de posición de los riñones y las estructuras de la línea media.

[0011] La Figura 2 muestra que la leptina reduce la HbA_{1c} en los pacientes diabéticos ($n=8$). Los datos se presentan como cambios medios y las barras de error indican un Intervalo de Confianza del 95%. También se presenta el valor basal y a los 4 meses $\pm$ EEM (error estándar de la media).

* $p<0,001$

[0012] La Figura 3 muestra que la leptina mejora la curva de glucosa durante la tolerancia a la insulina y la tolerancia a la glucosa oral ($n=9$). Panel A: Glucosa en plasma en respuesta a 0,2 U.kg de insulina IV antes (círculos cerrados y línea continua) y 4 meses después (círculos abiertos y línea de puntos) de la terapia con leptina. Las barras de error indican un EEM * $p<0,02$. Panel B: Glucosa en plasma en respuesta a 75 g de glucosa oral antes (círculos cerrados y línea continua) y 4 meses después (círculos abiertos y línea de puntos) de la terapia con leptina. Las barras de error indican EEM.

* $p<0,01$

[0013] La Figura 4 muestra que la leptina reduce los triglicéridos. Los datos se presentan como el cambio medio desde los valores basales y las barras de error representan un Intervalo de Confianza del 95%. Se presentan también los valores medios basales y a los 4 meses con los rangos observados. Téngase en cuenta que los datos son asimétricos y no siguen una distribución normal. * $p < 0,001$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS VERSIONES PREFERIDAS

[0014] La hormona leptina del adipocito desempeña una función central en la homeostasis energética. Fue descubierta por primera vez en el ratón obeso como el factor sérico ausente que reducía la ingesta de alimentos y el peso corporal al ser sustituido (Zhang et als., 1994; Pelleymounter et als., 1995). Debido a esas observaciones iniciales, buena parte del intento terapéutico anterior en la utilización de esta hormona se ha centrado en el tratamiento de la obesidad. En la mayoría de los humanos obesos las concentraciones séricas de leptina son elevadas, y se cree que existe un estado de resistencia a la leptina (Mantzoros et als., 2000). Hasta ahora, ha sido limitado el efecto de la leptina recombinante humana para producir pérdida de peso en individuos obesos, excepto en la situación de deficiencia de leptina congénita (Heymsfield et als., 1999; Farooqi et als., 1999).

[0015] La presente invención hace factible el uso de las proteínas de la leptina en el tratamiento de la lipoatrofia y las anormalidades metabólicas asociadas en humanos, tales como hiperglicemia, dislipidemia, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, aterosclerosis, restenosis vascular y resistencia insulínica. Los resultados de estudios realizados en pacientes con VIH han demostrado que el descenso en las concentraciones séricas de leptina está estrechamente relacionado con la aparición de lipoatrofia adquirida. Además, la sustitución de la leptina en pacientes lipoatróficos mejora de forma espectacular el metabolismo de la glucosa y los triglicéridos, incluso después de agotarse todas las demás terapias potenciales. En todos estos casos de sustitución de leptina, la concentración sérica basal de leptina fue inferior a 4 ng/ml.

[0016] En un caso grave de lipoatrofia adquirida, el paciente (con una concentración sérica de leptina $< 0,5$ ng/ml)

tenía hipertrigliceridemia grave, diabetes, xantomas cutáneos eruptivos dolorosos y hepatomegalia masiva. El tratamiento con leptina durante 4 meses mejoró espectacularmente la hipertrigliceridemia y la hiperglicemia del paciente, lo que permitió la interrupción de la plasmaféresis y otras medicaciones para la diabetes. Las mejorías fueron también acompañadas de la desaparición de los xantomas cutáneos, y el volumen del hígado del paciente se redujo un 40%. Por tanto, estos datos demuestran que la terapia de la sustitución de leptina puede ser utilizada de forma efectiva para tratar la lipoatrofia adquirida o congénita y las anormalidades metabólicas asociadas en humanos.

[0017] Además, en base a estos datos, se puede extrapolar que los pacientes con una concentración sérica de leptina inferior a 4 ng/ml pueden constituir un grupo preferente de pacientes para la terapia de sustitución con leptina. Los niveles de leptina pueden ser medidos utilizando un fluido corporal, de preferencia sangre o cualquier porción de ella. Aquí se utilizaron sueros de individuos. Otros fluidos corporales pueden contener también leptina medible, como es la sangre entera, el líquido cerebroespinal, el plasma y posiblemente la orina. Las mediciones presentes de 4 ng de leptina/ml de suero pueden correlacionarse con los niveles correspondientes en otros fluidos corporales. Por ejemplo, si se utiliza sangre entera la concentración de leptina se diluirá para tener en cuenta el efecto diluyente de emplear sangre no fraccionada.

[0018] Un experto en la materia podrá determinar las dosis efectivas administrando leptina, un análogo de leptina o un derivado de leptina y observando el efecto terapéutico deseado. El objetivo de la terapia de sustitución es conseguir concentraciones casi fisiológicas de leptina en plasma. Se calcula que la dosis de sustitución fisiológica de leptina es de aproximadamente 0,02 mg por kilogramo de peso corporal/día para varones de todas las edades, 0,03 mg kilogramo/día para mujeres de menos de 18 años y de aproximadamente 0,04 mg por kilogramo/día para mujeres adultas. Al intentar alcanzar concentraciones casi fisiológicas de leptina, se podría, por ejemplo, tratar a un paciente con un 50 por ciento de la dosis de sustitución estimada en el primer mes de tratamiento, un 100 por ciento de la dosis de sustitución en el segundo mes de tratamiento, un 200 por ciento de la dosis de sustitución en el tercer mes de tratamiento, etc. Durante la terapia de sustitución de leptina, se pueden medir determinados marcadores bioquímicos para monitorizar el efecto terapéutico del

tratamiento con leptina. Los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) y de triglicéridos (en ayunas) son algunos de los marcadores preferidos para medir el efecto terapéutico y monitorizar la eficacia del tratamiento con leptina.

[0019] Alternativamente, se pueden medir los niveles séricos de leptina utilizando inmunoensayos disponibles en el comercio, como se muestra en los siguientes Ejemplos. En general, un ensayo diagnóstico para medir la cantidad de leptina en sangre (o plasma o mezcla) puede usarse primero para determinar los niveles endógenos de proteína. Tales herramientas de diagnóstico pueden ser en forma de un ensayo de anticuerpos, como un ensayo sandwich de anticuerpos. La cantidad de leptina endógena se cuantifica inicialmente, y se determina el valor basal. Las dosis terapéuticas se determinan como la cuantificación de proteínas de leptina endógena y exógena (es decir, leptina, análogo de leptina o derivado de leptina hallada en el cuerpo, tanto autoproducida como administrada). Durante la terapia se siguen monitorizando los niveles de leptina del paciente.

[0020] La presente invención propone también composiciones farmacéuticas de proteína de leptina para uso terapéutico. Tales composiciones farmacéuticas pueden ser para administración por inyección, o para administración oral, pulmonar, nasal, transdermal o de otra forma. Entre los métodos preferidos de administración de proteínas de leptina están los métodos subcutáneos, sistémicos y de terapia génica.

[0021] En general, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden cantidades efectivas de proteínas de leptina junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido tampón (ej., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y potencia iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (ej., Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (ej., ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (ej., timersol, alcohol bencílico) y sustancias de relleno (ej., lactosa, manitol); incorporación del material a preparaciones de partículas de compuesto polimérico tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., o en liposomas. También se puede utilizar el ácido hialurónico, y esto puede tener como efecto favorecer una duración sostenida en la circulación. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación in vivo, y el índice de aclaramiento in vivo de las proteínas y derivados

presentes. Ver, ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18° Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712 que se incorporan aquí como referencia. Las composiciones pueden prepararse en forma líquida, o en polvo seco, como la forma liofilizada. También se contemplan las formulaciones de liberación sostenida, como son las transdermales.

[0022] Para facilitar la disolución de la terapia en el entorno acuoso se puede añadir un surfactante como agente humectante. Entre los surfactantes pueden incluirse detergentes aniónicos como el lauril sulfato sódico, el dioctil sulfosuccinato sódico y el dioctil sulfonato sódico. Se pueden utilizar detergentes catiónicos, y entre ellos el cloruro de benzalconio o el cloruro de bencetonio. A la lista de potenciales detergentes no iónicos que pueden incluirse en la formulación como surfactantes hay que incorporar también el lauromacrogol 400, el polioxil 40 estearato, el polioxietileno del aceite de ricino hidrogenado 10, 50 y 60, el glicerol monoestearato, el polisorbato 40, 60, 65 y 80, el éster de ácido graso de la sucrosa, la metil celulosa y la carboximetil celulosa. Estos surfactantes pueden hallarse presentes en la formulación de la proteína o del derivado, solos o como una mezcla de distintas proporciones.

[0023] Aditivos que potencialmente aumentan la captación de las proteínas de leptina son, por ejemplo, los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico.

[0024] Puede ser deseable una formulación de liberación controlada. Las proteínas de la leptina podrían ser incorporadas a una matriz inerte que permita la liberación por difusión o por mecanismos de lixiviación, ej. gomas. También pueden incorporarse a la formulación matrices de degeneración lenta, ej. alginatos, polisacáridos. Otra forma de una liberación controlada de esta terapia es un método basado en el sistema terapéutico Oros (Alza Corp.), es decir, la proteína de la leptina se encierra en una membrana semipermeable, lo que permite al agua entrar y empujar a la proteína hacia fuera a través de una única abertura pequeña, debido a los efectos osmóticos. Algunas cubiertas entéricas tienen también un efecto de liberación retardada.

[0025] Además, la presente invención contempla también kits para determinar la predisposición de un paciente humano con lipoatrofia a responder al tratamiento con proteínas de leptina. En un aspecto, un kit mejorado puede proporcionar medios para determinar si el nivel de leptina del paciente previo al mencionado tratamiento con leptina es inferior o igual a aproximadamente 4 ng/ml. En un aspecto relacionado, un kit

mejorado puede tener en cuenta el sexo de un paciente en la determinación del nivel de leptina en el paciente previo al mencionado tratamiento con leptina. En ese caso, el kit puede proporcionar medios para determinar si el nivel de leptina del paciente previo al mencionado tratamiento con leptina es inferior o igual a aproximadamente 2 ng/ml si el paciente es del sexo masculino, o inferior o igual a aproximadamente 4 ng/ml si el paciente es del sexo femenino. De preferencia, el kit comprende instrucciones de uso. El kit puede incluir también reactivos, tubos, embalaje y/o otros componentes de la reacción.

[0026] Las siguientes descripciones se dan solamente como ejemplos y no deben ser interpretadas como limitantes de las reivindicaciones. En base a la descripción, un experto en la cuestión puede introducir modificaciones y cambios en las versiones preferidas, que no se separen del ámbito de la invención como se reivindica.

EJEMPLO 1

[0027] El siguiente ejemplo demuestra que el desarrollo del síndrome de lipoatrofia asociada a VIH (HIV-LS) puede verse influido por una leptina reducida en suero, que contribuye a la acumulación, la pérdida o redistribución de la grasa corporal.

[0028] En especial, se realizó un estudio con el objetivo de determinar si el fenotipo de lipoatrofia en la HIVLS va asociado a cambios en la leptina sérica tras la iniciación de terapia antirretroviral de alta actividad (HAART). En este estudio se incluyeron ciento cuarenta y seis (146) hombres VIH positivos cuyas concentraciones de leptina sérica se compararon antes y después de HAART. Mediante examen físico, los hombres fueron evaluados y estratificados en los dos principales fenotipos: lipoatrofia sola, y lipoatrofia con aumento de grasa central (HIV-LS "mixta").

[0029] De los 146 hombres, en cuarenta y dos (42/146) se observó lipoatrofia o lipohipertrofia moderada o grave en más de una zona corporal tras HAART. Veintisiete de los 146 (27/146) tuvieron lipoatrofia sola y quince (15/146) cambios "mixtos" después de HAART. Treinta y nueve de los 146 (39/146) no presentaban cambios de hábitos corporales y estos pacientes sirvieron como controles. En general, los hombres con HIV-LS eran mayores y con un uso más prolongado de inhibidores de la proteasa. También tenían unos recuentos de CD4 basales más bajos y habían perdido una media de 4 kg de peso corporal desde los valores basales.

[0030] Antes de HAART, la mediana de los niveles basales de leptina para los grupos de lipoatrofia y “mixto” fue de 3,6 ng/ml, y la mediana del nivel de leptina en el control fue de 4,1 ng/ml. En aquellos que desarrollaron lipoatrofia sola tras HAART, la concentración de leptina sérica descendió significativamente de 3,6 a 2,8 ng/ml (Wilcoxon $p = ,006$). Por otra parte, los niveles séricos de leptina se mantuvieron estables en el grupo de HIV-LS “mixta” (4,0 ng/ml) [$p=NS$] y en los 39 controles VIH positivos que no desarrollaron HIV-LS (3,7 ng/ml) [$pn=NS$].

[0031] Estos datos sugieren que un nivel reducido de leptina tras terapia antirretroviral de alta actividad en pacientes VIH positivos puede contribuir al desarrollo del síndrome de lipoatrofia.

EJEMPLO II

[0032] Para determinar la eficacia del uso de leptina en el tratamiento de la lipoatrofia en humanos, se procedió también a la terapia de sustitución de leptina en nueve pacientes del sexo femenino, a quienes se había diagnosticado distintas formas de lipoatrofia. Las pacientes de este estudio fueron referidas por múltiples médicos de los Estados Unidos y Europa. Para ser elegibles, las pacientes debían tener niveles bajos (definidos como una concentración de leptina sérica $<3,0$ ng/ml en los hombres y $<4,0$ ng/ml en las mujeres) asociados con lipodistrofia, y por lo menos una de las siguientes anormalidades metabólicas: (1) Presencia de diabetes mellitus según los criterios de la American Diabetes Association (Ver Peters et als., 1998); (2) concentraciones séricas de triglicéridos en ayunas >200 mg/dL; y/o (3) concentraciones séricas de insulina en ayunas $>30\mu\text{U/ml}$. El diagnóstico de lipodistrofia se basó en criterios clínicos bien conocidos por los expertos en la materia.

[0033] En la Tabla 1 se resumen las características clínicas basales de las pacientes tratadas en el estudio.

TABLA 1: Características de las Pacientes

Paciente	Edad/Sexo/ Tipo	Terapia Hipolipemiente	Insulina en Ayunas ¹ ($\mu\text{U/ml}$)	Leptina ² (ng/ml)	RMR ³ (kcal/día)	Grasa Total ⁴ (%)
NIH-1	17/F	Fenofibrato	31,2	$<0,5$	2010	7

	Adquirida Generalizada	Atorvastatina Orlistat, Plasmaféresis Semanal				
NIH-2	17/F Congénita Generalizada	Ninguna	334	1,0	2030	17
NIH-3	27/F Adquirida Generalizada	Ninguna	19	0,7	1570	18
NIH-4	17/F Congénita Generalizada	Ninguna	211	1,1	2480	17
NIH-5	15/F Congénita Generalizada	Ninguna	115	0,8	2670	15
NIH-6	37/F Congénita Generalizada	Ninguna	25	0,6	1370	15
NIH-7	42/F Familiar Parcial	Gemfibrozilo	40,3	3,6	1980	26
UTSW-1	31/F Congénita Generalizada	Fenofibrato	61,5	0,7	1702	8
UTS W-25	33/F Adquirida Generalizada	Gemfibrozilo	12,3	2,4	1497	14

1 Insulina en ayunas, factor de conversión a pmol/l: 7,15X (obsérvese que algunas pacientes reciben terapia con insulina exógena)

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

3 Resting metabolic rate (índice metabólico en reposo)

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

5 Paciente no diabética

[0034] Los nueve pacientes reclutados en el estudio eran del sexo femenino. Aunque el estudio estaba abierto a ambos géneros, las mujeres tienden a ser identificadas antes y con mayor frecuencia. Cinco de las nueve pacientes tenían lipodistrofia congénita generalizada o el Síndrome de Seip-Beradine. Este diagnóstico fue establecido con evidencia de pérdida de grasa generalizada desde el nacimiento, asociada a otros criterios clínicos (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM #269700; Garg et als., 1992). Tres pacientes tenían lipodistrofia adquirida generalizada con una historia de pérdida de grasa aparente en la niñez. Una de esas pacientes (UTSW-2) desarrolló lipodistrofia generalizada con dermatomiositis juvenil. Otra paciente (NIH-7) presentó lipodistrofia familiar parcial variedad Dunnigan (OMIM # 151660; Garg, 1999; y Cao et als., 2000).

Diseño del Estudio

[0035] El estudio fue diseñado como un ensayo prospectivo abierto en la Diabetes Branch del National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), y en el University of Texas Southwestern (UT Southwestern)

Medical Center de Dallas. Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA) proporcionó metionil leptina humana recombinante (leptina recombinante) para el ensayo. La respuesta de cada paciente fue comparada con su estado basal. Debido a la rareza de los síndromes de lipoatrofia y la variabilidad de las características clínicas, no fue factible incluir un grupo de control aleatorizado tratado con placebo. Los consejos de revisión institucionales del NIDDK y del University of Texas Southwestern Medical Center autorizaron el estudio. Se obtuvo consentimiento informado por escrito de la paciente o de su tutor legal.

[0036] Las pacientes fueron evaluadas como pacientes ingresadas en el Clinical Center of the National Institutes of Health y el General Clinical Research Center del University

of Texas Southwestern Medical Center antes del tratamiento y nuevamente tras 1, 2 y 4 meses de terapia con leptina. Todas las pacientes habían recibido dosis estables de medicaciones concomitantes durante por lo menos 6 semanas antes de iniciar la leptina. Durante el estudio se redujeron las dosis de fármacos hipoglicémicos o se interrumpió su administración, según se requiriera.

[0037] El objetivo de este estudio fue alcanzar concentraciones casi fisiológicas de leptina en plasma. La dosis de sustitución fisiológica fue calculada en 0,02 mg/kg/día para los hombres de todas las edades, 0,03 mg/kg/día para mujeres de menos de 18 años y de 0,04 mg/kg/día para las mujeres adultas. Se inyectó leptina recombinante por vía subcutánea cada 12 horas. Es importante advertir que la dosis de sustitución es aproximadamente una décima parte de la dosis usada más frecuentemente en los ensayos de obesidad. Las pacientes fueron tratadas con el 50% de la dosis de sustitución durante el primer mes, con el 100% de la dosis de sustitución el mes siguiente y con el 200% de la dosis de sustitución durante los dos meses siguientes. Como variables primarias para determinar la eficacia de la leptina recombinante se establecieron la Hemoglobina A_{1c} y los niveles de triglicéridos séricos en ayunas.

Análisis bioquímicos

[0038] Los niveles séricos de glucosa y triglicéridos fueron determinados por métodos estándar utilizando el equipo automático Hitachi (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) y Beckman Instrument (Beckman, CA). La hemoglobina A1c fue determinada por cromatografía líquida de alta presión e intercambio iónico (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Los niveles de ácidos grasos libres (FFA, Free Fatty Acids) en suero fueron determinados con un kit comercial (Wako, Richmond, VA). Los niveles de insulina en suero fueron determinados mediante inmunoensayos utilizando reactivos proporcionados por Abbott Imx Instrument (Abbott Park, IL) y un kit comercial (Linco Research, Inc., St. Charles, MO). Los niveles séricos de leptina fueron determinados mediante inmunoensayos utilizando un kit comercial (Linco Research, Inc. St. Charles, MO).

Procedimientos

[0039] El gasto energético en reposo fue medido utilizando Deltatrac Equipment (Sensormedics, Yorba Linda, CA). La prueba fue realizada tras un ayuno nocturno de más de 8 horas en pacientes en reposo al despertar, entre las 6 y las 8 de la mañana. Se llevó a cabo un test de tolerancia a la glucosa tras ayunar durante la noche, utilizando 75 gramos de dextrosa. La glucosa sérica fue medida a los -10, 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos de la carga de glucosa.

[0040] Se realizó una prueba de tolerancia a altas dosis de insulina utilizando 0,2 UI/kg de insulina regular para evaluar la sensibilidad a la insulina. La insulina fue administrada intravenosamente tras ayunar toda la noche. Se recogieron muestras para glucosa a los -10, 0, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos de la administración de la insulina. La constante K (la tasa de desaparición de glucosa como reflejo de la sensibilidad corporal total a la insulina) fue calculada como la tasa constante del descenso de la glucosa en sangre tras insulina intravenosa, utilizando cinética de primer orden (Harrison et al., 1976).

[0041] La grasa corporal fue determinada utilizando un absorciómetro de rayos X de energía dual (DEXA, Hologic QDR 4500) (Hologic, Inc., Bedford, MA) (Lambrinoudaki et al., 1998). Imágenes axiales potenciadas en TI de resonancia magnética del hígado fueron obtenidas con un escáner 1,5 tesla (General Electric Medical Systems, Milwaukee) (Abate et al., 1994). Los volúmenes hepáticos se calcularon utilizando el paquete de software de análisis de imágenes MEDx (Sensor Systems, Inc., Sterling, VA), en una estación de trabajo Sun. Colocando un punto de siembra para un borde según el algoritmo, se obtuvieron registros de los márgenes exteriores del hígado en cortes contiguos individuales. Los volúmenes hepáticos fueron entonces calculados en base al área de píxeles y el grosor del corte. Se pidió a los sujetos participantes en el centro NIH que informaran basalmente de su ingesta de alimentos en los últimos 3 días, y de nuevo a los 4 meses para calcular la estimación de ingesta diaria de alimentos (Feskanich et al., 1993).

Análisis Estadísticos

[0042] Las mediciones se presentan como la media $\pm$ EEM. Para comparar variables del estudio durante diversos periodos de éste se utilizó el análisis de varianza de medidas repetidas. Datos asimétricos tales como las concentraciones de triglicéridos y las constantes K calculadas fueron log-transformados. Se empleó el test t apareado para comparar los datos basales con diversos puntos en el tiempo cuando fue aplicable. Las concentraciones de glucosa plasmática durante el test de tolerancia a la glucosa oral fueron comparadas utilizando un análisis de varianza de 2 factores con periodo del estudio y tiempo durante la prueba modelados como factores repetidos. Intervalos de confianza del noventa y nueve por ciento de las diferencias entre las medias fueron derivados del análisis de varianza y para las diferencias entre medias (Hanh et als., 1991). Los cambios se consideraron estadísticamente significativos para $p < 0,05$. No se hicieron ajustes para comparaciones simultáneas para análisis estadísticos de hipótesis específicas *a priori*.

Resultados

Características basales de las pacientes

[0043] Ocho de las nueve pacientes eran diabéticas y todas ellas hiperlipidémicas (Tabla 1). A todas las pacientes diabéticas se les administró terapia farmacológica previa al estudio (Tabla 1 y 2) y a 4 pacientes se les administró terapia farmacológica para el control lipídico (Tabla 1). La HbA_{1c} media de las pacientes diabéticas fue $9,1 \pm 0,5\%$ (normal: $< 5,6\%$). Los niveles medios de triglicéridos se elevaron a 1405 mg/dL (rango: 322-7,420 mg/dl; rango normal: 35-155 mg/dl) [16 mmol/l, rango: 3,6-8,7 mmol/l]. Los niveles de ácidos grasos libres (FFA) aumentaron a aproximadamente 3 veces el límite superior de normalidad (1540 ± 407 μ mol/l; normal: 350-550 μ mol/l). Seis de las siete pacientes NIH tenían hígado graso al ultrasonido y tamaño aumentado del hígado al examen físico. Tres de las pacientes fueron sometidas a biopsia hepática, y a dos de las tres se les diagnosticó esteatohepatitis no alcohólica en base a criterios histopatológicos (Manton et als., 2000; Berasain et als., 2000; Luyckx, et als., 2000).

[0044] La concentración media de leptina en suero fue de $1,3 \pm 0,3$ ng/ml basalmente (Tabla 1) y aumentó con la terapia a $2,3 \pm 0,5$ ng/ml al final del primer mes, a $5,5 \pm 1,2$

ng/ml al final del segundo mes, y a $11,1 \pm 2,5$ ng/ml al finalizar el cuarto mes. Por consiguiente, la administración de leptina recombinante a las dosis usadas en este estudio produjo unos niveles de leptina en suero aproximadamente normales en esas pacientes.

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

[0045] La primera paciente tratada en el estudio (NIH-1) es la de más grave afectación y su evolución es instructiva para demostrar el espectacular efecto de la sustitución de la leptina en esta población, incluso cuando se han agotado todas las demás terapias potenciales. Esta paciente nació sana, pero presentó pérdida de grasa entre los 10 y 12 años de edad. Desarrolló hipertrigliceridemia grave a los 13 años y diabetes a los 14. Fue presentada en el NIH Clinical Center a los 15 años con unos niveles de triglicéridos consistentemente >10.000 mg/dl (>113 nmol/l) y diabetes con HbA_{1c} de 9,5%. Tenía xantoma cutáneo eruptivo doloroso disperso por todo el cuerpo y hepatomegalia masiva que se extendía a la cresta ilíaca. Se añadió terapia de plasmaféresis semanal y Orlistat para aliviar la hipertrigliceridemia (Figura 1A) (Bolan et als.). Otras características clínicas a destacar fueron un apetito voraz (informó de que consumía más de 3200 kcal/día) y un índice metabólico en reposo muy elevado a 2010 kcal/día, un 180% de lo esperado. A lo largo de un periodo de cuatro meses, la leptina recombinante causó una mejoría progresiva marcada de la hipertrigliceridemia y la hiperglicemia, que permitió la interrupción de la plasmaféresis y las medicaciones para la diabetes (Figura 1A). La mejoría de los parámetros metabólicos fue acompañada de la desaparición del xantoma cutáneo. Además, su volumen hepático se redujo un 40% (de 4213 ml basales a 2644 ml a los 4 meses, se muestra en la Figura 1B).

Leptina mejoró el control metabólico en todas las pacientes lipoatróficas diabéticas

[0046] Antes de la iniciación de la terapia con leptina, las ocho pacientes diabéticas presentaban un mal control metabólico. Con cuatro meses de terapia de sustitución de la leptina, la HbA_{1c} descendió una media de 1,9 puntos porcentuales (95% IC, 1,1 a 2,7 %, $p=0,0012$) (Fig. 2). Las respuestas individuales de las pacientes se presentan en la Tabla

3. Cabe señalar que el control glicémico mejoró a pesar de reducir o interrumpir la terapia antidiabetes basal (Tabla 2).

Tabla 2: Cambios en la terapia hipoglicémica durante el estudio

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

[0047] Los niveles de glucosa en plasma mostraron una mejoría significativa en la prueba de tolerancia a la insulina al final de los 4 meses, en comparación con los valores basales (Fig. 3A). El valor K (tasa de desaparición de la glucosa) aumentó de $0,0071 \pm 0,0012$ a $0,0169 \pm 0,0039$ indicando una mejoría de la sensibilidad corporal total

a la insulina ($p=0,035$). Además, la tolerancia a la glucosa oral mejoró también significativamente en comparación con los valores basales. (Figura 3B).

[0048] Al final de cuatro meses de terapia con leptina recombinante; los niveles de triglicéridos en ayunas descendieron un 60% (IC, 43 a 77%, $p<0,001$, Fig. 4). Durante este mismo periodo, los ácidos grasos libres en ayunas descendieron de 1540 ± 407 Pmol/l a 790 ± 164 Pmol/l ($p=0,045$). En la Tabla 3 se presentan las respuestas individuales.

Tabla 3: Parámetros metabólicos de las pacientes durante distintas fases de la terapia

Pacientes	HbA1c (%)				Triglicéridos ¹ (mg/dl)				Ácidos grasos libres ² (pmol/l)			
	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4
Mes ³	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4
NIH-1	8,6	7,6	7,4	7,0	7420	6440	1632	1214	3977	3517	2216	1701
NIH-2 ⁴	9,8	8,3	7,4	10,0	633	523	471	405	2922	1452	1372	1244
NIH-3	9,3	7,8	8,4	7,9	450	579	233	281	919	368	451	454
NIH-4	7,6	6,7	6,1	5,0	322	232	160	106	1838	1388	866	446
NIH-5	9,5	9,4	6,5	6,1	913	427	143	123	1066	1842	723	629
NIH-6	9,2	8,6	7,2	7,4	663	355	242	303	1672	1367	1315	428
NIH-7	9,5	8,4	7,4	6,6	802	366	295	215	384	315	306	345
UTSW-1	9,5	8,1	7,5	7,3	995	827	383	192	560	360	525	560
UTSW-2 ⁵	5.4	4.8	5.0	5.1	447	656	276	424	520	630	1690	1310

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

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

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

4Esta paciente presentó incumplimiento entre los meses 3º y 4º de la terapia. Tras dos meses de cumplimiento estricto, documentado por los viales de medicación usados, los parámetros comunicados fueron respectivamente: 7,3%, 283 mg/dl and 799 pmol/l

5Paciente no diabética

Cambios en el volumen hepático y pruebas de función hepática

[0049] La media basal del volumen hepático fue de 3097 ± 391 ml (aproximadamente un aumento de cuatro veces en comparación con individuos de peso normal ajustados por edad y sexo). La leptina redujo el volumen hepático una media de un 28% (IC, 20 a 36%) desde los valores basales. La reducción media del volumen hepático fue de 987 ml (IC, 546 a 1428 ml, $p=0,0024$). La mejoría en el tamaño hepático fue asociada a la mejoría en las pruebas de función hepática. Las concentraciones basales de alanina-transaminasa descendieron de 66 ± 16 U/l a 24 ± 4 U/l al final de los 4 meses ($p=0,023$). Igualmente, las concentraciones séricas de transaminasa aspártica fueron de 53 ± 12 U/l basalmente y 21 ± 2 U/l al final de los 4 meses ($p=0,03$).

Cambios en el equilibrio energético

[0050] La ingesta calórica diaria autocomunicada se redujo de forma importante desde unos valores basales de 2680 ± 250 kcal/día a 1600 ± 150 kcal/día ($p=0,005$, $n=7$). Hubo un descenso paralelo en el índice metabólico en reposo medido de 1920 ± 150 kcal/día a 1580 ± 80 kcal/día ($p=0,003$, $n=9$).

[0051] Todos menos uno de los sujetos (NIH-3) presentaron pérdida de peso al final de los 4 meses. La media de la pérdida de peso fue de $3,6 \pm 0,9$ kg con un rango situado entre -1,7 y 7,3 kg. Una importante fracción de la pérdida de peso (50-65%) puede atribuirse a la pérdida de peso del hígado.

Tolerabilidad y acontecimientos adversos

[0052] No se comunicaron ni observaron reacciones cutáneas en los puntos de inyección. No se observaron tendencias a acontecimientos adversos en parámetros bioquímicos o hematológicos rutinarios. La paciente NIH-1 tuvo un episodio intenso de náuseas y vómitos tras la primera dosis. La paciente NIH-6 presentó agravamiento de la hipertensión asociado a sofocos tras la segunda dosis.

[0053] La paciente NIH-7 fue hospitalizada por infección por estreptococos durante el tercer mes de la terapia. Ninguno de estos acontecimientos se repitió con la continuación de la terapia.

Discusión

[0054] En este estudio, la sustitución de la leptina produjo unos claros y espectaculares beneficios metabólicos en un grupo de pacientes con lipodistrofia y deficiencia de leptina. Durante el estudio, la sustitución con leptina recombinante produjo una mejoría de 1,9 puntos porcentuales en HbA_{1c}, lo que se considera que reduce los riesgos relativos de desarrollar retinopatía en ~22% en la población diabética (UK PDS, 1998). Además, los niveles de triglicéridos bajaron un 60%, lo que se considera que reduce el riesgo relativo de acontecimientos cardiovasculares en la población general en un 35-65% (Kreisberg, 1998; Garg, 2000).

[0055] Estos resultados proporcionan una nueva visión sobre los mecanismos de acción de la leptina. La señal de la leptina parece regular la sensibilidad corporal total a la insulina y los niveles de triglicéridos, además de su conocida función en el control de la homeostasis energética. Este estudio constituye la primera evidencia de que la leptina funciona como un agente sensibilizador a la insulina y ahorrador de insulina in vivo en humanos.

[0056] Aunque no se utilizó un diseño de estudio aleatorizado, el peso de la evidencia sugiere que la mejoría en el control metabólico fue causada por la leptina más que por la mejoría en el cumplimiento asociada a la participación en un estudio. En primer lugar, la magnitud y reproducibilidad de la mejoría en la HbA_{1c} son más coherentes con el efecto de un fármaco que con el de un placebo. A pesar de la heterogeneidad de las pacientes incluidas en nuestro estudio, observamos una mejoría uniforme en el control metabólico en todas las pacientes diabéticas. Hubo evidencia de incumplimiento en la paciente NIH-2, lo que explica el empeoramiento de su HbA_{1c} entre los meses 2 y 4, que se corrigió con una terapia prolongada (Tabla 3). La retirada de fármacos en esta paciente proporciona una clara evidencia de que el efecto sobre los niveles de HbA_{1c} mejorados es debido a la administración de leptina.

Efecto de la leptina sobre la ingesta de alimentos

[0057] Está reconocido que la limitación de la ingesta calórica en la diabetes lipoatrófica mejora las anormalidades en la glucosa y los lípidos (Trygstad et al., 1977). No obstante, los pacientes tienen dificultades en el cumplimiento de las

limitaciones en las comidas debido a su apetito. La leptina redujo claramente la ingesta de alimentos en esas pacientes. Se realizó un estudio limitado con la Paciente NIH-1 para determinar la contribución del descenso en ingesta de alimentos sobre los parámetros metabólicos. En el hospital fue sometida a 9 días de retirada de leptina con ingesta calórica ajustada a los niveles previos a la retirada. A pesar de estar sometida a una dieta constante, sus concentraciones en ayunas de insulina, triglicéridos y glucosa aumentaron a las 48 horas. Estas observaciones indican que la leptina tiene efectos sobre la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de los triglicéridos, con independencia de sus efectos sobre la ingesta de alimentos. Se han comunicado datos similares con experimentos de alimentación pareada en ratones lipoatróficos, con o sin administración de leptina (Shimomura et als., 1999; Ebihara et als., 2001).

Correlación con modelos en ratón

[0058] Los diversos modelos en ratón de lipoatrofia sugerían que la ausencia de tejido adiposo es la causa de la resistencia insulínica en este síndrome (Burant et als., 1997; Moitra et als., 1998; Shimomura et als., 2000). La demostración de que el trasplante de tejido adiposo a ratones lipoatróficos mejora espectacularmente la resistencia insulínica constituye una importante confirmación de esta hipótesis (Gavrilova et als., 2000). No obstante, seguía sin aclararse por qué se requería tejido adiposo para mantener la sensibilidad corporal total a la insulina. Las observaciones y los resultados comentados anteriormente, junto con Shimomura et als. más arriba, sugieren que la mayor parte de la acción reguladora del tejido adiposo sobre la sensibilidad corporal total a la insulina es mediada por la leptina.

[0059] Un posible mecanismo de cómo regula la leptina la sensibilidad insulínica y el metabolismo lipídico puede basarse en el SREBP1c, un factor de transcripción que estimula la lipogénesis. En el hígado, el SREBP1c es regulado por incremento por la hiperinsulinemia que se observa en la lipoatrofia. La deficiencia de leptina y la hiperinsulinemia producen regulación por descenso del sustrato del receptor de insulina, IRS-2, obstaculizando la acción de la insulina e incrementando la producción de glucosa hepática. El incremento de la lipogénesis y de la producción de glucosa hepática dan origen a un círculo vicioso. El incremento de los niveles de lípidos tisulares va asociado

al descenso de la sensibilidad corporal total a la insulina, y por tanto a más producción de glucosa hepática. Se ha demostrado que la sustitución de la leptina corrige este círculo vicioso. Aunque la tasa de la síntesis de triglicéridos no se ha estudiado en humanos con lipoatrofia, los estudios calorimétricos indirectos proporcionan alguna evidencia de que es posible que haya una desregulación de la lipogénesis (Arioglu et als., 2000). Otra observación fue el descenso en el gasto energético en reposo en las pacientes tratadas en este estudio. Esto puede ser debido al descenso en la ingesta de alimentos que resulta en una reducción de la termogénesis inducida por la dieta.

Leptina: una hormona antiesteatosis

[0060] Se ha informado de que la administración de leptina en ratas Zucker conduce a la corrección de la esteatosis en diversos órganos que actúan como puntos de acumulación de lípidos, tales como las células islotes hepáticas o las células cardíacas (Unger, 1995; Unger et als., 1999). La acumulación de lípidos fuera de los adipocitos puede ser un fenómeno de desbordamiento resultante del hecho de que los adipocitos hayan alcanzado su máxima capacidad de almacenamiento de triglicéridos. En la lipodistrofia, estos órganos son las únicas localizaciones donde se puede almacenar lípidos. El tratamiento con leptina en ratones con lipodistrofia produce un espectacular descenso en las reservas hepáticas de triglicéridos. Paralelamente, en humanos con lipodistrofia la terapia con leptina provoca una notable y altamente significativa reducción de los volúmenes hepáticos.

Implantación de la sustitución de leptina

[0061] El concepto de que el tejido adiposo es un órgano endocrino recibió una importante confirmación con el descubrimiento de la leptina. La leptina tiene efectos, directos y/o indirectos, sobre los órganos clave del metabolismo, incluyendo el cerebro, el hígado, los músculos, la grasa y el páncreas. Desde luego, la leptina no es la única señal circulante de los adipocitos. Por ejemplo, otra hormona de los adipocitos es la proteína relacionada con el complemento específica de adipocitos (ACRP, Adipocyte Complement Related Protein) 30/Adiponectina/AdipoQ que parece tener importancia

en la inducción de la oxidación de las grasas en el músculo y el hígado (Yamauchi et al., 2001; Fruebis et al., 2001; Berg et al., 2001). La falta de adipocitos tendría como resultado una deficiencia en todas las señales derivadas de la grasa conocidas y aún no descubiertas, contribuyendo así a muchas de las anormalidades observadas en los síndromes caracterizados por la ausencia de grasa. Este estudio es el primero realizado en humanos sobre la eficacia metabólica de sustituir una hormona derivada de la grasa en una situación de deficiencia de grasa. Parece ser que la deficiencia de leptina es un factor que contribuye de forma importante (pero no el único) a las anormalidades metabólicas observadas asociadas a la lipoatrofia. Por tanto, este estudio pone de manifiesto una importante razón para tomar en consideración la terapia de sustitución de la leptina en humanos; es decir, la lipodistrofia grave.

EJEMPLO III

[0062] Se presenta aquí la secuencia de aminoácidos de la metionil leptina recombinante humana madura como SEQ ID NO.1, donde el primer aminoácido de la proteína madura es la valina (en la posición 1) y un residuo metionil se sitúa en la posición -1 (llamado aquí leptina rHu 1-146, SEQ ID No. 1).

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

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

[0063] Alternativamente se puede utilizar una variante natural de la leptina humana, que tiene 145 aminoácidos, y, comparada con la leptina rHu 1-146 presenta una glutamina ausente en la posición 28, que se presenta a continuación (denominada aquí leptina rHu 1-145, SEQ ID NO. 2, el punto en blanco (" ") indica sin aminoácido).

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

[0064] Otros ejemplos de proteínas de la leptina, preparaciones, formulaciones, composición farmacéutica, dosis y vías de administración se han descrito previamente en las siguientes Solicitudes PCT, PCT International Publication N° WO 96/05309; WO 96/40912; WO 97/06816; WO 00/20872; WO 97/18833; WO 97/38014; WO 98/08512 y WO 98/28427.

[0065] Las proteínas de la leptina y moléculas relacionadas son mencionadas también en las siguientes publicaciones; no obstante no se menciona nada respecto a la actividad de ninguna composición comunicada.

[0066] Patente EE UU N°. 5.521.283; 5.525.705; 5.532.336; 5.552.522; 5.552.523; 5.552.524; 5.554.727; 5.559.208; 5.563.243; 5.563.244; 5.563.245; 5.567.678; 5.567.803; 5.569.743; 5.569.744; 5.574.133; 5.580.954; 5.594.101; 5.594.104; 5.605.886; 5.614.379; 5.691.309; 5.719.266 (Eli Lilly and Company);

[0067] PCT WO96/23513; WO96/23514; WO96/23515; WO96/23516; WO96/23517; WO96/23518; WO96/23519; WO96/34111; WO 96 37517; WO96/27385; WP 97/00886; EP 725078; EP 725079; EP 744408; EP 745610; EP 835879 (Eli Lilly and Company);

[0068] PCT WO96/22308 (Zymogenetics);

[0069] PCT WO96/31526 (Amylin Pharmaceuticals, Inc.)

[0070] PCTWO96/34885; WO 97/46585 (SmithKline Beecham, PLC);

[0071] PCT WO 96/35787 (Chinon Corporation);

[0072] PCT WO97/16550 (Bristol-Myers Squibb);

[0073] PCT WO 97/20933 (Schering Corporation)

[0074] EP 736599 (Takeda);

[0075] EP 741187 (F. Hoffman La Roche).

[0076] En la medida en que en esas referencias se consideran proteínas de la leptina útiles, o composiciones o métodos asociados, tales composiciones y/o métodos pueden ser usados conjuntamente con los presentes métodos.

EJEMPLO IV

[0077] Se puede utilizar un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) estándar para determinar los niveles de leptina en el suero de pacientes lipoatróficos, según una versión de la presente invención. El método ELISA puede emplear un anticuerpo monoclonal anti rmetHu-leptina de rata para capturar la leptina del suero. También puede emplearse anticuerpo policlonal anti rmetHu-leptina de conejo purificado por afinidad conjugado con peroxidasa de rábano para detectar la leptina capturada. El límite de detección del mencionado ensayo utilizando estos anticuerpos puede estar en el rango de 0,5-0,8 ng/ml. Aunque se han podido utilizar ciertos anticuerpos, los preferidos son los que reaccionan específicamente con leptina humana nativa, y son sensibles para detectar cantidades de leptina iguales o inferiores a 5 ng/ml de suero.

[0078] De preferencia, el tiempo para determinar los niveles de leptina basales en un paciente es después de un ayuno de 8-12 horas, como puede ser durante las primeras horas de la mañana. Los niveles de leptina basales pueden así no ser confundidos con un aumento de los niveles, como puede ser tras una comida, o debido al aumento de la leptina durante el ciclo del sueño observado en la mayoría de los individuos (ej., aumento de los niveles de leptina a 3:00 a.m.). Tales niveles basales pueden ser utilizados, como la observación de la elevación nocturna de los niveles de leptina, pero esos niveles deben ser comparados con niveles similares en pacientes en una situación similar.

[0079] En base a los anteriores datos, puede aplicarse un método de determinación de la predisposición de los pacientes lipoatróficos al tratamiento con leptina, determinando el nivel de leptina correspondiente a la concentración de leptina sérica y comprobar que la concentración de leptina sérica es de aproximadamente 4 ng/ml o menos.

REFERENCIAS CITADAS

[0080]

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Lepold L., Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-32.
2. Cosidine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334:292-5.
3. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting: *Nature* 1996; 382:250-2.
4. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387:903-8.
5. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G. et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999; 341:879-84.
6. Reitman ML, Arioglu E, Gavrilova O, Taylor SI. Lipoatrophy revisited. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11:410-6.
7. Lawrence RD. Lipodystrophy and hepatomegaly with diabetes, lipaemia, and other metabolic disturbances: a case throwing new light on the action of insulin. *Lancet* 1946; 1:724-731 and 773-775.
8. Magre J, Delepine M, Khallouf E, et al. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 2001; 28:365-70.
9. Gavrilova O, Marcus-Samuels B; Graham D, et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 271-8.
10. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. c Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999; 401:73-6.
11. Peters AL, Schriger DL. The new diagnostic criteria for diabetes: the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. *Am J Med* 1998; 105:15s-19s.

12. Garg A, Fleckenstein JL, Peshock RM, Grundy SM. Peculiar distribution of adipose tissue in patients with congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:358-61.
13. Garg A Peshock RM, Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:170-4.
14. Cao H, Hegele RA. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2000; 9:109-12.
15. Harrison LC, Martin FI, Melick R4. Correlation between insulin receptor binding in isolated fat cells and insulin sensitivity in obese human subjects. *J Clin Invest* 1976; 58:1435-41.
16. Lambrinoudaki I, Georgiou E, Douskas G, Tsekis G, Kyriakidis M, Proukakis C. Body composition assessment by dual-energy x-ray absorptiometry: comparison of prone and supine measurements. *Metabolism* 1998; 47: 1379-82.
17. Abate N. Bums D, Peshock RM, Garg A, Grundy SM. Estimation of adipose tissue mass by magnetic resonance imaging: validation against dissection in human cadavers. *J Lipid Res* 1994; 35:1490-6.
18. Feskanich D, Rimm EB, Giovannucci EI, et al., Reproducibility and validity of food intake measurements from a semiquantitative food frequency questionnaire. *J Am Diet Assoc* 1993; 93:790-6.
19. Hahn G, Meeker W. *Statistical Intervals: a guide to practitioners*. New York: John Wiley and Sons, 1991.
20. Manton ND, Lipsett J, Moore DJ, Davidson GP, Bourne AJ, Couper RT. Non-alcoholic steatohepatitis in children and adolescents, *Med J Aust* 2000; 173:476-9.
21. Berasain C. Betes M. Panizo A, et al. Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasaemia of unknown etiology. *Gut* 2000;47:429-35.

22. Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* 2000; 26:98-106.
23. Bolan C, Arioglu E, Gorden E, Taylor S, Lietman S. Intensive, long-term plasma exchange therapy for severe hypertriglyceridemia in acquired generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrin and Metab* (submitted).
24. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352:837-53.
25. Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiol* 1998; 82:67U-73U
26. Gotto AM, Jr. Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998; 82: 22Q-25Q.
27. Garg A., Lipodystrophies, *Am J Med* 2000; 108:143-52.
28. Arioglu E, Duncan-Morin J, Sebring N, et al. Efficacy and safety of troglitazone in the treatment of lipodystrophy syndromes. *An Intern Med* 2000; 133:263-74.
29. Trygstad O, Seip M, Oseid S. Lipodystrophic diabetes treated with fenfluramine. *Int J Obes* 1977; 1:287-92.
30. Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, et al. Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipodystrophic diabetes. *Diabetes* 2001; 50:1440-8.
31. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Bum P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269:546-9.
32. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269:543-6.
33. Pelleymounter MA, Cullen JM, Baker MB, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in

ob/ob mice. Science 1995; 269:540-3.

34. Mantzoros CS, Flier JS. Editorial: leptin as a therapeutic agent-trials and tribulations. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:4000-2.

35. Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial [see comments]. Jama 1999; 282:1568-75.

36. Burant CF, Sreenan S, Hirano K, et al. Troglitazone action is independent of adipose tissue. J Clin Invest 1997; 100:2900-8.

37. Moitra J, Mason MM, Olive M, et al. Life without white fat: a transgenic mouse. Genes Dev 1998; 12: 3168-81.

38. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. Genes Dev 1998; 12:3182-94.

39. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice, Mol Cell 2000; 6:77-86.

40. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM, Genetic and clinical implications. Diabetes 1995; 44:863-70.

41. Unger RH, Zhou YT, Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96:2327-32.

42. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. Nat Med 2001; 7:941-6.

43. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98:2005-10.
44. Berg AH, Cumbs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. Nat Med 2001; 7:947-53.

LISTA DE SECUENCIAS

[0081]

<110> AMGEN, INC.

<120> USO DE LA LEPTINA EN EL TRATAMIENTO DE LA LIPOATROFIA HUMANA Y MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE LA PREDISPOSICIÓN A DICHO TRATAMIENTO

<130> 54113.8005.WO00

<140> no asignado aún

<141> 2002-10-22

<150> US 60/336,394

<151> 2001-10-22

<160> 2

<170> Patente versión 3.1

<210> 1

<211> 146

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Leptina Recombinante Humana 146 (rHu-Leptina 1-146)

<400> 1

Val	Pro	Ile	Gln	Lys	Val	Gln	Asp	Asp	Thr	Lys	Thr	Leu	Ile	Lys	Thr
1				5					10					15	
Ile	Val	Thr	Arg	Ile	Asn	Asp	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Ser	Val	Ser	Ser
			20					25					30		
Lys	Gln	Lys	Val	Thr	Gly	Leu	Asp	Phe	Ile	Pro	Gly	Leu	His	Pro	Ile
		35					40					45			
Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Met	Asp	Gln	Thr	Leu	Ala	Val	Tyr	Gln	Gln	Ile
	50					55					60				
Leu	Thr	Ser	Met	Pro	Ser	Arg	Asn	Val	Ile	Gln	Ile	Ser	Asn	Asp	Leu
65						70				75					80
Glu	Asn	Leu	Arg	Asp	Leu	Leu	His	Val	Leu	Ala	Phe	Ser	Lys	Ser	Cys
				85					90					95	
His	Leu	Pro	Trp	Ala	Ser	Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	Asp	Ser	Leu	Gly	Gly
			100					105					110		
Val	Leu	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Leu	Ser	Arg
		115					120					125			
Leu	Gln	Gly	Ser	Leu	Gln	Asp	Met	Leu	Trp	Gln	Leu	Asp	Leu	Ser	Pro
	130					135					140				
Gly	Cys														
145															

<210> 2

<211> 145

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Leptina Recombinante Humana 145 (rHu-Leptina 1-145)

<400> 2

[illegible]

Reivindicaciones

1. Un método para determinar la predisposición de un paciente lipoatrófico para responder al tratamiento con una proteína de leptina, y el método comprende:

- (a) determinación del nivel de leptina en el paciente previo a dicho tratamiento;
- (b) determinar si el nivel de leptina es inferior o igual a aproximadamente 4 ng/ml; y
- (c) asignar una predisposición a dicho paciente para responder a una terapia de sustitución comprendiendo el mencionado tratamiento con la mencionada proteína de leptina.

2. El método de la reivindicación 1, donde el mencionado paciente es un hombre y el mencionado nivel de leptina es inferior o igual a aproximadamente 2 ng/ml antes del tratamiento.

3. El método de la reivindicación 1, donde el mencionado paciente es una mujer.

4. Un método para determinar la predisposición de un paciente lipoatrófico para responder al tratamiento con una proteína de leptina según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, y el método comprende:

- (a) determinar un nivel de leptina en el paciente antes del mencionado tratamiento;
- (b) comprobar si el nivel de leptina de (i) un paciente masculino es inferior o igual a aproximadamente 2 ng/ml, o
- (ii) una paciente femenina es inferior o igual a aproximadamente 4 ng/ml; y
- (c) determinar la predisposición de dicho paciente para responder a una terapia de sustitución comprendiendo el mencionado tratamiento con leptina.

5. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el mencionado nivel de leptina se determina mediante un inmunoensayo de anticuerpos

6. Un régimen farmacéutico para el tratamiento de un paciente lipoatrófico determinando la predisposición de un paciente lipoatrófico para responder al tratamiento con una proteína de leptina mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y posteriormente tratando al mencionado paciente con dicho régimen, comprendiendo este régimen una composición farmacéutica que incluye la mencionada proteína de leptina.
7. Un régimen farmacéutico para el tratamiento de la lipoatrofia, comprendiendo una combinación de un inhibidor de la proteasa y una proteína de leptina.
8. Un régimen farmacéutico para el tratamiento de la lipoatrofia, comprendiendo una combinación de una proteína de leptina y por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que forman tiazolidinedionas, fibratos, estatinas y metformina.
9. Un régimen farmacéutico para el tratamiento de un paciente humano con anormalidades metabólicas asociadas a la lipoatrofia, comprendiendo dicho régimen una composición farmacéutica que incluye una proteína de leptina.
10. Un régimen farmacéutico para el tratamiento de un paciente humano con lipoatrofia, donde dicha lipoatrofia es una forma adquirida de la enfermedad, comprendiendo el régimen mencionado una composición farmacéutica que incluye una proteína de leptina.
11. El régimen farmacéutico de la reivindicación 10, donde el mencionado paciente humano es un paciente VIH positivo.
12. El régimen farmacéutico de la reivindicación 11, donde la forma adquirida de lipoatrofia está relacionada con tratar al paciente VIH positivo con terapia antiviral de alta actividad (HAART).
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la mencionada proteína de leptina es seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-12, donde la mencionada proteína de leptina es seleccionada entre el grupo consistente en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2.

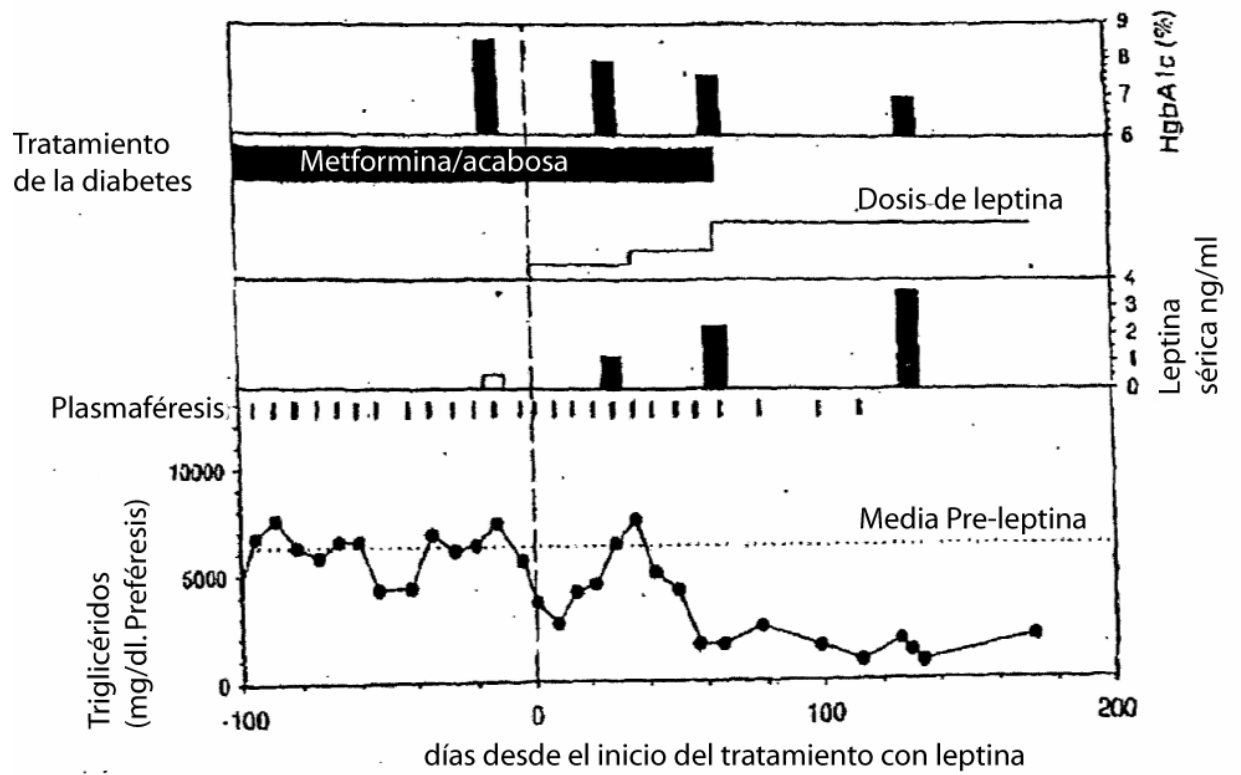


FIGURA 1A

FIGURA 1B

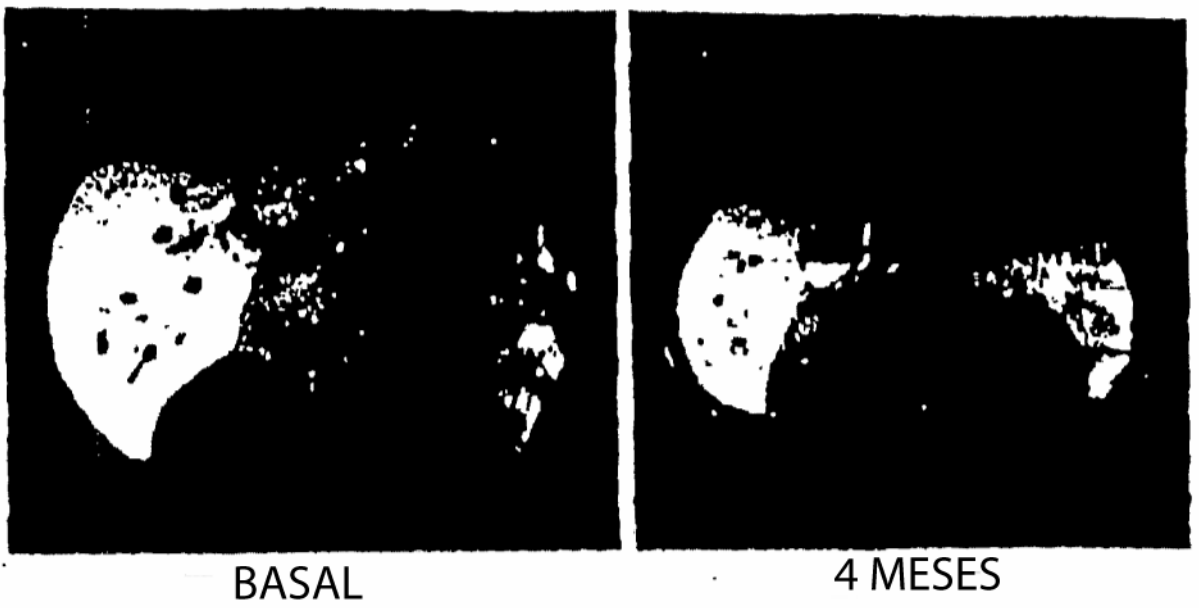


FIGURA 2

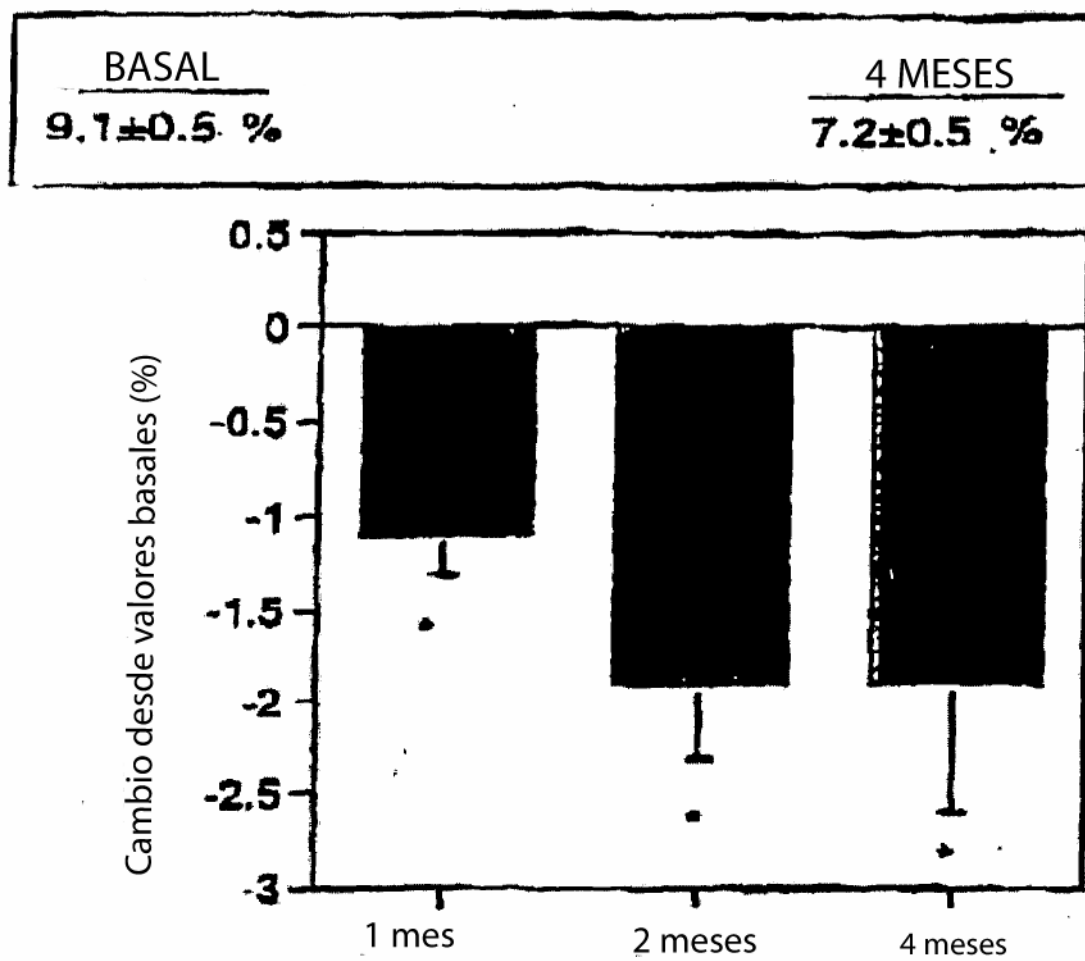
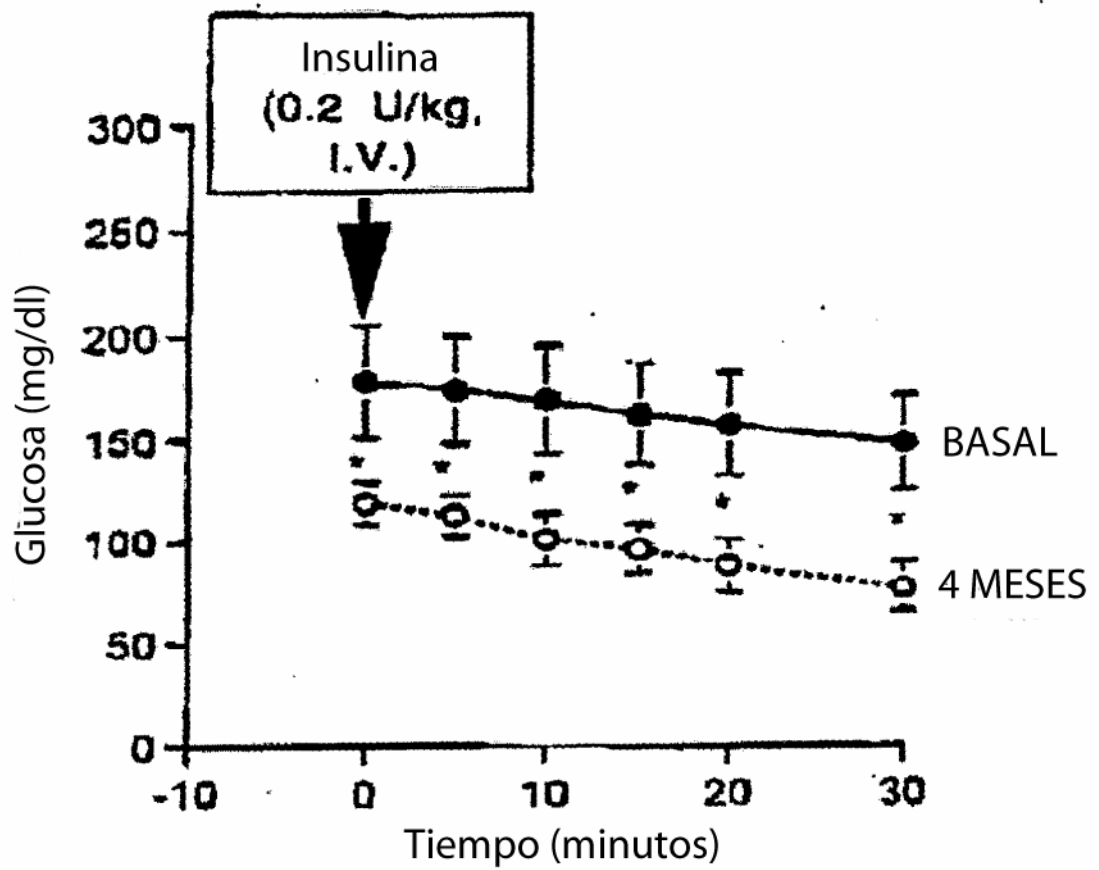


FIGURA 3A



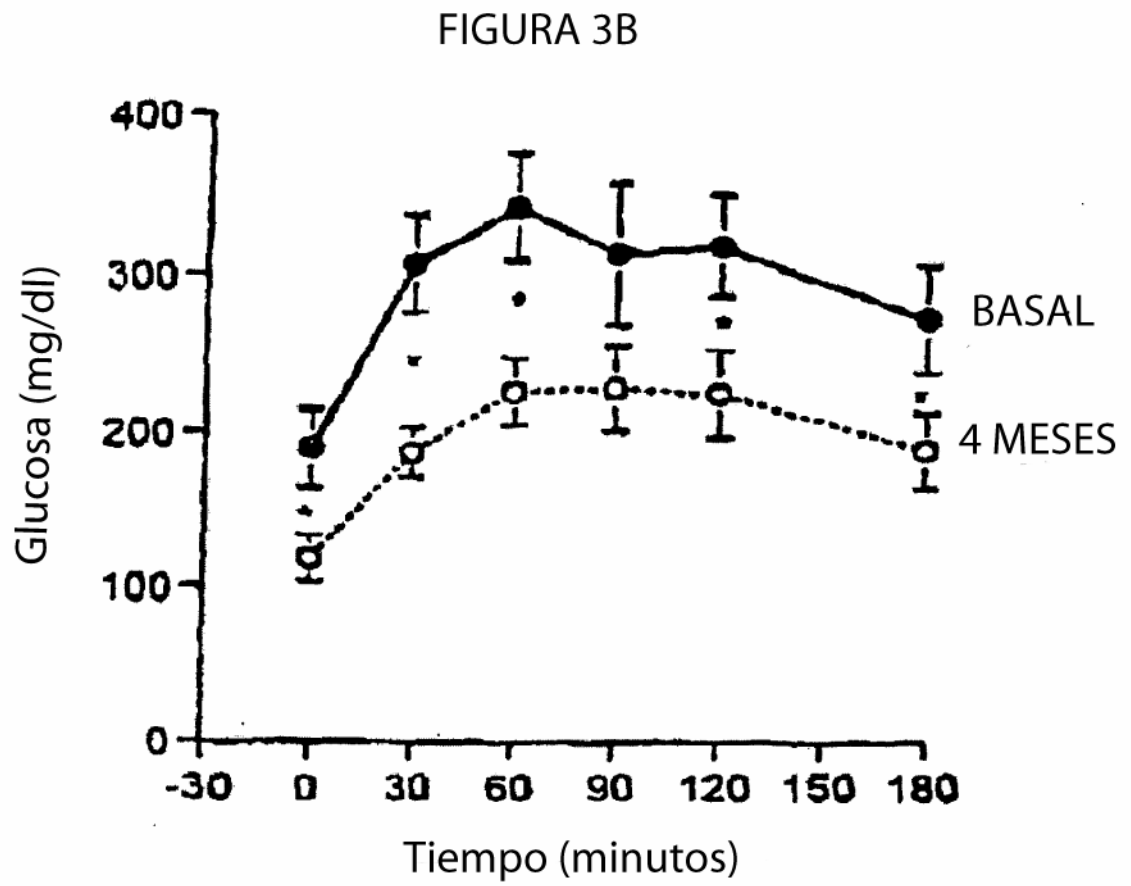
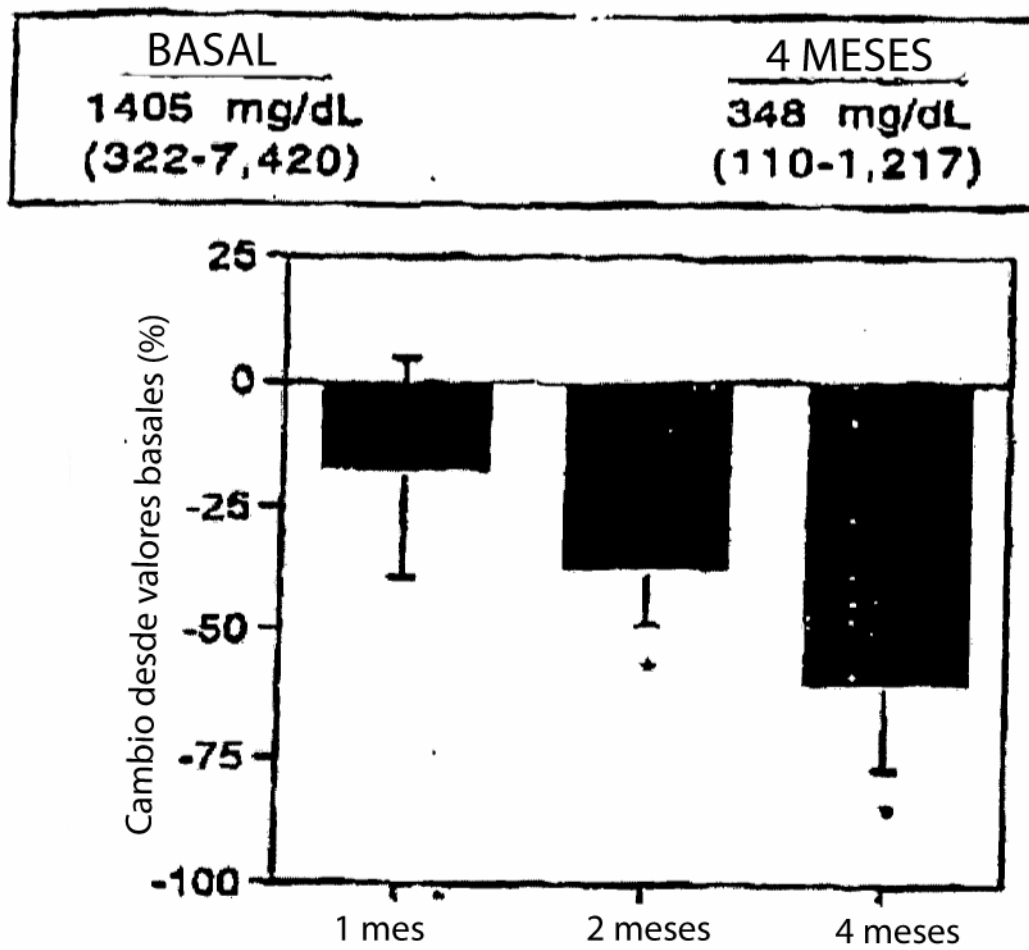


FIGURA 4



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el candidato es únicamente conveniente para el lector. No forma parte del documento de patente europeo. Aunque se ha tenido mucho cuidado a la hora de reunir las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP se exime de cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 0020872 A [0007] [0064]
- WO 9605309 A [0064]
- WO 9640912 A [0064]
- WO 9706816 A [0064]
- WO 9718833 A [0064]
- WO 9738014 A [0064]
- WO 9808512 A [0064]
- WO 9828427 A [0064]
- US 5521283 A [0066]
- US 5525705 A [0066]
- US 5532336 A [0066]
- US 5552522 A [0066]
- US 5552523 A [0066]
- US 5552524 A [0066]
- US 5554727 A [0066]
- US 5559208 A [0066]
- US 5563243 A [0066]
- US 5563244 A [0066]
- US 5563245 A [0066]
- US 5567678 A [0066]
- US 5567803 A [0066]
- US 5569743 A [0066]
- US 5569744 A [0066]
- US 5574133 A [0066]
- US 5580954 A [0066]
- US 5691309 A [0066]
- US 5719266 A [0066]
- WO 9623513 A [0067]
- WO 9623514 A [0067]
- WO 9623515 A [0067]
- WO 9623516 A [0067]
- WO 9623517 A [0067]
- WO 9623518 A [0067]
- WO 9623519 A [0067]
- WO 9634111 A [0067]
- WO 9637517 A [0067]
- WO 9627385 A [0067]
- WO 9700886 A [0067]
- EP 725078 A [0067]
- EP 725079 A [0067]
- EP 744408 A [0067]
- EP 745610 A [0067]
- EP 835879 A [0067]
- WO 9622308 A [0068]
- WO 9631526 A [0069]
- WO 9634885 A [0070]
- WO 9746585 A [0070]
- WO 9635787 A [0071]
- WO 9716550 A [0072]
- WO 9720933 A [0073]

- US 5594101 A [0066]
- US 5594104 A [0066]
- US 5605886 A [0066]
- US 5614379 A [0066]
- EP 736599 A [0074]
- EP 741187 A [0075]
- US 60336394 B [0081]

Folletos de no patentes citados en la descripción

- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1999, 1435-1712 [0021]
- **Zhang Y ; Proenca R ; Maffei M ; Barone M ; Lepold L. ; Friedman JM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, 1994, vol. 372, 425-32 [0080]
- **Cosidine RV ; Sinha MK ; Heiman ML et al.** Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med, 1996, vol. 334, 292-5 [0080]
- **Ahima RS ; Prabakaran D ; Mantzoros C et al.** Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature, 1996, vol. 382, 250-2 [0080]
- **Montague CT ; Farooqi IS ; Whitehead JP et al.** Congenital leptin deficiency is associated with severe early onset obesity in humans. Nature, 1997, vol. 387, 903-8 [0080]
- **Farooqi IS ; Jebb SA ; Langmack G et al.** Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. N Engl J Med, 1999, vol. 341, 879-84 [0080]
- **Reitman ML ; Arioglu E ; Gavrilova O ; Taylor SI.** Lipoatrophy revisited. Trends Endocrinol Metab, 2000, vol. 11, 410-6 [0080]
- **Lawrence RD.** Lipodystrophy and hepatomegaly with diabetes, lipaemia, and other metabolic disturbances: a case throwing new light on the action of insulin. Lancet, 1976, vol. 1, 724-732 [0080]

- **Magre J. ; Delepine M. ; Khallouf E et al.** Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet*, 2001, vol. 28, 365-70 [0080]
- **Gavrilova O ; Marcus-Samuels B ; Graham D et al.** Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest*, 2000, vol. 105, 271-8 [0080]
- **Shimomura I ; Hammer RE ; Ikemoto S ; Brown MS ; Goldstein JL.** c Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*, 1999, vol. 401, 73-6 [0080]
- **Peters AL ; Schrager DL.** The new diagnostic criteria for diabetes: the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. *Am J Med*, 1998, vol. 105, 15s-19s [0080]
- **Garg A; Fleckenstein JL ; Peshock RM ; Grundy SM.** Peculiar distribution of adipose tissue in patients with congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, vol. 75, 358-61 [0080]
- **Garg A; Peshock RM ; Fleckenstein JL.** Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, vol. 84, 170-4 [0080]
- **Cao H; Hegele RA.** Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with
- **Luyckx FH ; Lefebvre PJ ; Scheen AJ.** Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab*, 2000, vol. 26, 98-106 [0080]
- **Bolan C ; Arioglu E ; Gorden E ; Taylor S ; Lietman S.** Intensive, long-term plasma exchange therapy for severe hypertriglyceridemia in acquired generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998 [0080]
- Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*, 1998, vol. 352, 837-53 [0080]
- **Kreisberg RA.** Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiol*, 1998, vol. 82, 67U-73U [0080]
- **Gotto AM, Jr.** Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 2000, vol. 82, 22Q-25Q [0080]
- **Garg A.** Lipodystrophies, *Am J Med*, 2000, vol. 108, 143-52 [0080]
- **Arioglu E ; Duncan-Morin J ; Sebring N et al.** Efficacy and safety of troglitazone in the treatment of lipodystrophy syndromes. *Ann Intern Med*, 2000, vol. 133, 263-74 [0080]
- **Trygstad O ; Seip M. ; Oseid S.** Lipodystrophic diabetes treated with

- Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet*, 2000, vol. 9, 109-12 [0080]
- **Harrison LC ; Martin FI ; Melick R4.** Correlation between insulin receptor binding in isolated fat cells and insulin sensitivity in obese human subjects. *J Clin Invest*, 1976, vol. 58, 1435-41 [0080]
 - **Lambrinoudaki I ; Georgiou E ; Douskas G ; Tsekes G ; Kyriakidis M ; Proukakis C.** Body composition assessment by dual-energy x-ray absorptionmetry: comparison of prone and supine measurements. *Metabolism*, 1998, vol. 47, 1379-82 [0080]
 - **Abate N. ; Bums D ; Peshock RM ; Garg A ; Grundy SM.** Estimation of adipose tissue mass by magnetic resonance imaging: validation against dissection in human cadavers. *J Lipid Res*, 1994, vol. 35, 1490-6 [0080]
 - **Feskanich D ; Rimm EB ; Giovannucci EI.** Reproducibility and validity of food intake measurements from a semiquantitative food frequency questionnaire. *J Am Diet Assoc*, 1993, vol. 93, 790-6 [0080]
 - **Hahn G ; Meeker W.** Statistical Intervals: a guide to practitioners. New York: John Wiley and Sons, 1991 [0080]
 - **Manton ND ; Lipsett J ; Moore DJ ; Davidson GP ; Bourne AJ ; Couper RT.** Non-alcoholic steatohepatitis in children and adolescents. *Med J Aust*, 2000, vol. 173, 476-fenfluramine. *Int J Obes*, 1997, vol. 1, 287-92 [0080]
 - **Ebihara K ; Ogawa Y ; Masuzaki H et al.** Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes*, 2001, vol. 50, 1440-8 [0080]
 - **Campfield LA ; Smith FJ ; Guisez Y ; Devos R ; Bum P.** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 1995, vol. 269, 546-9 [0080]
 - **Halaas JL ; Gajiwala KS ; Maffei M et al.** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 1995, vol. 269, 543-6 [0080]
 - **Pelleymounter MA ; Cullen JM ; Baker MB et al.** Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 1995, vol. 269, 540-3 [0080]
 - **Mantzoros CS ; Flier JS.** Editorial: leptin as a therapeutic agent-trials and tribulations. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, vol. 85, 4000-2 [0080]
 - **Heymsfield SB ; Greenberg AS ; Fujioka K et al.** Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial [see comments]. *Jama*, 1999, vol. 282, 1568-75 [0080]
 - **Burant CF ; Sreenan S. Hirano K et al.** Troglitazone action is independent of adipose

- 9 [0080] tissue. J Clin Invest, 1997, vol. 100, 2900-8 [0080]
- **Berasain C. ; Betes M. ; Panizo A et al.** Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasaemia of unknown etiology. Gut, 2000, vol. 47, 429-35 [0080]
- **Moitra J ; Mason MM ; Olive M et al.** Life without white fat: a transgenic mouse. Genes Dev, 1998, vol. 12, 3168-81 [0080]
- **Shimomura I ; Hammer RE ; Richardson JA et al.** Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. Genes Dev, 1998, vol. 12, 3182-94 [0080]
- **Shimomura I ; Matsuda M ; Hammer RE ; Bashmakov Y ; Brown MS ; Goldstein JL.** Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. Mol Cel, 2000, vol. 6, 77-86 [0080]
- **Unger RH.** Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM, Genetic and clinical implications. Diabetes, 1995, vol. 44, 863-70 [0080]
- **Unger RH ; Zhou YT ; Orci L.** Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, vol. 96, 2327-32 [0080]
- **Yamauchi T ; Kamon J ; Waki H et al.** The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. Nat Med, 2001, vol. 7, 941-6 [0080]
- **Fruebis J. ; Tsao TS ; Javorschi S et al.** Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, vol. 98, 2005-10 [0080]
- **Berg AH; Cumbs TP ; Du X ; Brownlee M ; Scherer PE.** The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. Nat Med, 2001, vol. 7, 947-53 [0080]